

Konformationelle Vielfalt:
Synthese eines spleißosomalen
RNA-Konstruktes,
NMR-Strukturen von
Minigramicidin und einem
molekularen Schalter

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Dirk Bockelmann
aus
Bruchhausen-Vilsen

Frankfurt am Main 2006
(DF1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften (FB 14)
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. H. Schwalbe
1. Gutachter:	Prof. Dr. C. Griesinger
2. Gutachter:	Prof. Dr. H. Schwalbe

Datum der Disputation: 5. Juli 2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1998 bis Februar 2006 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Christian Griesinger am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main und am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Christian Griesinger dafür danken, daß er mir die Themen dieser Arbeit zur weitgehend selbständigen Bearbeitung überlassen hat und ein sehr anregendes wissenschaftliches Umfeld geschaffen hat, in dem er für Diskussionen immer zur Verfügung stand.

Im Rahmen der Kooperation im VW-Projekt „Conformational control of biomolecular functions“ möchte ich mich bei den Damen und Herren Dr. Hans-Dieter Arndt, Dr. Anna Schrey, Dr. Andrea Vescovi, Dr. Michael Karle und Herrn Professor Dr. U. Koert von der Philipps-Universität Marburg für die Bereitstellung der Proben und die vielen interessanten und fruchtbaren Diskussionen bedanken.

Bei der Lösung von computertechnischen Problemen standen mir Dr. Christian Richter, Dr. Jochen Junker, Dr. Volker Apelt, Dr. Wolfgang Peti, Dr. Peter Gröschke und Christian von der Heyden hilfreich zur Seite.

Für die ersten Schritte auf dem Weg zum NMR-Spektrum und die Beantwortung diesbezüglicher und anderer NMR-Fragen möchte ich mich sehr bei folgenden Personen bedanken: Prof. Dr. Steffen Glaser, Prof. Dr. Harald Schwalbe, Dr. Marcus Maurer, Dr. Christian Richter, Dr. Bernhard Geierstanger, Bodo Seeger, Dr. Wolfgang Peti, Dr. Wolfgang Bermel, Dr. Gottfried Zimmermann, Dr. Stefanie Lamberth, Dr. Markus Zweckstetter, Dr. Mirko Hennig und Dr. Teresa Carlomagno.

Für die produktive Stimmung in den diversen Labors in Frankfurt und Göttingen sorgten unter anderen Dr. Dierk Blechschmidt, Dr. Bernhard Geierstanger, Dr. Michael Baumann, Dr. Elke Durchardt, Dr. Heiko Manninga, Prof. Dr. Harald Schwalbe, Sigrun Rumpel, Dr. Stefan Becker, Karin Giller, Devananthan Raghunathan, Dirk Lennartz, Claudia Schwiegk, Elke Stirnal, Ellen Lichte, Kerstin Overkamp und Dr. Teresa Carlomagno.

Für die Schützenhilfe bei den diversen Strukturrechnungen gilt mein Dank folgenden Personen: Dr. Stefanie Lamberth, Dr. Jens Meiler, Dr. Laurent Verdier und Dr. Alexander Diener.

Die freundschaftliche und unvergeßliche Atmosphäre in B309 sowie im Büro 5 am MPI haben die folgenden Mitstreiter kreiert: Dr. Bernhard Geierstanger, Dr. Teresa Carlo-magno, Dr. Wolfgang Peti, Dr. Stefan Bartoschek, Dr. Heike Neubauer, Nils Lakomek und natürlich die zahlreichen Besucher aus den anderen Büros und Laboren.

Der Umzug von Frankfurt nach Göttingen wäre ohne die tatkräftige Hilfe von Dr. Stefanie Lamberth, Sabine Hofmann, Dr. Wolfgang Peti, Christian von der Heyden und Dr. Stefan Bartoschek nicht möglich gewesen.

Den KorrektorInnen Christian von der Heyden, Dr. Peter Gröschke, Dr. Stefan Bartoschek und Dr. Stefanie Lamberth sei für die Durchsicht und diverse Verbesserungsvorschläge dieser Arbeit gedankt.

Natürlich danke ich auch sehr herzlich allen bisher nicht erwähnten Mitgliedern des Arbeitskreises an dieser Stelle für die freundliche und gute Stimmung während meiner Promotion, sowie die zahlreichen Tips und Diskussionen.

Mein sehr persönlicher Dank gilt zu guter Letzt meiner Familie, die mich im Verlauf des Studiums und während der Promotion tatkräftig unterstützt hat. Vielen herzlichen Dank an meine Freundin Stefanie für ihre Geduld und Unterstützung in diesen doch langen Jahren der Promotion.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Synthese einer spleißosomalen U4/U6-RNA	5
2.1	Einführung	6
2.2	Das Spleißosom	7
2.2.1	Spleißen als chemische Reaktion	8
2.2.2	Definition der Spleißstellen in der prä-mRNA	10
2.2.3	Zusammensetzung des Spleißosoms: snRNPs	10
2.2.4	Sekundärstrukturen der snRNAs in den snRNPs	12
2.2.5	Der U4/U6-Komplex: U4 als Inhibitor der U6	12
2.2.6	Der Spleißosom-Kreislauf	15
2.3	Aufgabenstellung	18
2.4	Design der Ziel-RNA	19
2.5	Biochemische Synthese mit RNA-Polymerasen	21
2.5.1	T7-Polymerase	21
2.5.2	RNA-Oligomersynthesen mit T7-Polymerase	23
2.6	Aufreinigung von RNA-Oligomeren	29
2.6.1	Homogene 3'-Enden durch modifizierte DNA-Templete	30
2.6.2	Homogene 3'- und 5'-Enden durch Schneiden mit Ribozymen	30
2.6.3	Homogene 3'-Enden durch Schneiden mit DNA-Enzymen	34
2.6.4	Gel-Aufreinigung	35
2.6.5	Aufreinigung über HPLC	36
2.7	Biochemische Synthese von U4/U6-A Konstrukten	38
2.7.1	Synthese von u4u6a42 und u4u6a42-OMe von doppelsträngiger Templat-DNA	39
2.7.2	Synthese von u4u6a42 von Plasmid-Templat-DNA	49
2.7.3	Synthese von u4u6a46hh1	54
2.7.4	Synthese von u4u6a46hh2 bis u4u6a46hh4	64
2.7.5	Synthese von u4u6a46hh5	69
2.7.6	Synthese von u4u6a44hh7	77
2.7.7	Synthese von u4u6a46phh2	86
2.7.8	Synthese von u4u6a43de1	92
2.8	U4/U6-A aus chemischer Synthese	95

2.9	Zusammenfassung	98
3	Strukturaufklärung von Minigramicidin	101
3.1	Einführung	102
3.2	Gramicidin A (gA)	103
3.2.1	Allgemeines	103
3.2.2	gA in organischen Lösemitteln	105
3.2.3	gA in Micellen und Membranen	107
3.2.4	Modifizierte gA-Ionenkanäle	107
3.3	Minigramicidin	109
3.3.1	Synthese	110
3.3.2	Funktionale Eigenschaften	112
3.3.3	CD-Spektren	112
3.3.4	Aufgabenstellung	113
3.4	NMR-Spektroskopie von Minigramicidin in Benzol- d_6 /Aceton- d_6	114
3.4.1	NMR-Spektroskopie	114
3.4.2	Zuordnung der ^1H -chemischen Verschiebung	114
3.4.3	Strukturrechnung	120
3.4.4	Die Struktur von Minigramicidin in Benzol- d_6 /Aceton- d_6 (10:1, v/v)	122
3.5	NMR-Spektroskopie von Minigramicidin mit Cs^+	130
3.5.1	NMR-Spektroskopie	130
3.5.2	Zuordnung der ^1H -chemischen Verschiebung	130
3.5.3	Strukturrechnung	135
3.5.4	Die Struktur von Minigramicidin in gesättigter Cäsiumchlorid- $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_3$ (3:1, v/v)-Lösung	135
3.6	Zusammenfassung	141
4	Konformationen eines molekularen Schalters	143
4.1	Einführung	144
4.2	Beispiele molekularer Schalter	144
4.3	Bikonformationelle Schalter	147
4.4	Kopplung bikonformationeller Schalter	149
4.5	Aufgabenstellung	151
4.6	Konformation vor dem Schalten	152
4.7	Konformation nach dem Schalten	158
4.8	Zusammenfassung	161
5	Zusammenfassung	163
6	Experimentelle Vorschriften	171
6.1	Vorschriften zur biochemischen Synthese von RNA	172
6.1.1	Sequenzdesign der Templat-DNA für ein RNA-Konstrukt	172
6.1.2	Herstellung von doppelsträngigen T7-DNA-Templaten	172

6.1.3	T7-Polymerase	175
6.1.4	Transkriptionsbedingungen	175
6.1.5	Herstellung von u4u6a42 über ds-DNA-Templat	179
6.1.6	HPLC-Aufreinigung der roh-RNA über Nucleogen DEAE 60-7 Säulen	180
6.1.7	HPLC-Aufreinigung der roh-RNA über Dionex DNAPac PA100 Säulen	180
6.1.8	Entsalzung über Sephadex G15-Säule	181
6.1.9	Entsalzung von 2 ml Transkriptionen	182
6.1.10	Entsalzung über Sephadex G25-Säule	182
6.1.11	Linearisieren von pUC19	183
6.1.12	Hybridisierung der DNA-Einzelstränge für die Klonierung	184
6.1.13	Ligation der Ziel-DNA in den pUC19-Vektor	184
6.1.14	Transformation in kompetente BL21 (DE3)-Zellen	185
6.1.15	Überprüfung der Klone auf Inserts per PCR	185
6.1.16	Anlegen von Mini-Prep-Kulturen	186
6.1.17	DNA für die Sequenzierung	187
6.1.18	Anlegen von Einzelkolonien	187
6.1.19	Anlegen von Kulturen für die Mega-Prep	187
6.1.20	Schneiden mit Pst I	187
6.1.21	20 ml Transkription von plasmidischer Templat-DNA	188
6.1.22	Aufarbeitung einer RNA-Transkription	189
6.1.23	Präparative Aufreinigung der roh-RNA über PAGE	190
6.1.24	Elektroelution der aufgereinigten RNA aus Polyacrylamidgelen	191
6.1.25	Schneidreaktion mit HH-Ribozymen	193
6.1.26	Schneidreaktion mit DNA-Enzym	195
6.1.27	Dephosphorylierung von RNA am 5'-Ende	195
6.1.28	Markierung mit γ - ³² P-ATP	196
6.1.29	NMR-Proben	197
6.1.30	Agarosegele	197
6.1.31	DNA/RNA-Polyacrylamidgele	198
6.1.32	Konzentrationsbestimmung mit UV-Spektroskopie	200
6.1.33	Verwendete Chemikalien	202
6.1.34	Verwendete Lösungen	202
6.1.35	Verwendete Geräte	203
6.1.36	Quelltexte für Protokolle/Programme	205
6.2	Strukturaufklärung von Minigramicidin	211
6.2.1	NMR-Spektroskopie	211
6.2.2	Strukturrechnung	211
6.3	Experimentelle Daten des molekularen Schalters	237
6.3.1	NMR-Spektroskopie	237
6.3.2	Strukturrechnung	240

Verzeichnis der Abkürzungen

χ_1	erster Seitenkettenwinkel einer Aminosäure
δ	Chemische Verschiebung
γ -ATP	am γ -Phosphat mit ^{32}P markiertes ATP
λ	Wellenlänge
ω_i	Resonanzfrequenz des Kerns i
ϕ	Dihedralwinkel
ϕ_i, ψ_i	Winkel des Proteinrückgrats der Aminosäure i
τ	jump & return-Delay
τ_m	Mischzeit
$\varepsilon_{X,260}$	molarer Extinktionskoeffizient der Substanz X bei einer Wellenlänge von 260 nm
${}^nJ_{ab}$	skalare Kopplungskonstante über n Bindungen zwischen den Kernen a und b
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , das gemeine Darmbakterium
Å	Ångström
A	Adenin
Ala, A	L-Alanin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> Zelllinie
bp	<i>branch point</i> ; Verzweigungspunkt
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
BT1, BT2	Membranen für die Elektroelutionskammer
C	Cytosin
CD	Circular Dichroismus
CGI	<i>common gateway interface</i>
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>

cvff	<i>common valence force field</i>
D	<i>lateinisch</i> dextro, rechts
D-Leu, DLE, l	D-Leucin
D-Val, DVA, v	D-Valin
dATP	2'-Deoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Deoxycytidin-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
dGTP	2'-Deoxyguanosin-5'-triphosphat
DIEA, DIPEA	Di- <i>iso</i> -propyl-ethylamin
DMPC	1,2-Di-myristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> ; Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynucleosidtriphosphate
DOPC	1,2-Di-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
DPPC	1,2-Di-palmitoleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin
DQF	Doppelquantenfilter
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Deoxythymidin-5'-triphosphat
E	Enzym
E _a	Energie von a
Eco RI, Hind III, Pst I	Restriktionsendonukleasen
EDC	Ethyl-dimethylaminopropyl-carbodiimid-hydrochlorid
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EM	<i>exponential multiplication</i> ; Multiplikation mit der e-Funktion
EPSP	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-propansulfonsäure
ETA	Ethanolamin
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
G	Guanin
G15, G25, G50	Sephadex-Säulenmaterial mit verschiedener Porengröße
gA	Gramicidin A
Gly	L-Glycin
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ^N	Amidproton

H _α	α-Proton einer Aminosäure
HATU	(1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol)yl-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	(1-Hydroxy-benzotriazol)yl-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HDV	Hepatitis Delta Virus-Ribozym
HH	<i>hammerhead</i> -Ribozym
HIV	<i>human immune deficiency virus</i>
hnRNP	<i>heterogenous nuclear Ribonucleoprotein</i>
HOAt	1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol
HOBt	1-Hydroxy-benzotriazol-hydrat
IP-RP	<i>ion pair reversed phase</i>
IPP	<i>inorganic phosphatase</i> ; Anorganische Phosphatase
J&R	<i>jump and return</i>
K	Grad Kelvin
K _a	Kopplungskonstante für vereinfachte Karplus-Gleichungen
k _a	Kraftkonstante für Parameter a
K11, T3, T4, T7, SP6	Verschiedene Bakteriophagenstämme
KcsA	K ⁺ <i>shaker channel A</i>
kDA	Kilodalton
L	<i>lateinisch</i> laevus, links
LB	Luria-Bertani Medium
lb	<i>line broadening</i> , Parameter für die Multiplikation der e-Funktion
LSm	<i>Like Sm</i> , siehe Sm
MD	<i>molecular dynamics</i> ; Molekulardynamik
MeOH	Methanol
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i> ; Boten-RNA
N	Beliebige Base
NaAc	Natriumacetat
NEB	New England Biolabs
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> ; Kernspinresonanz
NOE	<i>nuclear overhauser enhancement</i> , Abstands- <i>restraint</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
NS	<i>number of scans</i> ; Anzahl der Aufnahmen pro Inkrement
nt	Nukleotid
NTP	Nucleosidtriphosphat
OD ²⁶⁰	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm

OMe	Methoxy
P	Promotorregion der Templat-DNA
P1, P2	Reaktionsprodukte 1, 2
P1-P3	Basengepaarte Abschnitte im HH-Ribozym
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>protein data bank</i> ; Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglykol
PP	Polypropylen
ppm	<i>parts per million</i>
ps	Picosekunden
pUC19	<i>plasmid University of California</i> , Klonierungsvektor
QSINE	<i>quadratic cosine function</i> ; quadratische Kosinusfunktion
R	Purinbasen
R	T7-RNA-Polymerase
rmsd	<i>root mean square deviation</i> ; mittlere quadratische Abweichung
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> ; Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNAP	RNA-Polymerase
ROE	<i>rotating frame overhauser enhancement</i> ; Abstands- <i>restraint</i>
ROESY	<i>Rotating Frame Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
RP _c	RNAP- <i>Promoter-closed</i> ; geschlossener Komplex
RP _i	RNAP- <i>Promoter-initiation</i> ; Initiator Komplex
rpm	<i>rotations per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RP _o	RNAP- <i>Promoter-open</i> ; offener Komplex
RP _t	RNAP- <i>Promoter-transcription</i> ; Transkriptionskomplex
S	Substrat
s	Sekunde
S _N 2	<i>substitution nucleophilic bimolecular</i> ; Bimolekulare nukleophile Substitution
SA	<i>simulated annealing</i>
SDS	<i>sodium dodecyl-sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SI	<i>size</i> ; Prozessierte Punkte (real)
Sm	Stephanie Smith, Spenderin des Serums in dem die Sm-Proteine zuerst gefunden wurden
snRNA	<i>small nuclear RNA</i> ; kleine Kern-RNA
snRNP	<i>small nuclear Ribonucleoprotein</i> , „snurp“
SS	<i>splice site</i> ; Spleißstelle

SSB	<i>sine bell shift</i> , Prozessierungsparameter von QSINE
SUC	Succinat, Bernsteinsäure
SWH	Spektrale Weite in Hertz
T	Temperatur
T	Thymin
TBDPS	<i>tert</i> -Butyl-diphenylsilyl
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TD	<i>time domain</i> ; Aufgenommene Punkte (real)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Thr	L-Threonin
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
TPPI	<i>time proportional phase incrementation</i>
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TROSY	<i>Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy</i>
Trp, W	L-Tryptophan
Tyr	L-Tyrosin
U	Uracil
U	<i>unit</i> , Einheit
U1, U2, U4, U5, U6	Uridinreiche spleißosomale RNAs
U2AF	<i>U2-snRNP auxiliary factor</i>
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen Verhältnis einer Mischung in %
Val, V	L-Valin
W	Watt
W1, W2	Angewandte Prozessierungsfunktion in der jeweiligen Dimension
X	3'-Ende einer RNA-Oligonukleotidkette
X	Pyrimidinbase, U oder C
Xxx	Beliebige L-Aminosäure
Y	Pyrimidinbasen
YT	<i>Yeast Tryptone</i> Medium
YYYY...	Polypyrimidintrakt
Z	5'-Ende einer RNA-Oligonukleotidkette
Z	Benzyloxycarbonyl

1 Einleitung

Für das Verständnis der Wirkungsweise von großen molekularen Maschinen wie z.B. des Ribosoms [1] oder von Ionenkanälen [2, 3], aber auch kleinen biologisch aktiven Verbindungen, ist eine dreidimensionale Struktur in atomarer Auflösung die Voraussetzung.

Zum Erreichen dieses Zieles werden verschiedene Techniken mit unterschiedlichen Auflösungen eingesetzt. Die Kryoelektronenmikroskopie liefert Auflösungen von bis zu 9 Å, während die NMR-Spektroskopie und die Röntgenstrukturanalyse atomar im Bereich von 1–4 Å auflösen.

Für die Röntgenstrukturanalyse werden Kristalle benötigt, deren Gewinnung oftmals mit Schwierigkeiten verbunden ist. Die ermittelte Struktur kann durch verschiedene Faktoren wie z.B. Kristallpackungseffekte gestört sein und die Dynamik des Moleküls nur eingeschränkt wiedergeben. Die Kernresonanzspektroskopie bietet hingegen die Möglichkeit, die Biomoleküle in annähernd natürlicher Umgebung (wässrige Lösung, physiologischer pH-Wert, Salzgehalt, Temperatur) in Lösung oder bei der Festkörper-NMR-Spektroskopie in amorpher, nichtkristalliner Form z.B. in Lipiddoppelschichten zu charakterisieren.

Die mit beiden Techniken erhaltenen Molekülstrukturen können zur Auflösung der strukturellen Details von mit schlechterer Auflösung bestimmten Molekülkomplexen (z.B. mit Kryoelektronenmikroskopie) wie z.B. im Falle des Ribosoms oder des Spleißosoms dienen [1, 4, 5].

Mit Hilfe der Röntgenbeugung konnten auch Strukturen von sehr großen Multi-Proteinkomplexen wie z.B. dem Ribosom atomar aufgelöst werden [1, 6–8]. Hier ist die NMR-Spektroskopie durch Linienverbreiterungen und zunehmende Überlagerung der Signale in ihren Möglichkeiten beschränkt. Durch fortlaufende Verbesserung der Messtechnik (TROSY [9, 10]) und der Probenpräparation (Perdeuterierung von Proteinen und Oligonukleotiden [11]) konnte in den vergangenen Jahren die Grenze bezüglich der Molekülgröße nach oben verschoben werden. Die Strukturermittlung von Molekülen bis zu einer Größe von ca. 30–40 kDa gelingt routinemäßig. In Ausnahmefällen wurden auch größere Proteine von 50 kDa und sogar 110 kDa NMR-spektroskopisch charakterisiert [9].

Die NMR-Spektroskopie erlaubt es mit Hilfe verschiedener Experimente Abstands- und Winkelinformationen der untersuchten Moleküle zu bestimmen. Diese Informationen geben Auskunft über die Konstitution, Konformation und relative Konfigura-

tion. Hierbei werden Abstandsinformationen zwischen Protonen aus NOESY- bzw. ROESY-Spektren gewonnen. Informationen über Dihedralwinkel liefern Kopplungskonstanten, während neuere Experimente die Relaxationsraten der Kreuzkorrelation zwischen zwei Bindungsvektoren nutzen, um die Projektionswinkel zwischen ihnen zu bestimmen [12].

Mit Hilfe von dipolaren Kopplungen kann die Reichweiten-Beschränkung von Abstandsinformationen auf ca. 5 Å bei der Aufnahme von NOESY-Spektren aufgehoben werden. Zusätzlich erlauben die Messungen in verschiedenen Orientierungsmedien die Ermittlung von Parametern, die etwas über die Dynamik innerhalb des Moleküls aussagen [13, 14].

Die aus den NMR-Experimenten erhaltenen Information werden in Moleküldynamikrechnungen zur Berechnung der dreidimensionalen Struktur verwendet. Durch geschickte Kombination der gewonnenen Informationen konnte die Auflösung der berechneten Strukturen bzw. die Geschwindigkeit ihrer Ermittlung verbessert werden [15].

Die NMR-Spektroskopie erlaubt zusätzlich die Verfolgung entsprechend langsamer chemischer Reaktionen und Konformationsumwandlungen *in vitro*. Hierbei können simultan durch geeignete Titrationsexperimente auch weitere Parameter wie Bindungs- und Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten bestimmt werden [16].

Die Bewältigung synthetischer Fragestellungen mit biochemischen Methoden sowie die Strukturaufklärung wichtiger, biologisch aktiver und zum Aufbau von molekularen Regeleinheiten geeigneter Moleküle wird in dieser Arbeit beschrieben.

In Kapitel 2 wird die biochemische Synthese des Kernbereichs der spleißosomalen U4/U6-RNA im menschlichen Spleißosom und ihre Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie erläutert. Die Herstellung des Y-förmigen, basengepaarten Kernkomplexes stellt einen wichtigen Schritt bei der Aufklärung der Struktur und des Mechanismus des Spleißens dar. Es wird die erfolgreiche Synthese von nicht-isotopenmarkierter, homogener RNA auf Basis biochemischer Methoden von synthetischer doppelsträngiger Templat-DNA (Abschnitt 2.7.1 auf Seite 39), von plasmidischer Templat-DNA (Abschnitt 2.7.6 auf Seite 77), unter Verwendung eines besonderen T7-Promotors (Abschnitt 2.7.7 auf Seite 86) und durch chemische Synthese (Abschnitt 2.8 auf Seite 95)

beschrieben. Anschließend werden die strukturellen Gemeinsamkeiten der synthetisierten RNAs mit Hilfe von homonuklearen NMR-Experimenten vorgestellt (Abschnitt 2.9 auf Seite 98).

Im Rahmen des Projektes „Conformational control of biomolecular functions“ der Volkswagen-Stiftung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Hans-Dieter Arndt aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Koert an der Humboldt-Universität zu Berlin die dreidimensionale Struktur eines neuartigen künstlichen Ionenkanals bestimmt. In Kapitel 3 werden die durchgeführten NMR-Experimente und ihre Auswertung zur Strukturaufklärung des sogenannten Minigramicidins erklärt. Das Minigramicidin besteht aus zwei miteinander über einen Bernsteinsäure-Linker verknüpften, um vier Aminosäure verkürzten Gramacidin A-Sequenzen. Die Strukturen von Minigramicidin wurden in zwei unterschiedlichen Umgebungen bestimmt: in Benzol/Aceton (10:1, v/v) ohne Zusatz von Kationen und in gesättigter Cäsiumchlorid-Chloroform/Methanol (3:1, v/v)-Lösung. Es wurden aus homonuklearen zweidimensionalen NMR-Spektren Abstandsinformationen und Dihedralwinkel aus Kopplungskonstanten zur erfolgreichen Strukturrechnung verwendet.

In Kapitel 4 sind die Ergebnisse der Bestimmung der Konformationen eines gekoppelten bikonformationellen Schalters vor und nach dem irreversiblen Schaltvorgang zusammengestellt. Der von Dr. Michael Karle aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Koert in Marburg synthetisierte molekulare Schalter besteht aus zwei miteinander gekoppelten *cis*-Dekalingerüsten, die jeweils zwei Konformationen bilden können. Die Kopplung dieser beiden Einheiten über einen 14-gliedrigen Bislactamring in stereochemisch eindeutiger Weise bildet den Ausgangszustand vor dem Schalten. Der eigentliche Schaltprozeß wird durch Lösen einer konformativen Klammer des Grundzustandes ausgelöst. Die Konformationen der Schaltzustände (an/aus) konnte mit Hilfe von Kopplungskonstanten und Abstandsinformationen aus ROESY-Spektren eindeutig bestimmt werden und so den Schaltvorgang verifizieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden in Kapitel 5 zusammengefaßt. Die experimentellen Details der biochemischen Synthesen wie auch der durchgeführten NMR-Experimente und Strukturrechnungen sind in Kapitel 6 beschrieben.

2 Synthese einer spleißosomalen U4/U6-RNA

Die biochemische Synthese des Kernbereichs der spleißosomalen U4/U6-RNA im menschlichen Spleißosom und ihre Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie bildet den Schwerpunkt dieses Kapitels. Die U4/U6-Wechselwirkung wird im Laufe der Aktivierung des Spleißosoms aufgebrochen und durch die U2/U6-Wechselwirkung ersetzt, so daß das Spleißen ablaufen kann. Die Herstellung des Y-förmigen, basengepaarten Kernkomplexes stellt einen wichtigen Schritt bei der Aufklärung der Struktur und des Mechanismus des Spleißens dar.

2.1 Einführung

Bei der Übersetzung der genetischen Information von der DNA ist die RNA ein wichtiger Zwischenschritt in der Expression der Gene. Die RNA dient dabei nicht nur als „Zwischenspeicher“ in Form von mRNA (mRNA, *messenger RNA*), sondern greift als katalytisch aktive Komponente in viele regulatorische Abläufe der Genexpression ein. So wird das katalytisch aktive Zentrum des Ribosoms von RNA gebildet [8, 17]. Ebenso spielt RNA eine große Rolle beim Aktivieren/Deaktivieren von Genen mittels der sogenannten RNA-Interferenz (RNAi) [18–21]. In Pflanzen und einzelligen Lebewesen ist die auto-katalytische Aktivität innerhalb der mRNA zum Herausschneiden von nichtkodierenden Sequenzen (Introns) bekannt [22–25].

Die Genexpression bei Pro- und Eukaryonten verläuft sehr unterschiedlich. Prokaryonten transkribieren die DNA direkt in mRNA, die dann weiter vom Ribosom in Proteinsequenzen übersetzt wird (Translation) (Abb. 2.1 auf der nächsten Seite, links).

Eukaryonten schlagen hingegen einen zweistufigen Weg ein. In den Genen gibt es lange Sequenzen von Basen, die nicht für Proteine kodieren, die sogenannten Introns. Die Genabschnitte, die für Proteine kodieren – die Exons – liegen dazwischen. Um die endgültige mRNA zu erhalten, müssen die Exons miteinander verbunden werden, während die Introns herausgeschnitten werden.

Zuerst wird die gesamte DNA aus Introns und Exons in die sogenannte prä-mRNA transkribiert. Anschließend werden die Introns herausgeschnitten und die Exons miteinander zu der fertigen mRNA verbunden. In Analogie zur Verknüpfung der Enden eines durchtrennten Seils wird dies als Spleißen bezeichnet. Richard J. Roberts und Phillip A. Sharp konnten 1977 durch Hybridisierungsexperimente zwischen vollständig

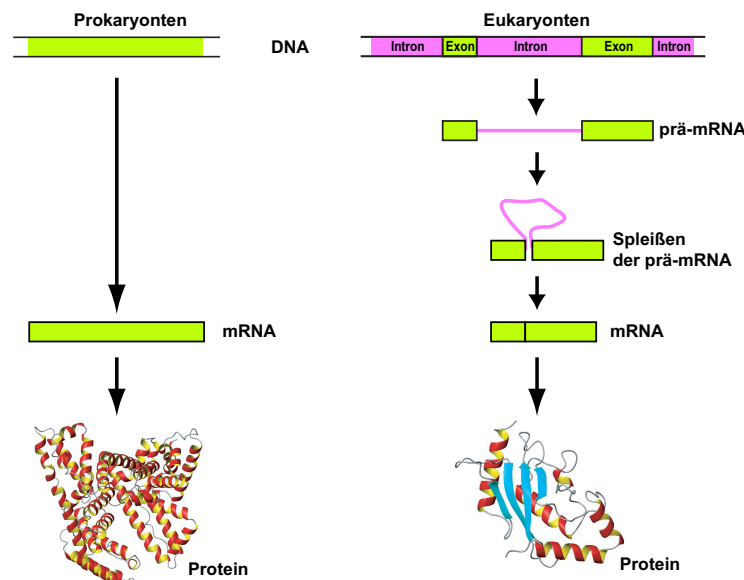


Abbildung 2.1: Unterschiede in der Expression der genetischen Information bei Bakterien (links) und höheren Organismen (rechts).

prozessierter mRNA und der ursprünglichen DNA zeigen, welche Abschnitte tatsächlich für die Proteine kodieren [26]. Die mRNA wird schließlich im Cytoplasma durch das Ribosom in Proteinsequenzen translatiert (Abb. 2.1 rechts).

Über das Spleißen hat die Zelle die Möglichkeit, verschiedene Isoformen des gleichen Proteins z.B. in Abhängigkeit vom Zelltyp zu exprimieren, indem die Anzahl der Exons variiert wird (sogenanntes alternatives Spleißen) [27, 28]. Zudem sind prinzipiell auch Kombinationen von Exons aus verschiedenen Genen möglich. Dieses *trans*-Spleißen findet man z.B. in Trypanosomen.

2.2 Das Spleißosom

Ähnlich dem Ribosom bei der Translation wird das Spleißen durch Zusammenwirken von mehreren RNA-Protein-Komplexen durchgeführt. Man spricht auch vom Spleißosom [29], einem dynamischen Komplex wechselnder Zusammensetzung, der den Spleißvorgang ausführt. Das Spleißen findet im Zellkern statt. Dort existieren Regionen, die sogenannten Speckles und Cajal-Körper, die reich an Spleißfaktoren sind [30–33]. Während der Prozessierung der prä-mRNA wird der schon fertige Teil der mRNA weiter

modifiziert und in das Cytoplasma exportiert [34]. In den folgenden Abschnitten werden die Spleißreaktion und Zusammensetzung des Spleißosoms beschrieben.

2.2.1 Spleißen als chemische Reaktion

In Säugetieren findet man hauptsächlich das sogenannte *cis*-Spleißen; das heißt die Exon- und Intronsequenzen stammen aus der gleichen prä-mRNA. In bestimmten Lebewesen findet man auch das *trans*-Spleißen. Hier werden Exons aus verschiedenen prä-mRNAs miteinander verknüpft. Im folgenden wird kurz das Prinzip des *cis*-Spleißens erläutert [22, 35, 36].

Man kann die Spleißreaktion in zwei Schritte unterteilen (Abb. 2.2 auf der nächsten Seite, **A**): Im ersten Schritt wird die Phosphatbindung an der 5'-Spleißstelle von der 2'-OH-Gruppe des Adenosins aus dem Verzweigungspunkt bp (bp, *branch point*) attackiert und das Exon1 als Intermediat mit einer freien 3'-OH-Gruppe freigesetzt. Im gleichen Schritt wird das 5'-Ende des Introns über eine 2',5'-Phosphodiesterbindung an das Adenosin des Verzweigungspunktes als Lariat gebunden.

Im zweiten Schritt wird das Intronlariat freigesetzt und die beiden Exons über eine 3',5'-Phosphodiesterbindung verknüpft.

Obwohl die Hydrolyse von ATP für das Herausschneiden der Intronsequenz essentiell ist, findet man in den Spleißprodukten keine Phosphate aus exogenem ATP. So werden die Phosphate der Spleißstellen konserviert.

Die beiden Reaktionsschritte der Umesterungen laufen nach einem „*in-line*“ S_N2 -Mechanismus ab, wie durch Verwendung von in RNA eingebauten chiralen Phosphothioat-Analoga gezeigt werden konnte (Abb. 2.2 auf der nächsten Seite, **B**) [35]. Eine essentielle Rolle spielen dabei Magnesiumionen [38–44].

Im ersten Schritt erfolgt ein nukleophiler Angriff der 2'-OH-Gruppe vom Adenosin aus der Verzweigungsstelle in der Intronsequenz auf das Phosphat an der 5'-Spleißstelle (Abb. 2.2 auf der nächsten Seite, **B** oben links). Hierdurch wird der 3'-Sauerstoff des 5'-Exons über einen fünffachkoordinierten Übergangszustand ersetzt. Im zweiten Schritt greift die 3'-OH-Gruppe, die im ersten Schritt Abgangsgruppe war, nun als Nukleophil am 3'-Phosphat des 3'-Exons an und verbindet so die beiden Exons.

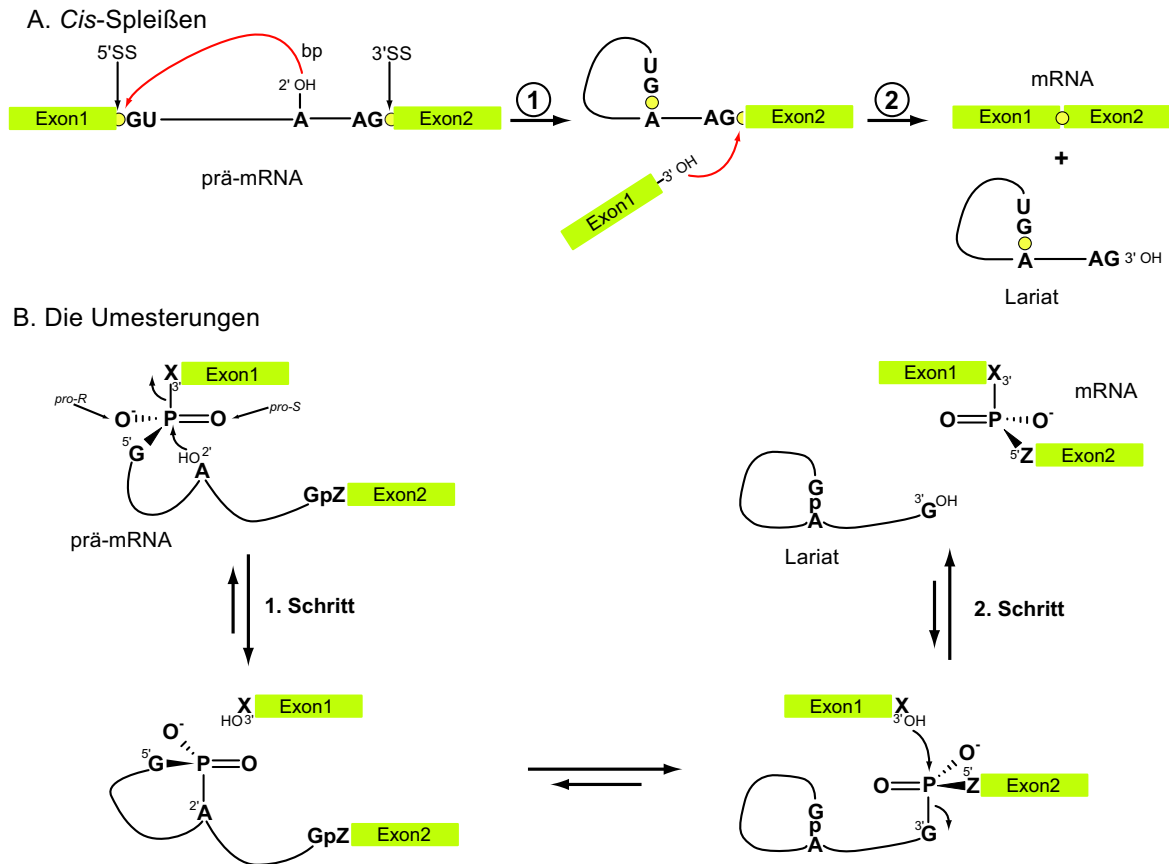


Abbildung 2.2: A. Prinzip des *cis*-Spleißens innerhalb einer prä-mRNA. Im 1. Schritt attackiert das Adenosin des Verzweigungspunktes bp mit seiner 2'-OH-Gruppe die Phosphatbindung (gelber Kreis) an der 5'-Spleißstelle (5'SS). Es bildet sich das Lariat und das freie Exon1. Dieses greift dann im 2. Schritt mit seiner 3'-OH-Gruppe die Phosphatgruppe an der 3'-Spleißstelle (3'SS) des Introns an und verknüpft so die beiden Exons zur fertigen mRNA. Das Intron-Lariat wird freigesetzt. B. Details der beiden Umesterungsreaktionen mit der Stereochemie der beteiligten Phosphoratome. Ein kleines **p** kennzeichnet hier die Phosphatgruppe im Lariat. Modifiziert nach [35–37].

Der Ablauf ist stark verwandt mit dem Selbstspleißen von Gruppe-I- und Gruppe-II-Introns. Bei diesen bildet RNA das katalytische Zentrum unter essentieller Mitwirkung von Magnesium-Ionen [23, 25, 45–47]. Die Selbstspleißreaktion der Gruppe-II-Introns ergibt die gleichen Zwischen- und Endprodukte. Es spricht also viel für eine RNA-katalysierte Spleißreaktion im Spleißosom, auch wenn bis heute kein direkter Beweis durch atomar aufgelöste Strukturen dafür erbracht werden konnte.

2.2.2 Definition der Spleißstellen in der prä-mRNA

Um das Intron präzise auszuschneiden, müssen die 3′-, 5′-Spleißstellen und die Verzweigungsstelle bp mit dem aktiven Adenosin von der Spleißmaschinerie erkannt werden. Durch genetische Analyse einer Vielzahl von Intronsequenzen konnten die Konsenssequenzen für die Abschnitte bestimmt werden. Man unterscheidet dabei zwischen U12- und U2-abhängigen Erkennungssequenzen. U12- und U2-Introns werden über unterschiedliche Spleißmaschinen mit verschiedenen RNA und Proteinbestandteilen enthalten, prozessiert [35, 37, 48]. Es gibt deutlich mehr U2- als U12-Introns. Daneben gibt es auch Spleißvorgänge, die sowohl U2 als auch U12 benötigen [49].

Der hauptsächlich stattfindende Spleißvorgang basiert auf U2-Introns (Abb. 2.3). Hierbei wird die 5′-Spleißstelle durch GU, die 3′-Spleißstelle durch AG und die Verzweigungsstelle durch ein Adenosin als prominenteste Nucleotide neben anderen markiert. Neben diesen besonders prominenten Nucleotiden spielt auch der Polypyrimidintrakt zwischen der Verzweigungsstelle und der 3′-Spleißstelle eine wichtige Rolle.

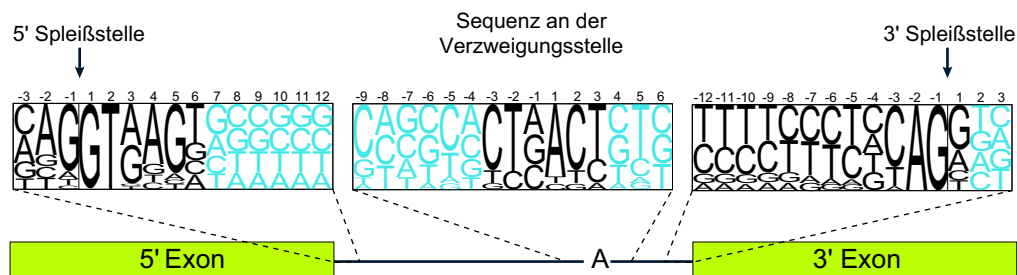


Abbildung 2.3: Konsenssequenzen für die Erkennung der Spleißstellen in U2-Introns. Von links nach rechts sind die Sequenzen der 5′-Stelle, der Verzweigungssequenz und der 3′-Stelle gezeigt. Die Höhe der Buchstaben gibt die Häufigkeit innerhalb der analysierten DNA-Intronsequenzen an. Die Positionen, die an der Erkennung beteiligt sind schwarz, die anderen blau markiert. Modifiziert nach [35, 37].

2.2.3 Zusammensetzung des Spleißosoms: snRNPs

Nach der Entdeckung des Spleißosoms als sedimentierendes Partikel [29] erfolgte über die letzten 20 Jahre eine detaillierte Untersuchung der Zusammensetzung. Dabei wurden parallel die Spleißosome von Hefe und Säugetieren untersucht, die U2-Introns spleißen. Der Spleißvorgang ist in beiden Fällen sehr ähnlich.

Anfängliche Ergebnisse ergaben eine Zusammensetzung aus fünf relativ kleinen, uridinreichen, im Zellkern lokalisierten RNAs (60 - 300 Nukleotide, auch als snRNAs bezeichnet (snRNA, *small nuclear RNA*)) als U1, U2, U4, U5 und U6 bezeichnet, im Komplex mit ca. 60 Proteinen [50]. Durch verfeinerte Methoden und mildere Isolationsbedingungen konnten immer mehr Bestandteile entdeckt werden. So erhöhte sich die Anzahl der mit dem Spleißosom assoziierten Proteine auf ca. 100 [35, 51]. Heute spricht man von ca. 200 Proteinen im Falle des menschlichen Spleißosoms [52–55]. Die Anzahl der bekannten RNA-Bestandteile ist konstant geblieben.

Die RNAs im Spleißosom liegen in Form von Komplexen mit Proteinen vor, sogenannten snRNPs (snRNP, *small nuclear ribonucleoprotein*, als „snurp“ bezeichnet). Zusammensetzung und Struktur dieser Komplexe sind in den letzten Jahren mit Hilfe von Kryoelektronenmikroskopie und massenspektrometrischen Methoden teilweise bestimmt worden.

Die Biogenese der snRNPs von U1, U2, U4 und U5 unterscheidet sich nur wenig. Die vier RNAs werden von Polymerase II transkribiert und am 5'- und 3'-Ende modifiziert. Diese prä-U-snRNAs werden ins Cytoplasma exportiert und dort zu funktionalen snRNPs zusammgebaut. Hierbei werden die Sm-Proteine gebunden, das 5'-Ende zu 2,2,7-Trimethylguanin modifiziert und das 3'-Ende gekürzt [56–61]. Schließlich werden diese snRNPs wieder in den Zellkern für den Spleißvorgang reimportiert [62–64].

Die U6-RNA wird hingegen von RNA-Polymerase III transkribiert und verbleibt im Zellkern. U6-snRNA rekrutiert aus dem Cytoplasma LSm-Proteine (LSm, *like Sm*), die ähnlich wie die Sm-Proteine gebunden werden [65]. Die Strukturen der Sm und LSm-Proteine konnten mittlerweile durch Röntgenkristallographie gelöst werden [66].

U1, U2 und U5 bilden separate snRNPs, während U4 und U6 über Basenpaarungen miteinander verbunden sind und einen gemeinsamen snRNP bilden. Allerdings lagert sich dieser mit dem U5-snRNP zu einem Komplex aus drei RNAs zusammen, zum sogenannten U4/U6·U5-tri-snRNP. Dieser spielt eine wichtige Rolle beim Spleißen [67–71].

Das Spleißosom, welches U12-Introns prozessiert, hat eine ähnliche Zusammensetzung. Allerdings unterscheiden sich die RNA-Sequenzen zum Teil deutlich von denen des U2-Spleißosoms. Diese werden als U11, U12, U4atac und U6atac bezeichnet [36]. Die U5-snRNA ist in beiden Spleißosomen vorhanden. Außerdem scheint in manchen Fällen eine Kombination aus U2- und U12-spleißosomalen RNAs nötig zu sein [49].

2.2.4 Sekundärstrukturen der snRNAs in den snRNPs

Jede snRNA weist eine ausgeprägte Sekundärstruktur in ihrem jeweiligen snRNP auf, wie durch Crosslinking-Experimente gezeigt werden konnte. Die Strukturen sind zum Teil über verschiedene Spezies konserviert und deuten auf einen ähnlichen Ablauf des Spleißens in verschiedenen Organismen hin. Die Sekundärstrukturen der humanen U1, U2, U5 und U4/U6 sind in der folgenden Abbildung (Abb. 2.4 auf der nächsten Seite) zusammengefaßt [37, 72, 73].

2.2.5 Der U4/U6-Komplex: U4 als Inhibitor der U6

Die Basenpaarungen zwischen U4 und U6 sind z.T. bei verschiedenen Spezies stark konserviert und durch zahlreiche Crosslinking-Experimente verifiziert [74–79]. Die Kernregion in diesem Komplex bildet eine Y-förmige Struktur, bestehend aus drei basengepaarten Stämmen. Die Y-förmige Struktur des Komplexes konnte über Kryoelektronenmikroskopie bestimmt werden [79]. Es existiert bisher jedoch keine atomar aufgelöste Struktur, die die genaue Anordnung der Arme zueinander beschreibt. Neben dieser Y-förmigen Struktur konnten auch spezifische RNA-Protein-Wechselwirkungen nachgewiesen werden, die insbesondere zu einer modifizierten Sekundärstruktur des U4 5'- Stamm-Schleife-Stamm-Motivs führten [80, 81] (Abb. 2.5).

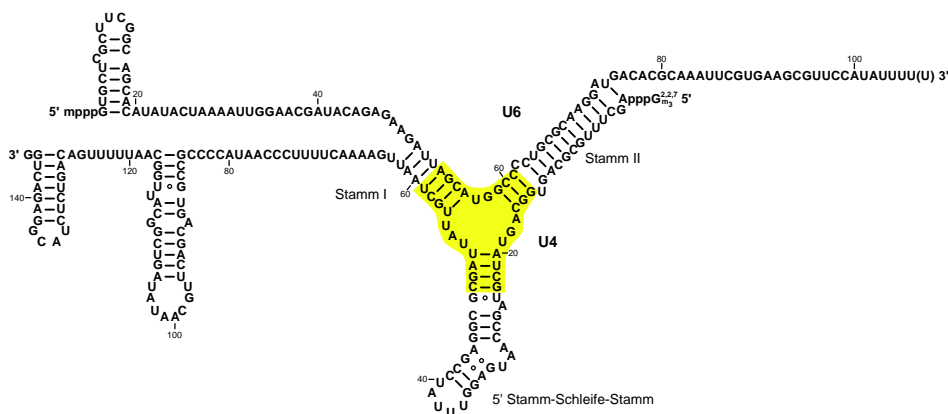


Abbildung 2.5: Die Basenpaarung zwischen den beiden spleißosomalen RNAs U4 und U6. Gelb unterlegt ist die Kernregion, die eine Y-förmige Verzweigung bildet (Y-junction). Modifiziert nach [72].

U4 und U6 kommen in einem gemeinsamen RNA-Protein-Komplex vor, welcher in Cajal-Körpern im Zellkern gespeichert wird [32]. Im Verlauf des Zusammenbaus des Spleißosoms wird mit dem U5-snRNA der sogenannte tri-snRNP Komplex U4/U6·U5 gebildet. Dieser wird komplett in das Spleißosom eingebaut, wie Isolierungsexperimente zeigen konnten [72, 82–87]. Im weiteren Verlauf der Aktivierung des Spleißosoms wird die U4-U6-Wechselwirkung unter ATP-Verbrauch und mit Hilfe von RNA-Helicasen [88, 89] aufgebrochen und durch eine U2-U6-Wechselwirkung ersetzt, die den eigentlichen Spleißprozeß ermöglicht (Abb. 2.6) [72]. Die U4-snRNA wirkt im Prinzip als Inhibitor der U6-snRNA, um eine zu frühe Aktivierung des Spleißens zu verhindern.

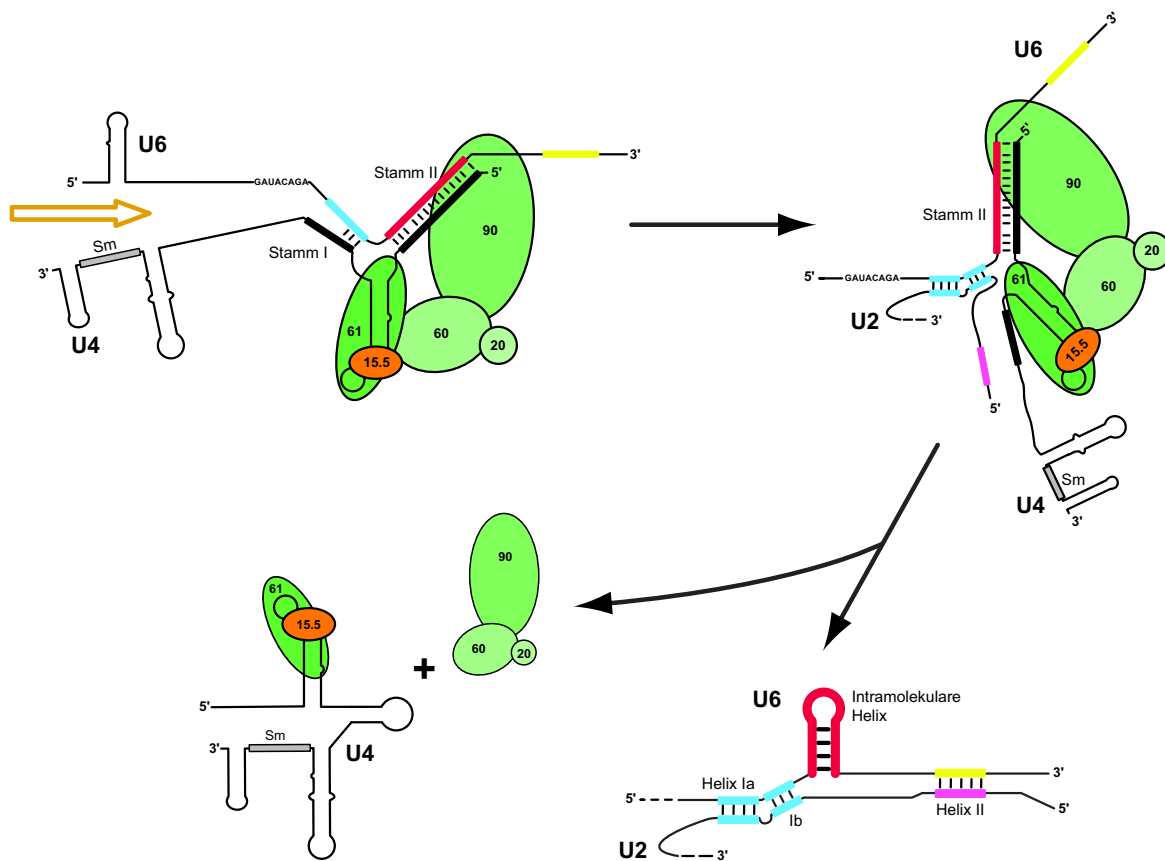


Abbildung 2.6: Im Zuge der Aktivierung des Spleißosoms wird die Wechselwirkung zwischen U4 und U6 aufgebrochen. Es bildet sich der katalytisch aktive U2/U6-Komplex. Die Zahlen kennzeichnen das Molekulargewicht der mit den RNAs assoziierten Proteine in kDa. RNA-Bereiche die in den U4/U6 bzw. U2/U6-Komplex Basenpaarungen aufweisen sind farblich markiert. Modifiziert nach [72].

2.2.6 Der Spleißosom-Kreislauf

Durch native Gelelektrophorese konnten aus kultivierten Hefezellen-Spleißosomen drei verschiedene Spleißkomplexe, die zu verschiedenen Zeitpunkten des Spleißprozesses auftreten, isoliert werden [90]. Im Laufe der Zeit wurden weitere Zwischenstufen aus *in vitro* durchgeführten Spleißversuchen isoliert. Daraus kann man einen geordneten Kreislauf für den Zusammenbau des Spleißosoms *in vitro* konstruieren [26, 35].

Durch mildere Isolationstechniken ergibt sich aber mittlerweile ein anderes Bild. So konnte man komplette Spleißosome isolieren, die alle snRNAs enthalten und prinzipiell die Voraussetzungen erfüllen, um prä-mRNA zu spleißen [91–95].

Die Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen U-snRNPs und der prä-mRNA und die verschiedenen Schritte des Spleißvorganges im Spleißosom werden im folgenden in Form eines Kreislaufs beschrieben (Abb. 2.7 auf der nächsten Seite) [35, 37, 90, 96–104].

Die im Zellkern nach der Transkription vorliegenden prä-mRNA ist an eine Vielzahl von hnRNP-Proteinen (hnRNP, *heterogenous nuclear ribonucleoprotein*) gebunden. Die Rolle der hnRNP-Proteine beim Spleißprozeß ist noch weitgehend ungeklärt.

Im ersten Schritt der Rekrutierung der prä-mRNA zum Spleißen wird Komplex E gebildet, in dem U1-snRNP [103] zusammen mit den Spleißfaktoren U2AF65 und U2AF35 (U2AF, *U2-snRNP auxiliary factor*) an die 5'-Spleißstelle bzw. den Polypyrimidintrakt und 3'-Spleißstelle bindet.

Im nächsten Schritt lagert sich der U2-snRNP-Komplex [4, 105] an. Hierbei wird eine spezifische Basenpaarung mit der prä-mRNA um den Verzweigungspunkt mit dem aktiven Adenosin eingegangen (Komplex A). Das Adenosin ist allerdings nicht basen-gepaart. Wichtig für die Anlagerung ist die Wechselwirkung zwischen den U1-snRNP und U2-snRNP. Der U1-snRNP-Partikel bereitet die prä-mRNA für die Bindung des U2-snRNPs vor.

Nachfolgend wird der U4/U6·U5-tri-snRNP-Komplex eingebunden. Hierbei spielt im Hefe-Spleißosom Prp8 bzw. das homologe p220-Protein im Menschen eine entscheidende Rolle, um die snRNPs im Komplex B richtig zueinander zu orientieren [101, 106].

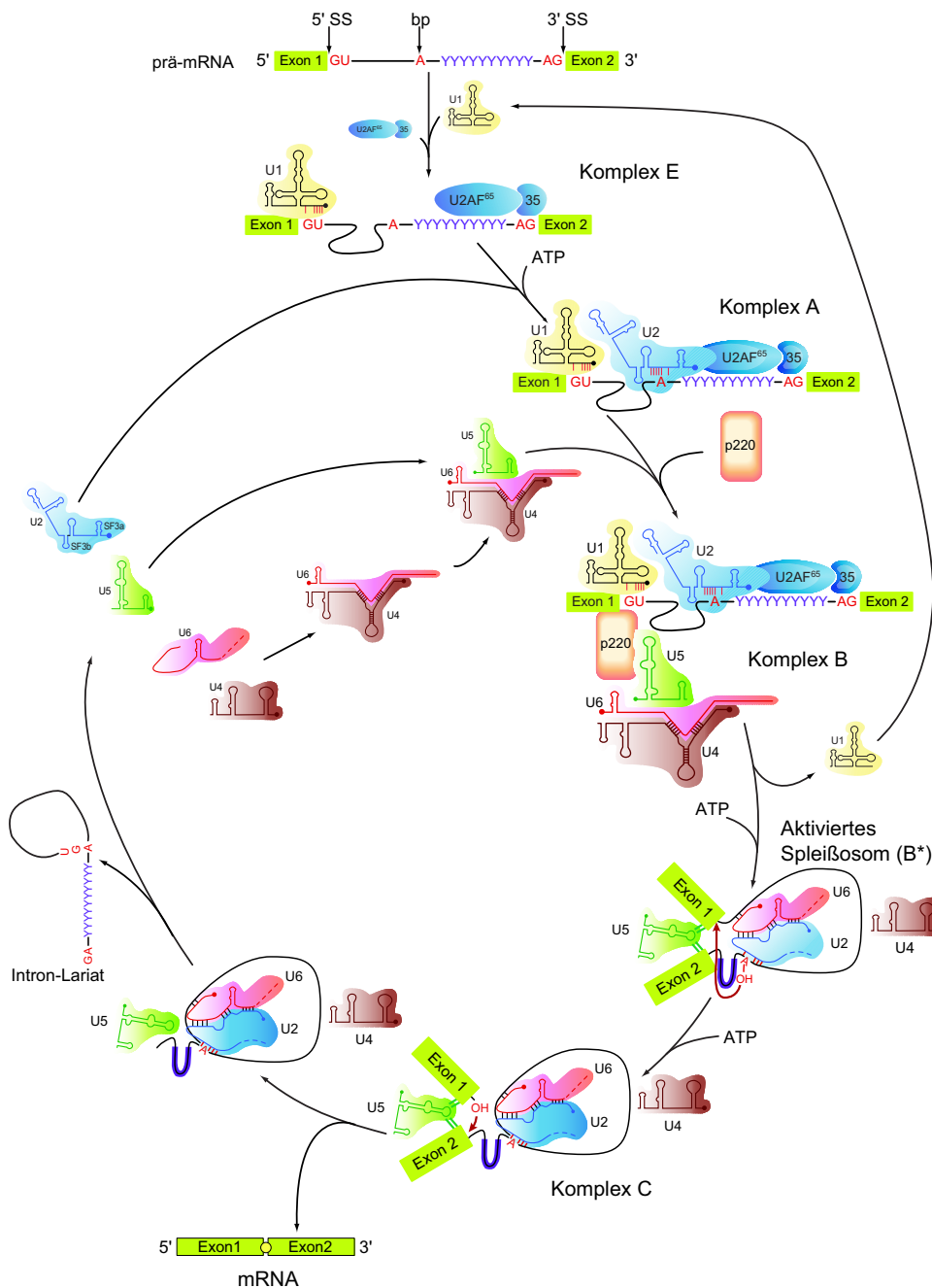


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Wechselwirkung der verschiedenen U-snRNPs während des Spleißens von humaner prä-mRNA. Neben den snRNPs sind noch weitere Proteinfaktoren am Spleißprozeß beteiligt, wurden aber der Übersichtlichkeit halber weggelassen. Prä-mRNA (oben) wird über diverse snRNP-Partikel gebunden und verläßt das Spleißosom als fertige mRNA und als Intron-Lariat (unten und linke Seite). Die verschiedenen, isolierbaren Zwischenzustände beim Spleißern werden als Komplex A, B, B* und C bezeichnet. 5'-SS, 3'-SS, bp und YYYYY... kennzeichnen die 5'- bzw. 3'-Spleißstelle, den Verzweigungspunkt (bp, branch point) und den Polypyrimidintrakt, die für die Erkennung der Spleißstellen wichtig sind. Die jeweiligen U-snRNPs sind mit U1, U2, U4, U5 und U6 bezeichnet. Modifiziert nach [26, 37].

In diesem Komplex B ist noch keine katalytische Aktivität zu beobachten, die wahrscheinlich katalytisch aktive U6-snRNA ist noch durch die Basenpaarung mit U4 im U4/U6·U5-tri-snRNP-Komplex inhibiert.

Der bisherige Komplex B wird unter ATP-Verbrauch zum aktivierten Spleißosom (Komplex B*) [101]. Die Basenpaarung zwischen U4 und U6 wird aufgebrochen und U1- und U4-snRNPs werden freigesetzt. Der Weg ist frei, um die Spleißreaktion zu beginnen.

Hier bilden U2 und U6 über Basenpaarung zusammen mit U5-snRNA, welche die Exons für die Reaktion zu positionieren scheint, wahrscheinlich das katalytisch aktive Zentrum [107–110]. Unter weiterem ATP-Verbrauch erfolgt nun der erste Schritt des Spleißens: Es bildet sich der Lariat-Komplex C, in dem schließlich Schritt zwei abläuft [111].

Die verbundenen Exons werden freigesetzt, und der Lariatkomplex wird in das Intron-Lariat und die verschiedenen snRNPs zerlegt. Die snRNPs werden für die nächste Spleißreaktion wiederverwendet.

2.3 Aufgabenstellung

Für das Verständnis der Prozessierung der prä-mRNA durch das Spleißosom sind atomar aufgelöste Strukturen von den beteiligten Proteinen und RNAs nötig. Ähnlich dem Vorgehen beim Ribosom [8, 112] kann man das strukturelle Puzzle des Spleißosoms durch die Aufklärung der einzelnen RNAs und Proteine und ihre Plazierung in der Gesamtstruktur lösen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Y-förmige Kernbereich

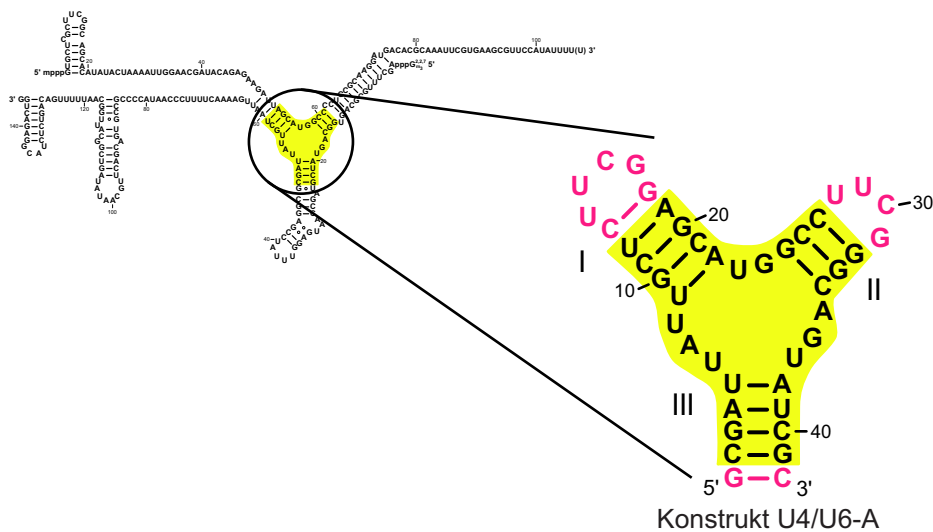


Abbildung 2.8: Die Basenpaarung zwischen den beiden spleißosomalen RNAs U4 und U6. Gelb unterlegt ist die Kernregion, die eine Y-förmige Verzweigung bildet (Y-junction), linke Seite. Rechts ist das vereinfachte, einsträngige, aus drei Stämmen (I-III) bestehende RNA-Konstrukt für die NMR-spektroskopische Untersuchung gezeigt.

des spleißosomalen U4/U6-RNA-Komplexes mit biochemischen Methoden synthetisiert werden. Dieses Konstrukt stellt einen wesentlichen Schritt für die Aufklärung der bisher unbekanntenen räumlichen Orientierung der drei Arme zueinander und ihrer Dynamik mit NMR-Methoden dar.

Hierzu wurde ein vereinfachtes, einzelsträngiges RNA-Konstrukt – U4/U6-A – entworfen, welches den Kernbereich repräsentiert (Abb. 2.8). Das Konstrukt sollte in größeren Mengen (Milligramm) sowohl unmarkiert als auch $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -isotopenmarkiert hergestellt werden, um eine NMR-spektroskopische Untersuchung zu ermöglichen. Es sollten Methoden zur Transkription und Aufreinigung etabliert werden, die die Herstellung von RNA homogener Länge ermöglichen und ohne Probleme auf andere Konstrukte übertragbar sind.

Es wurde eine aus einem Einzelstrang bestehende RNA gewählt, die per Transkription mit T7-Polymerase von einem DNA-Templat Einzelstrang herzustellen ist.

2.4 Design der Ziel-RNA

Für NMR-spektroskopische Untersuchungen ist der gesamte U4/U6-Komplex mit 252 Basen zu groß. Der interessante Bereich, der Y-förmige Kernbereich von Stamm I und II sowie die 5'-Stamm-Schleifen Struktur der U4-RNA, umfaßt ca. 40–50 Nukleotide. Um diesen Bereich nachzubilden, könnte man drei kurze RNAs synthetisieren und dann als 1:1:1-Komplex zusammen titrieren. Effizienter ist es, zwei der drei offenen Enden dieser verkürzten RNAs über UUCG-Schleifen miteinander zu verbinden. Die UUCG-Schleifen verändern dabei die Struktur des vorhergehenden Doppelstranges nicht und bilden außerdem noch ein sehr stabiles RNA-Motiv [113–120]. Die konzipierte einzelsträngige RNA sollte mittels Transkription mit T7-Polymerase von einem DNA-Templat einfach und effizient herzustellen sein.

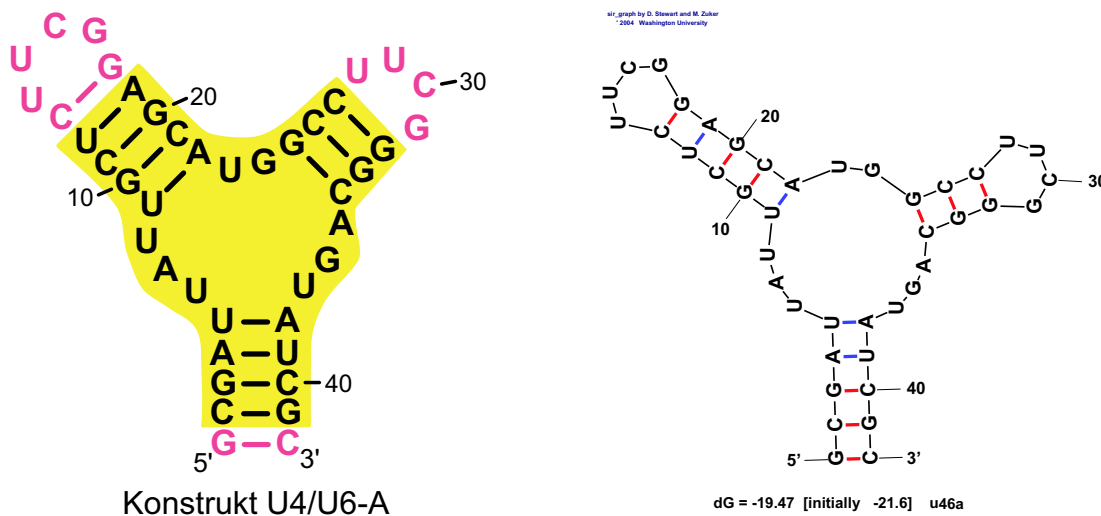


Abbildung 2.9: Sekundärstruktur des einzelsträngigen U4/U6-A Konstruktes, welches den Kernbereich (gelb unterlegt) des U4/U6-Komplexes wiedergibt (links). Rot sind die Basen hervorgehoben, die eingefügt wurden, um eine einzelsträngige stabile RNA zu erhalten. Rechts daneben die mit mfold [121] erzeugte Sekundärstrukturvorhersage für dieses Konstrukt.

Beim Design der einzelsträngigen RNA muß sichergestellt sein, daß die fertige RNA sich nur in die gewünschte Sekundärstruktur faltet. Hierzu wurden drei verschiedene

Konstrukte mit UUCG-Schleifen an verschiedenen Stellen entworfen [122] und ihre zu erwartende Sekundärstruktur mit dem Programm mfold [121, 123, 124] überprüft. Hierbei hat sich die als U4/U6-A bezeichnete Variante als geeignet erwiesen (Abb. 2.9 auf der vorherigen Seite), da nur sie in einer Konformation vorkommen sollte. Zur Stabilisierung des Endes wurde zusätzlich ein abschließendes CG-Basenpaar eingeführt.

2.5 Biochemische Synthese mit RNA-Polymerasen

Neben der für kleine RNAs etablierten chemischen Synthese von RNA-Oligonukleotiden wird für größere und/oder isotopenmarkierte RNA-Oligonukleotide die Transkription von DNA-Templaten mittels DNA-abhängiger RNA-Polymerasen eingesetzt. In den folgenden Abschnitten wird dieser Ansatz im Detail beschrieben.

2.5.1 T7-Polymerase

Für die biochemische Synthese von RNA durch Transkription von DNA-Templaten können eine Reihe von DNA-abhängigen RNA-Polymerasen (RNAP) von Bakteriophagen eingesetzt werden. Diesen Polymerasen ist eine Konsensussequenz des Promotors, der den Startpunkt der zu transkribierenden Sequenz kennzeichnet, zu eigen (Abb. 2.10, links).

	-17	-10	-5	+1
T7	T A A T A	C G A C T	C A C T A T A G	G G A G A
T3	A A T T A	A C C C T	C A C T A A A G	G G A G A
K11	A A T T A	G G C C A	C A C T A T A G	G G A G C
SP6	A T T T A	G G T G A	C A C T A T A G	A A G A G
	Bindungsdomäne		Initierungsdomäne	

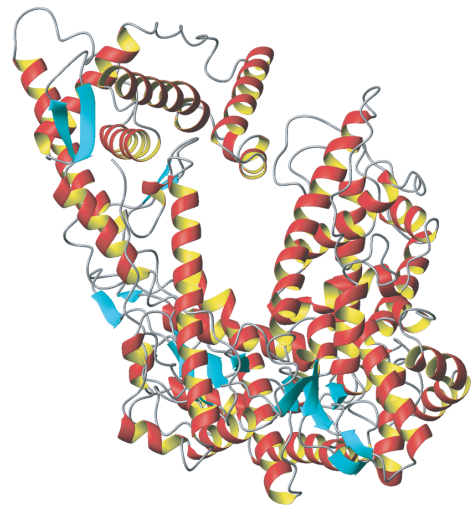


Abbildung 2.10: Links: Konsensussequenzen der Klasse III-Promotoren der Bakteriophagen T7, T3, K11 und SP6. Identische Bereiche sind eingerahmt, das rote Basentriplett kennzeichnet die individuelle Erkennungssequenz für den jeweiligen Promotor. Modifiziert nach [125]. Rechts: Darstellung der Sekundärstrukturen der Kristallstruktur der T7-Polymerase (PDB-Code: 1MSW).

In den meisten Fällen wird die ungefähr 98 kDa große, aus einer Untereinheit bestehende RNA-Polymerase des T7-Bakteriophagen (T7-RNAP) eingesetzt (Abb. 2.10, rechts). Die Expression und Aufreinigung des Enzyms stellt auch in größeren Mengen

kein Problem dar [126] und die T7-Polymerase besitzt eine ausreichend hohe Aktivität um RNA in mikromolaren Mengen zu synthetisieren.



Abbildung 2.11: Doppelsträngige Promotorregion der T7-Polymerase.

Neben der Verwendung zur biochemischen Synthese von RNA wird die T7-Polymerase als Modellsystem zur Untersuchung der DNA-gesteuerten Transkription eingesetzt, da sie im Gegensatz zu bakteriellen und eukaryontischen RNA-Polymerasen nur aus einer einzigen Untereinheit besteht [127]. Sie besitzt eine große strukturelle Ähnlichkeit mit der DNA-Polymerase I von *E. coli*. Die Domänen der für die Polymerisation zuständigen Bereiche besitzen eine sehr ähnliche dreidimensionale Struktur [128]. Es gibt eine Reihe von Kristallstrukturen, die den Mechanismus der Transkription in den verschiedenen Zuständen beschreiben [127, 129–134].

Die T7-Polymerase braucht eine doppelsträngige 17 Basenpaare lange Promotorsequenz für den Start der Transkription (Abb. 2.11).

Die Transkription mittels T7-RNA-Polymerase läuft in mehreren Phasen ab (Abb. 2.12 auf der nächsten Seite). Zu Beginn bildet sich der sogenannte geschlossene Komplex R_{Pc} (RNAP-Promoter-closed) zwischen der T7-RNAP (R) und der Promotorregion (P) des DNA-Templates aus. Die doppelsträngige Promotorregion des DNA-Templats bindet hierbei in einer tiefen Spalte zwischen den Unterdomänen der T7-RNAP. Der Promotor wird anschließend entwunden und es bildet sich der „offene Komplex“ R_{Po} (RNAP-Promoter-open). Die Zugabe von GTP, dem bevorzugten Startnukleotid und der weiteren Nukleotide während der Transkription bewirkt den Übergang in den Initiator-Komplex R_{Pi} (RNAP-Promoter-initiation). In dieser Phase beginnt die eigentliche Synthese der RNA. Der R_{Pi}-Komplex ist dabei durch die kurze RNA-Kette relativ labil, so daß es zu vermehrtem Kettenabbruch mit Sequenzen von 2-14 Nukleotiden (nt) Länge kommt. Die Abbruchrate ist mit U als Startnukleotid am höchsten, mit G am niedrigsten. Sie läßt sich durch Zugabe von GMP vermindern, das bevorzugt noch vor GTP eingebaut wird. Die instabile Initialphase kann bis zu 15 s dauern, bevor sich der eigentliche, stabile Transkriptionskomplex R_{Pt} (RNAP-Promoter-transcription) bildet. Hierbei findet eine Wechselwirkung der wachsenden RNA-Kette mit dem N-

Terminus der T7-RNAP statt und es erfolgt die Elongation der RNA-Kette. Diese kann mit einer Rate des Nukleotideinbaus von bis zu 230 nt/s ablaufen und bis zu 30 min. anhalten [125, 128]. Die Transkription endet mit Erreichen des Endes des Templatstranges oder einer Stopsequenz.

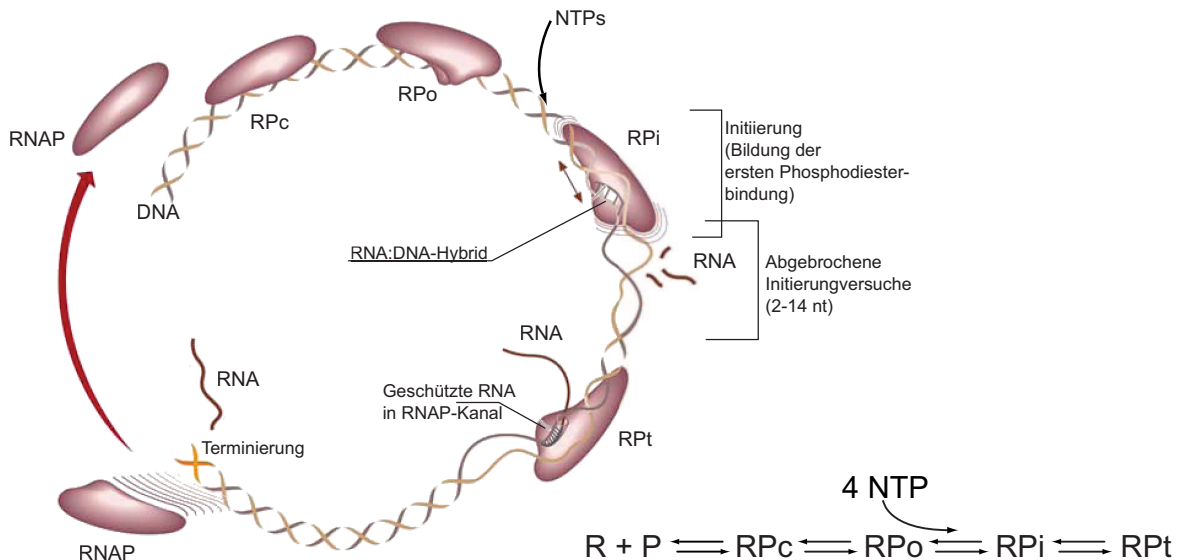


Abbildung 2.12: Kreislauf für die T7-Transkription. Zuerst bildet sich der geschlossene Komplex RPC . Nach entwinden der Promotorregion entsteht der offene Komplex RPO , der durch Zugabe der Nukleotide in den Initiator-Komplex RPi wechselt und die RNA-Synthese startet. Während dieser Initialphase kommt es vermehrt zu Kettenabbruchreaktionen. Schließlich wechselt der Komplex in die Transkriptionsphase RPt , in der die RNA in ganzer Länge synthetisiert wird. Mit Erreichen einer Stopsequenz oder des Endes des Templates hört die Transkription auf. Modifiziert nach [125, 135].

2.5.2 RNA-Oligomersynthesen mit T7-Polymerase

Die Verwendung der biochemischen RNA-Oligomersynthese mittels RNA-Polymerasen stellt derzeit die bevorzugte Möglichkeit dar, $^{13}C/^{15}N$ -markierte RNA unter Verwendung markierter Nukleotidtriphosphate, die auf chemischen [136–138] oder biochemischen Weg [139–150] hergestellt wurden, zu produzieren. Ebenso ist der Einbau spezifisch deuterierter Nukleotide [151–157] möglich.

Es stehen im Prinzip mehrere unterschiedliche Polymerasen von Bakteriophagen für die *in vitro* RNA-Synthese zur Verfügung. Durchgesetzt haben sich aber nur die SP6-

und die T7-RNA-Polymerasen. T7-RNAP und SP6-RNAP [158] zeigen dabei eine ausreichend hohe Aktivität, um RNA in μmol -Mengen herstellen zu können.

Aufgrund der guten Eigenschaften und der vorhandenen Erfahrungen [122] wurde die T7-Polymerase zur Durchführung der RNA-Synthesen gewählt. Wie schon in Abschnitt 2.5.1 auf Seite 21 (T7-Polymerase) erwähnt, benötigt die T7-RNAP einen 17 Basen langen doppelsträngigen DNA-Strang als Promotor (Abb. 2.11 auf Seite 22). Die Ausbeute kann erhöht werden, wenn auch die erste kodierende Position +1 ebenfalls doppelsträngig ist [159, 160] und mit einem Guanodin beginnt. Die Effizienz der Transkription in Abhängigkeit von der Base in Position +1 nimmt in der Reihenfolge $G > C > A > U$ ab. Ebenfalls ist die Position +2 bei gleicher Reihenfolge zu berücksichtigen, wenn die Ausbeute optimiert wird. Der Zusatz von GMP statt GTP kann die Ausbeute um bis zu 20 % erhöhen, wenn die Position +1 mit einem G beginnt [161]. Für eine optimale Ausbeute der Zielsequenz sollte diese also mit zwei Guanosinen beginnen.

DNA-Template



Abbildung 2.13: Partiiell doppelsträngige (A) und doppelsträngige DNA-Template (B) mit T7-Promotor für die Transkription mit T7-RNAP. Mit Rot ist die Startbase gekennzeichnet.

Es werden vier Arten von DNA-Templaten für die biochemische RNA-Synthese eingesetzt: Für kurze RNA-Oligomere hat es sich als ausreichend herausgestellt, nur die Promotorregion und die +1-Position im DNA-Templat doppelsträngig zu verwenden, der Rest kann einzelsträngig bleiben (Abb 2.13, A). Man erhält dieses Templat durch Hybridisierung des *sense*-Stranges der Promotorregion mit dem *antisense*-Strang der Templatsequenz inklusive Promotorregion. Bei Konstrukten, die stabile Sekundärstrukturen bilden, können allerdings einzelsträngige DNA-Template zu schlechten Ausbeuten führen [122]. Durch Verwendung komplett doppelsträngiger Templat-DNA läßt sich dieses Problem vermeiden.

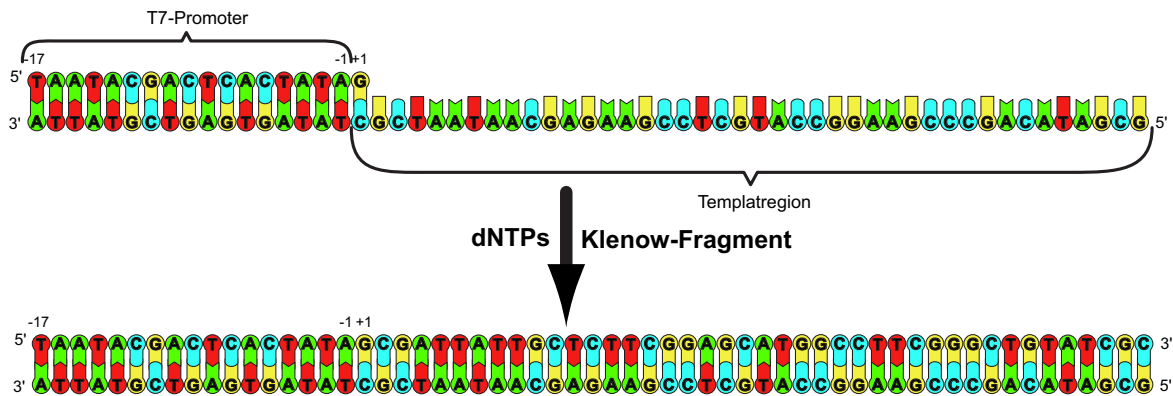


Abbildung 2.14: Synthese von doppelsträngiger Templat-DNA durch Auffüllen partiell ds-DNA mit Hilfe von dNTPs und Klenow-Fragment [122].

Vollständig doppelsträngige Templat-DNA läßt sich durch Hybridisierung von chemisch synthetisierten Einzelsträngen gewinnen (Abb. 2.13 auf der vorherigen Seite, **B**). Allerdings lassen sich längere DNA-Einzelstränge nicht immer eindeutig und quantitativ hybridisieren.

Dieses Problem läßt sich lösen, indem eine komplett doppelsträngige Matrize aus dem *Antisense*-Strang mit T7-Promotor und einem kurzen T7-Primer durch Transkription mit dem Klenowfragment und dNTPs synthetisiert wird [122] (Abb. 2.14). Das sogenannte Klenowfragment ist die große Untereinheit der DNA-Polymerase I von *E. coli* und zeigt 5' → 3' Polymeraseaktivität [162]. Allerdings muß bei diesem Ansatz zusätzlich das Klenowfragment exprimiert [163] oder gekauft werden.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die doppelsträngige, aus chemisch synthetisierten DNA-Einzelsträngen hybridisierte Templat-DNA in ein Plasmid zu klonieren, dieses in *E. coli* zu exprimieren und nach der Isolierung mit einem Restriktionsenzym aufzuschneiden und als Matrize für die RNA-Transkription zu verwenden [164, 165] (Abb. 2.15 auf der nächsten Seite). Dieser Ansatz hat den Vorteil, beliebige Mengen des doppelsträngigen DNA-Templates herstellen zu können. Man verwendet hierbei das pUC19-Plasmid, das keinen T7-Promotor enthält. Man führt diesen wie auch die entsprechenden Schnittstellen mit der Templat-DNA in den Vektor ein. In dieser Arbeit wurden zum Einklonieren der Templat-DNA die EcoR I- und Hind III-Schnittstellen verwendet. Zum Linearisieren des in *E. coli* amplifizierte Plasmides wird dieses mit der Pst I oder Hind III-Restriktionsendonuklease aufgeschnitten.

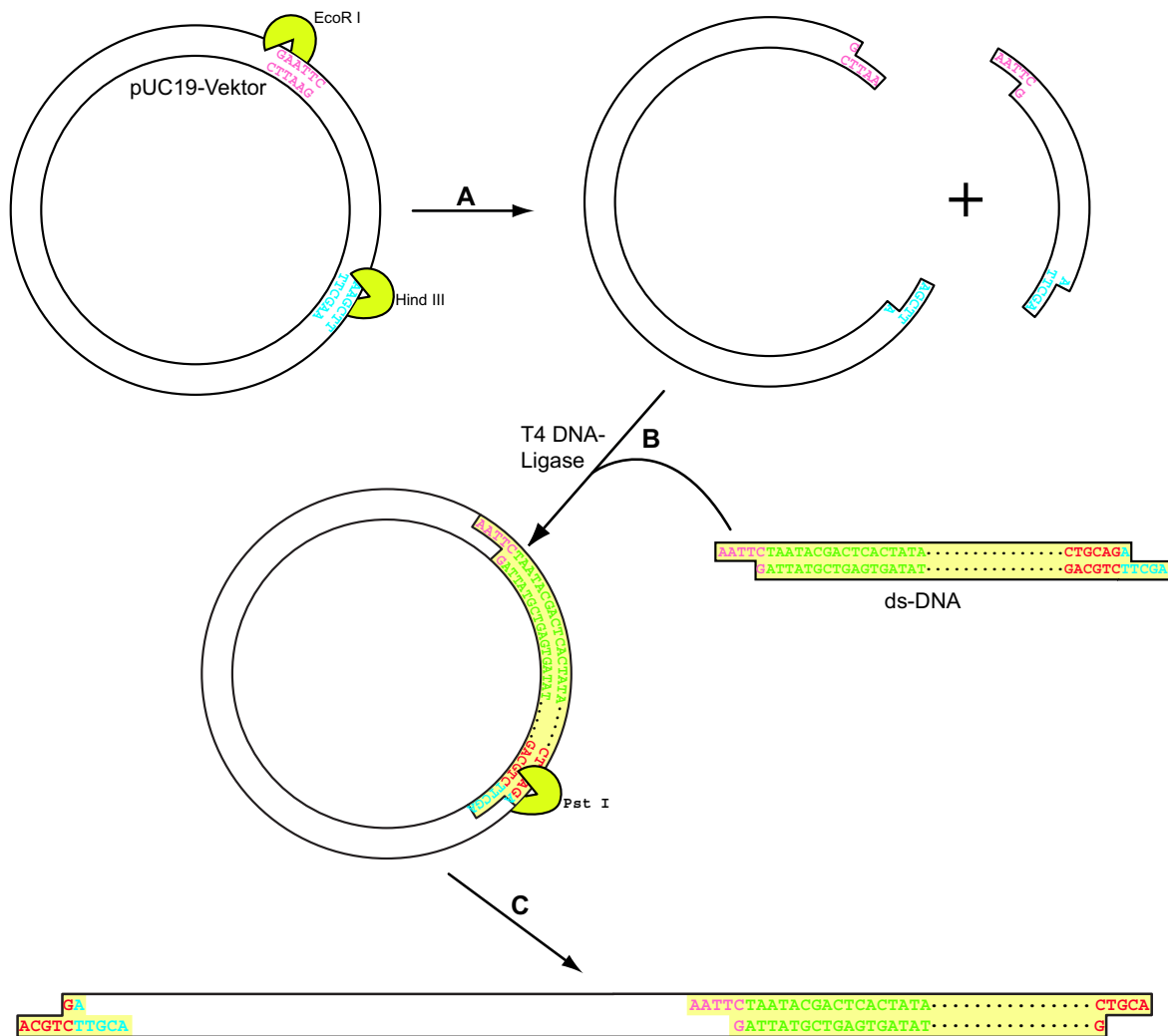


Abbildung 2.15: Prinzip der Klonierung der RNA-Zielsequenz in den pUC19-Vektor. Zu Beginn wird mit den beiden Restriktionsendonukleasen EcoR I und Hind III der pUC19-Vektor aufgeschnitten (A). Im zweiten Schritt wird die komplementäre DNA-Sequenz der gewünschten RNA inklusive des T7-Promoters und der benötigten Schnittstellen mit Hilfe der T4 DNA-Ligase in den Vektor ligiert (B). Anschließend wird das modifizierte Plasmid in *E. coli*-Zellen vervielfacht und nach der Isolierung mit der Restriktionsendonuklease Pst I linearisiert (C).

Transkription

Bei der Transkription wird der Templatstrang in 3'→5'-Richtung abgelesen. Dabei schiebt sich die T7-Polymerase entlang des helikalen Doppelstranges und entwindet diesen zum Teil (Abb. 2.16 auf der nächsten Seite).

Die Bedingungen für die RNA-Synthesen müssen für jede Zielsequenz optimiert werden. Neben der eigentlichen Sequenz mit ihren Startnukleotiden spielt die Konzentration von DNA-Templat, Enzym, Magnesiumionen, Nukleotiden und die Reaktionszeit eine entscheidende Rolle.

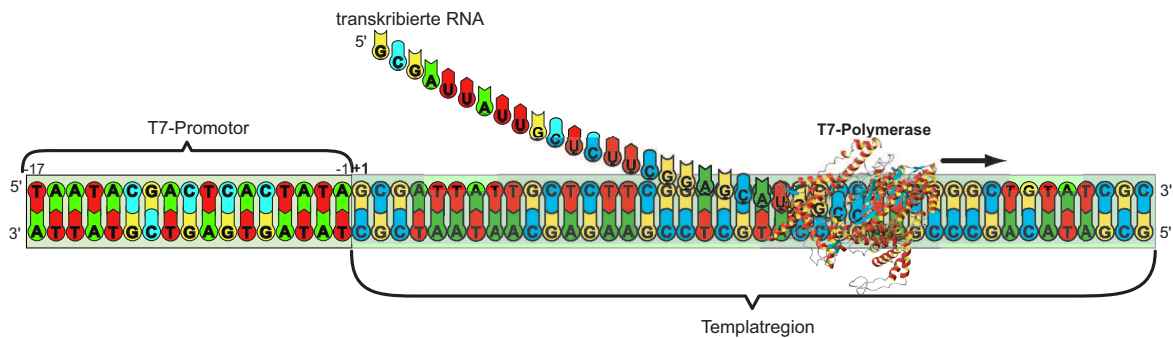


Abbildung 2.16: Die T7-Polymerase beginnt direkt nach dem Ende der Promotorsequenz an der Position +1 mit der Transkription. Die Transkription verläuft dabei in 5'→3'-Richtung.

Die Reaktionsbedingungen bezüglich pH-Wert und einigen Zusätzen sind mit Abweichungen einheitlich. So sind pH-Werte im Bereich 7.4 bis 8.1 unkritisch. Eine Analyse der Reaktionsbedingungen bezüglich des pH-Wertes und der Ionenstärke ergab ein pH-Optimum von 7.4 [166]. Allerdings startet man in der Praxis mit einem pH-Wert von 8, der im Laufe der Reaktion durch die Freisetzung von Pyrophosphat sinkt. Die Entstehung des Pyrophosphates senkt die Konzentration an Magnesiumionen durch Bildung eines unlöslichen Niederschlages. Hierdurch wird die Transkriptionsreaktion ineffizienter. Der Zusatz von anorganischer Pyrophosphatase wandelt das Pyrophosphat in Hydrogenphosphat um und das Magnesium wird wieder freigesetzt [167]. Die Magnesiumkonzentration ist wichtig, weil die Nucleotidtriphosphate als Magnesiumsalze von der T7-Polymerase während der Transkription erkannt werden. Es sollte immer mit einem Überschuss im Vergleich zu den eingesetzten Nucleotiden gearbeitet werden. Die Konzentration bezüglich Templat und Enzymmenge wie auch der Nucleotidkonzentration muß für jede Zielsequenz einzeln optimiert werden. Wechselt man zu isotonenmarkierten Nucleotiden, muß erneut optimiert werden, da diese aus der biochemischen Synthese noch Magnesiumionen mitbringen. Die Verwendung von Magnesiumacetat anstatt von Magnesiumchlorid kann sich ebenfalls positiv auf die Ausbeute der Transkription auswirken [166].

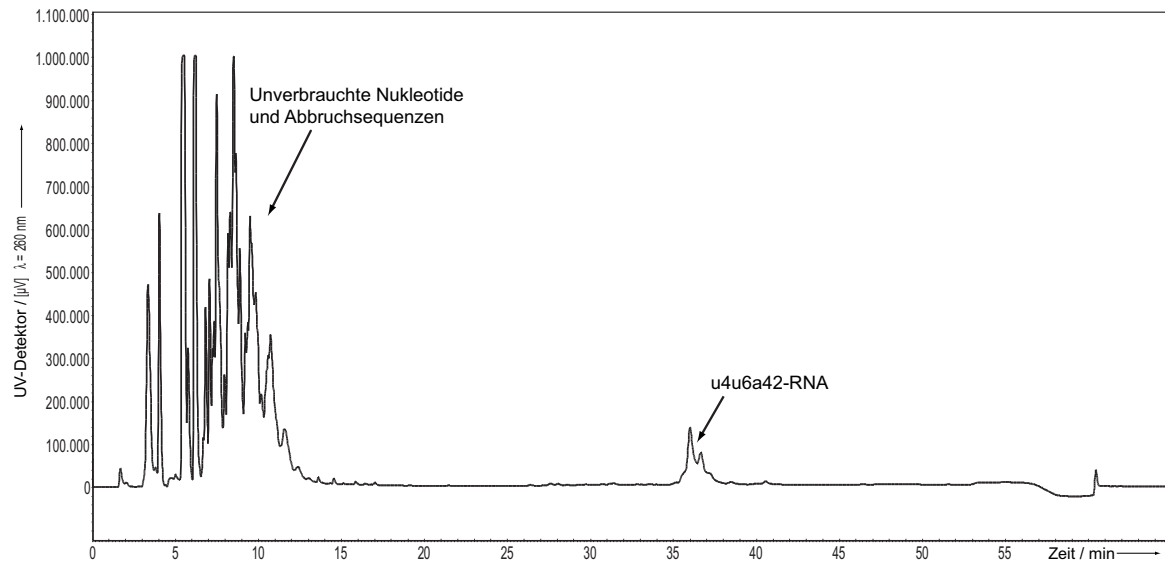


Abbildung 2.17: HPLC-Chromatogramm einer phenolisierten T7-Transkription von *u4u6a42*-RNA. Die nicht eingebauten Nucleotide und Abbruchsequenzen (Signale bis 15 min.) von bis zu 14 Basen Länge stellen den Großteil der in der Probe enthaltenen RNA dar. Die *u4u6a42*-RNA ist in deutlich geringerer Konzentration enthalten (Signale bei 36 min.).

T7-RNAP-Transkriptionen werden üblicherweise unter Zusatz von Spermidin, Triton X-100 und PEG8000 durchgeführt, die den Transkriptionsapparat stabilisieren. Die Ausbeute an gewünschter RNA-Sequenz im Vergleich zum eingesetzten, limitierenden Nucleotidtriphosphat liegt bei guten Transkriptionen bei bis zu 10 %, meist aber darunter. Der Großteil der Nucleotide wird in Abbruchsequenzen eingebaut, wie man anhand eines analytischen HPLC-Chromatogramms sehen kann (Abb. 2.17).

3'- und 5'-Heterogenität

Das Ende der Transkription ist durch das Ende der Templatsequenz gegeben, nicht durch eine Stopsequenz wie in der Natur [168]. Die natürlichen Stopsequenzen sind ohne sequenzspezifische Proteinfaktoren oftmals nicht wirksam und können daher nicht bei den hier besprochenen Ansätzen verwendet werden. Nach Erreichen der letzten Templatbase synthetisiert die T7-RNAP oft weiter und es werden noch ein bis fünf Nucleotide am 3'-Ende der synthetisierten RNA angehängt. Hierbei werden alle vier möglichen Nucleotide in zufälliger Reihenfolge verwendet. Man erhält eine am 3'-Ende heterogene transkribierte RNA, deren Sequenz nicht mehr definiert ist.

Neben der 3'-Heterogenität der transkribierten RNA kann man in Abhängigkeit von der Startsequenz der Ziel-RNA auch 5'-Heterogenität beobachten. Insbesondere Sequenzen mit zwei oder drei Guanosinen am Anfang scheinen hierfür anfällig zu sein [169, 170]. Zudem ist diese Art von 5'-Heterogenität nach der Transkription nicht zu erkennen, sondern erst, nachdem man die 3'-Heterogenität eindeutig beseitigt hat. Eine Möglichkeit zur Reduktion der 5'-Heterogenität ist die Verwendung eines leicht modifizierten T7-Promotors, des sogenannten ϕ -Promotors, der mit einem Adenosin an der +1-Position beginnt [171]. Neben dieser natürlichen 5'-Heterogenität können auch Abbruchsequenzen und selbstassoziiierende RNA-Oligonukleotide, die erst bei der Transkription entstehen, zu unerwarteten transkribierten RNAs führen [172, 173].

Mit der einfachen Transkription von chemischen synthetisierten oder plasmidbasierten DNA-Templaten erhält man in allen Fällen eine am 3'- und/oder am 5'-Ende heterogene RNA-Sequenz. Dies kann die NMR-spektroskopische Untersuchung durch die Bildung verschiedener Konformere und Signalsätze erschweren.

2.6 Aufreinigung von RNA-Oligomeren

Die Aufreinigung von längeren chemisch oder biochemisch synthetisierten RNA-Oligomere stellt wegen der Heterogenität der Produkte (konformationell wie auch in der Größe) eine besondere Herausforderung dar. Für die NMR-Messungen werden mikromolare Mengen von homogenen RNA-Oligomeren benötigt.

Nach der Transkription mit T7-RNAP erhält man jedoch eine Mischung aus der gewünschten RNA zusammen mit Abbruchsequenzen und nicht verbrauchten Nukleotiden. Zusätzlich muß auch die Homogenität bezüglich der Länge der RNA sichergestellt sein. Somit müssen Methoden verwendet werden, die eine Trenngenauigkeit von +/-1 Nukleotid aufweisen, um die 3'- und 5'-Heterogenität aufzulösen.

Außerdem muß die gereinigte RNA für die NMR-Messungen in ein Puffersystem mit definiertem Salz- und pH-Gehalt überführt werden.

Soll die RNA für die Ligation von kleinen und mittelgroßen RNAs zu größeren RNA mittels T4-RNA-Ligase verwendet werden, muß das 3'-Ende eindeutig definiert sein. Hiermit wird ein segmentbasiertes Markieren der RNA möglich, was die Zuordnung

von großen RNAs und ihre Strukturaufklärung erheblich erleichtern kann, wenn nur ein bestimmter Bereich $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiert ist.

In den folgenden Abschnitten werden die verschiedenen Methoden zur Homogenisierung und Aufreinigung der synthetisierten RNA-Oligomere erläutert.

2.6.1 Homogene 3'-Enden durch modifizierte DNA-Templates

Neben der Verwendung des speziellen ϕ -Promotors zur Vermeidung der 5'-Heterogenität (Abschnitt 2.5.2 auf Seite 28) kann die 3'-Heterogenität bei der Synthese mit T7-Polymerase durch Verwendung von modifizierten Nukleotiden am 5'-Ende des *antisense*-DNA-Templatstranges verringert und bei bestimmten Sequenzen ganz vermieden werden [174–176].

Eine Möglichkeit besteht in der Verwendung von 2'-OMe-Nukleosiden an den beiden letzten Positionen des *antisense*-Stranges der Templat-DNA [175, 176].

Eine alternative Methode verwendet modifizierte Basen am 5'-Ende des *antisense*-Stranges, die dazu führen, dass die T7-Polymerase mit der Synthese abbricht [174].

Für beide Methoden werden chemisch synthetisierte DNA-Templates benötigt, deren Zugänglichkeit oftmals begrenzt und ein zusätzlicher Kostenfaktor ist. Die Effizienz der modifizierten Nukleotide am Ende der Templat-DNA ist außerdem sequenzspezifisch.

2.6.2 Homogene 3'- und 5'-Enden durch Schneiden mit Ribozymen

Autokatalytisch aktive RNA-Sequenzen – sogenannte Ribozyme – die die RNA an definierten Stellen schneiden, eignen sich zur Homogenisierung von transkribierter RNA am 3'- und 5'-Ende. Es gibt verschiedene katalytisch aktive RNA-Motive, z.B. das Hammerhead (HH)-, das Hairpin- oder das Hepatitis Delta Virus (HDV)-Ribozym. Diese unterscheiden sich in ihren Sekundärstrukturen und in der Erkennungssequenz der Schnittstellen [177–179].

Das Hammerhead-Ribozym (Abb. 2.18 auf der nächsten Seite) ist ein häufig verwendetes Motiv zur Homogenisierung von heterogener RNA. Als ursprünglich pathogene

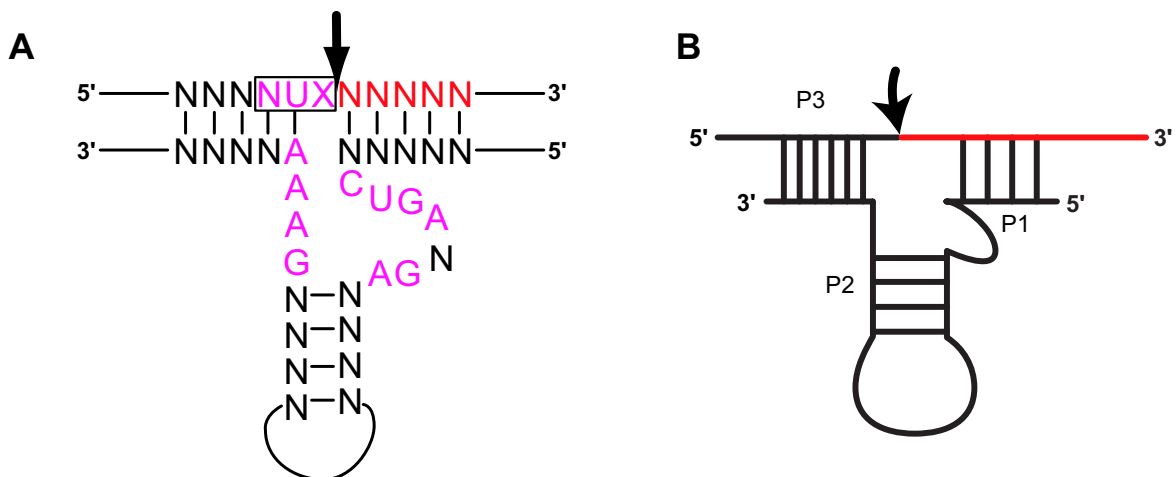


Abbildung 2.18: Allgemeine Sequenz des für die Schneidreaktionen verwendeten HH-Ribozyms. In Pink sind die konservierten, für die katalytische Aktivität essentiellen Basen gekennzeichnet. NUX bezeichnet die Sequenz, nach der das HH schneidet (N steht für ein beliebige Base, X für C oder U). Die Reihenfolge für die beste NUX-Sequenz lautet GUC > CUC. Rechts daneben die schematische Abbildung des HH-Ribozyms. P1 bis P3 bezeichnet die gepaarten Abschnitte.

RNA spielt sie bei der Replikation der einzelsträngigen zirkulären RNA eine zentrale Rolle, indem es die replizierte lineare RNA intramolekular spaltet [177, 180]. Diese Eigenschaft macht sie als synthetisches Werkzeug wertvoll. Das native HH-Motiv läßt sich auf ein essentielles Kerngerüst reduzieren, welches weiterhin katalytisch aktiv, aber einfacher zu handhaben ist [180].

Cis- und trans-Ribozyme

Wird die Ribozymsequenz in die Templat-DNA eingebaut und erfolgt die Schneidreaktion während oder direkt nach der Transkription, spricht man von *cis*-Ribozymen. Bei der Verwendung des *trans*-Ribozyms werden das Ribozym und die zu schneidende RNA separat transkribiert und erst danach zur Schneidreaktion eingesetzt (Abb. 2.19 auf der nächsten Seite).

Cis-Ribozyme haben den Vorteil während oder gleich nach der Transkription die fertige RNA bei entsprechend hoher Magnesiumkonzentration zu schneiden und so ein definiertes Produkt zu liefern. Nachteilig ist, daß bei der Verwendung von isotonenmarkierten NTPs diese auch in die Ribozyme eingebaut werden und somit die Ausbeute der an isotonenmarkierter RNA verringern. Allerdings kann durch die Verlängerung

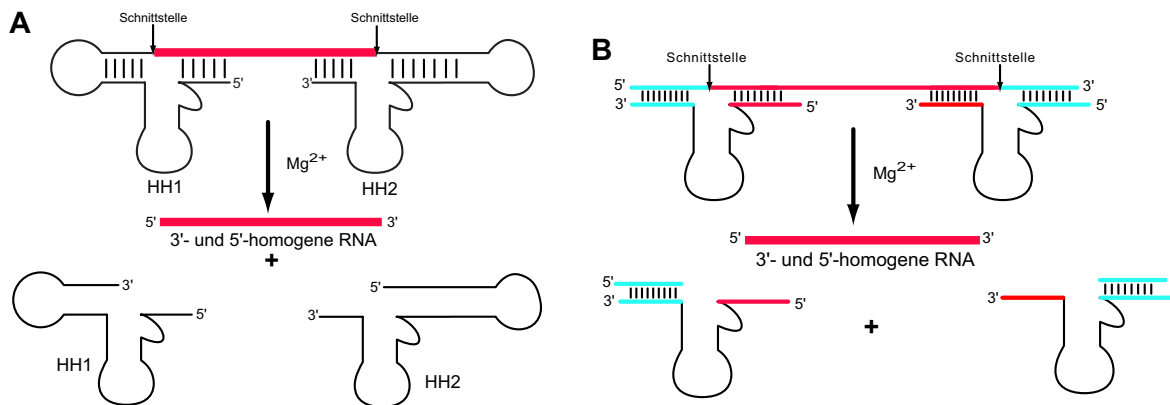


Abbildung 2.19: Prinzip der 3'- und 5'-Homogenisierung von heterogener RNA mit Hilfe von Ribozymen (hier das Hammerhead-Ribozym). Die Ziel-RNA ist rot, die Bindungsstellen für die HH-Ribozyme blau gekennzeichnet. **A** Prinzip des Schneidens mit *cis*-HH. Die Sequenzen der entsprechenden HH-Ribozyme mit ihren spezifischen Bindungsarmen werden in die Templat-DNA integriert. Während und nach der Transkription wird die RNA geschnitten und man erhält die homogene RNA. **B** Prinzip des Schneidens mit *trans*-HH. Die Ziel-RNA mit den Verlängerungen zur Definition der Schnittstelle und Bindung der *cis*-HH-Ribozyme und die HH-Ribozyme werden getrennt transkribiert. Anschließend werden die Ziel-RNA und die Ribozyme gepaart und durch Zusatz von Magnesiumionen wird die Schneidreaktion gestartet. Man erhält die homogene RNA.

der Templat-DNA oft auch die Transkription effektiver werden [160], so daß sich Vor- und Nachteile – je nach Ziel-RNA – die Waage halten. Zudem gibt es keine Beschränkungen für die RNA-Sequenz, da diese von zwei Ribozymen flankiert wird. Es entfällt somit ein spezielles Sequenzdesign der gewünschten RNA. Am einfachsten läßt sich ein Konstrukt aus einem HH am 5'-Ende (mit der NUX-Sequenz) und einem unspezifisch schneidenden HDV-Ribozym am 3'-Ende realisieren. Das Einklonieren in den entsprechenden Vektor erfordert jedoch einige PCR- [181–183] bzw. Ligationsreaktion [165], da die entsprechende DNA je nach Konstrukt relativ lang ist und nicht mehr mit chemischer Synthese hergestellt werden kann. *Cis*-Ribozyme werden oftmals zur Herstellung homogener RNA für die Kristallisation verwendet [164, 184–186].

Trans-Ribozyme haben den Vorteil, daß sie nicht isotopenmarkiert hergestellt werden müssen und nach Verwendung in der Schneidreaktion wieder verwendet werden können. Nachteilig ist die Durchführung einer separaten Schneidreaktion, so daß mehrere Reinigungsschritte nötig sind, um die geschnittene RNA zu isolieren. In der Literatur werden beide Varianten besprochen [187, 188], in dieser Arbeit wurden nur

trans-Ribozyme verwendet, da die Konstrukte kürzer und durch die Verwendung der chemisch synthetisierten DNA schneller herzustellen sind.

Kinetik der Schneidreaktion mit *trans*-Ribozymen

Die Schneidreaktion verläuft in drei Schritten (Abb. 2.20). Zuerst erfolgt die Bindung der zu schneidenden Ziel-RNA (Substrat) mit dem oder den Ribozym(en) unter Bildung eines Ribozym-Substrat-Komplexes mittels Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Ribozym und der Ziel-RNA. Diese Komplexbildung erreicht man durch kurzzeitiges Erhitzen der beteiligten RNAs auf 85 °C und langsames Abkühlen auf Raumtemperatur. Die eigentliche Schneidreaktion wird durch Zugabe von Magnesiumionen gestartet. Hierbei faltet sich der Komplex in seine katalytisch aktive Form und schneidet das Substrat an der definierten Stelle. Es bildet sich ein dreigliedriger Komplex aus geschnittener Ziel-RNA, dem abgeschnittenen RNA-Stück und dem Ribozym, die noch über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Zum Schluß dissoziieren die Reaktionspartner in einzelne RNAs. Das Ribozym kann für weitere Schneidreaktionen verwendet werden. Dieser letzte Schritt vollzieht sich am langsamsten. Daher setzt man Substrat-RNA und Ribozym meist in einem Verhältnis von 1:1 (Substrat:Ribozym) ein, um einen vollständigen Schnitt der Substrat-RNA zu erreichen. Gegebenenfalls muß das Ribozym auch in mehrfachem Überschuß zum Substrat eingesetzt werden, um eine vollständige und schnelle Reaktion zu erreichen (zwei- bis dreifacher Überschuß).

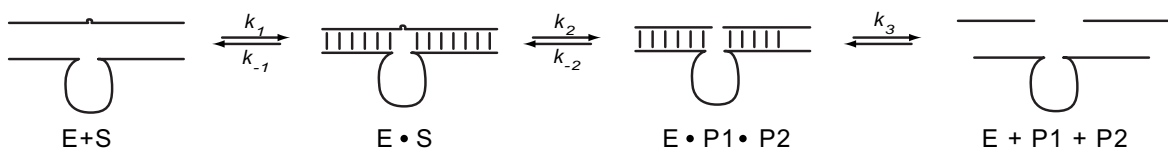


Abbildung 2.20: Kinetik für die Schneidreaktion mit Ribozymen oder DNA-Enzymen. Im ersten Schritt erfolgt reversibel die Bindung des Substrates an das Ribozym über Basenpaarungen der Bindungsarme (E•S). Dann erfolgt unter Einfluß von Magnesiumionen die Spaltung des RNA-Substrates. Die gespaltene RNA bleibt danach weiterhin über Basenpaarungen an das Ribozym gebunden. Zum Schluß dissoziieren die Bruchstücke und das Ribozym. Das Ribozym steht nun für die nächste Schneidreaktion zur Verfügung.

Sequenzdesign der zu schneidenden RNAs

Je nach Ribozym ergeben sich verschiedene Voraussetzungen bezüglich der Schnittstelle in der RNA, die beim Sequenzdesign berücksichtigt werden müssen. Um die RNA

mit den Ribozymen schneiden zu können, müssen die Schnittstellen eindeutig definiert sein und die Ribozyme müssen mit ihren aktiven Zentren binden können. Hierzu muß oftmals die RNA am 3'- und/oder 5'-Ende um mehrere Basen verlängert werden, um eine definierte Bindung der entsprechenden Ribozyme zu erreichen. Meist genügen Bindungsarme von sechs bis acht Basen Länge.

Außerdem sollten sich das fertig geschnittene Produkt und die verwendeten Ribozyme andererseits um fünf bis zehn Basen in der Größe unterscheiden, um eine einfache Aufreinigung und Wiederverwertung zu ermöglichen.

Zudem ist darauf zu achten, daß die Schneidreaktion schon bei möglichst geringen Magnesiumkonzentrationen abläuft, um die Hydrolyse der synthetisierten RNA möglichst gering zu halten.

Restriktionen bezüglich der zu transkribierenden Sequenz mit T7-Polymerase lassen sich beim Schneiden am 5'-Ende vermeiden. Die Sequenz der gewünschten RNA muß dabei nicht mehr mit einem Guanosin (G) oder im Falle des ϕ -Promotors (Abschnitt 2.5.2 auf Seite 28) mit einem Adenosin (A) beginnen.

Ein Nachteil der Verwendung des Hammerhead-Ribozyms ist die NUX-Basenfolge, nach der geschnitten wird. Somit muß die zu schneidende RNA dieses Motiv am 3'-Ende aufweisen, so daß die Sequenz dementsprechend geändert werden muß. Beim HDV-Ribozym besteht keine solche Begrenzung [189–192].

2.6.3 Homogene 3'-Enden durch Schneiden mit DNA-Enzymen

Eine weitere Möglichkeit, die 3'-Enden der RNA nach der Transkription zu homogenisieren, besteht in der Verwendung von DNA-Enzymen, die RNA schneiden können [193–201]. Die bekanntesten Vertreter dieser Substanzklasse sind die sogenannten 8-17 und 10-23 DNA-Enzyme (Abb. 2.21 auf der nächsten Seite). Diese schneiden RNA unter Einfluß von Magnesiumionen auch in katalytischen Mengen oftmals sehr effektiv. Der Vorteil der Verwendung von DNA-Enzymen ist ihre Einfachheit und Zugänglichkeit über die etablierte chemische Festphasensynthese.

Je nach Sequenz wird die RNA nicht immer vollständig geschnitten, auch wenn das DNA-Enzym im Überschuß vorliegt. Ein weiterer Nachteil ist, daß die benötigten Men-

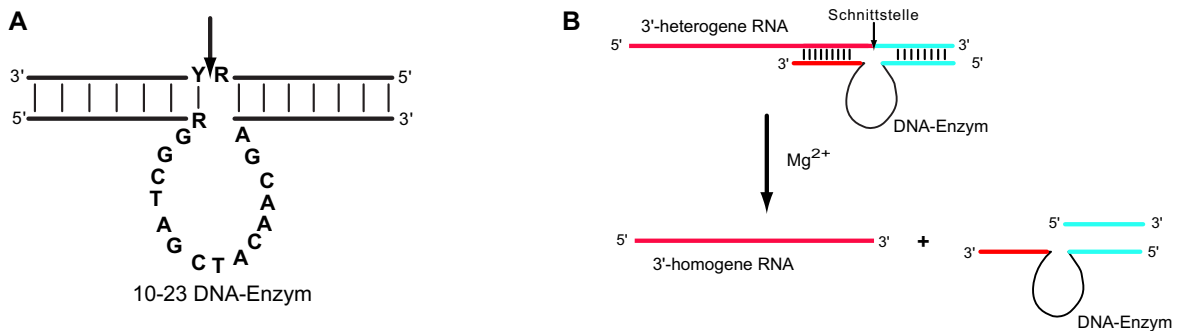


Abbildung 2.21: Prinzip der Schneidenreaktion von Substrat-RNA mit DNA-Enzymen am 3'-Ende. **A** Konsensussequenz des verwendeten 10-23 DNA-Enzyms. R bezeichnet Purinnukleotide und Y Pyrimidinnukleotide. **B** Prinzip der Schneidenreaktion. Ebenso wie beim Ribozym wird die Substrat-RNA mit dem DNA-Enzym im Reaktionspuffer hybridisiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von Magnesiumionen gestartet. Man erhält als Produkte die geschnittene RNA, das DNA-Enzym und die abgeschnittene RNA.

gen groß sind, so daß mit hohen Kosten für die chemische Synthese der DNA-Enzyme zu rechnen ist. Mittlerweile sind auch DNA-Enzyme auf Plasmidbasis entwickelt worden [200]. So sind diese auch in größeren Mengen für eine Schneidenreaktion verwendbar.

2.6.4 Gel-Aufreinigung

Die Gelelektrophorese gehört zu den etablierten Techniken zur Aufreinigung von Proteinen und Nukleinsäuren. Durch Wahl der entsprechenden Gel-Matrix (Agarose, Acrylamid) und den Grad der Vernetzung kann man unterschiedlich große Biomoleküle problemlos im elektrischen Feld auftrennen. Durch verschieden große Gele lassen sich auch große RNAs bis auf +/-1 Nukleotid im analytischen Maßstab separieren. Es wird sowohl unter nativen (ohne Zusatz von denaturierenden Stoffen, aktive Kühlung des Gels), um auch unterschiedliche Konformationen zu trennen, als auch denaturierenden Bedingungen gearbeitet (Zusatz von bis zu 8 M Harnstoff zur Gelmatrix, keine Kühlung).

Bei der präparativen Trennung großer RNA treten Probleme auf. Um einen ausreichenden Trenneffekt zu erzielen, muß die Laufstrecke verlängert werden, da sonst die Banden ineinander laufen. Dabei nimmt der Verlust an RNA mit zunehmender Dauer der Elektrophorese zu, da sich das Gel bei der verwendeten Spannung trotz passiver

Kühlung stark erwärmt und so die denaturierenden Bedingungen intensiviert werden.

Deswegen muß die aufzureinigende Probe auf mehrere große Gele verteilt werden, so daß sich der zeitliche und apparative Aufwand stark erhöht. In der Praxis setzt man Gele von 43 x 53 cm und 3 mm Dicke ein [165], um ca. 2 mg RNA oder die Hälfte einer 20 ml Transkription aufzureinigen. Je nach Länge der RNA kann eine Elektrophorese bis zu 16 h dauern.

Um die RNA aus dem Gel zu eluieren, werden verschiedene Methoden angewendet. Crush & Soak, Freeze-squeeze und Elektroelution sind die am häufigsten verwendeten [202].

Für die Elektroelution werden die Gelstücke – eingelegt in Puffer – nochmals einer Elektrophorese unterworfen, wobei die RNAs aus der Gelmatrix durch Anlegen eines elektrischen Feldes in die Sammelkammer wandern und dort aufkonzentriert werden. Die Elektroelution ist mit Rückgewinnungsraten von durchschnittlich 78 % [203] je nach Sequenz sehr effektiv. Je nach Präparation des Gels (Gehalt an Acrylamid, Harnstoff) werden nach der Elektroelution noch Fremdstoffe gemeinsam mit der RNA eluiert, die durch zusätzliche Reinigungsschritte gegebenenfalls beseitigt werden müssen [204, 205]. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Gelen konnten solche Effekte allerdings nicht festgestellt werden.

Zusammenfassend ist die Gelelektrophorese eine zeitlich und apparativ aufwendige Methode, um RNAs aufzureinigen. Allerdings ist die Reinheit einer so aufgearbeiteten Probe am größten und gut für die Herstellung von RNA-Proben für die NMR-Spektroskopie geeignet.

2.6.5 Aufreinigung über HPLC

Für Nukleinsäuren bieten sich zwei HPLC-Techniken an: Anionenaustausch-Chromatographie und Ionenpaar-Reversed Phase Chromatographie (IP-RP-HPLC) [206].

Die IP-RP-HPLC wird häufig zur Aufreinigung von chemisch synthetisierten DNA- oder RNA-Oligonukleotiden eingesetzt. Man erhält auch bei längeren Sequenzen eine Auflösung von einem Nukleotid [207–210].

Anionenaustauscher-Chromatographie beruht auf der Wechselwirkung des negativ geladenen Phosphatrückgrates der Nukleinsäuren mit der positiv geladenen Matrix der Chromatographiesäule. Hierbei wird die Nukleinsäure gebunden und mit Hilfe eines Salzgradienten eluiert. Zur Verfügung stehen verschiedene negativ geladene Austauscherguppen in Kombination mit verschiedenen Säulenmaterialien, um die Wechselwirkung je nach Einsatzzweck zu optimieren [211,212]. Entscheidend für die effektive Wechselwirkung ist außerdem der pH-Wert, da die Nukleinsäuren unterschiedlich protoniert vorliegen [213].

Zur Auftrennung müssen die RNA-Proben denaturiert vorliegen um sauber getrennt zu werden, ohne daß verschiedene Sekundärstrukturen oder Konformationen die Ergebnisse verfälschen [187,214–217]. Die in dieser Arbeit verwendeten Anionenaustauschersäulen (Nucleogen DEAE 6-70 (Machery & Nagel), DNAPac 100 (Dionex)) sind in verschiedenen pH-Bereichen und unter denaturierenden Bedingungen (Harnstoff oder Wärme bis zu 90 °C) stabil. Wie bei der Gelelektrophorese werden nur im analytischen Maßstab Trennungen von +/- einem Nukleotid erreicht. Um auch präparativ RNA aufzureinigen zu können, sollte der Unterschied zwischen den Spezies mindestens fünf Basen betragen.

Die Verwendung der HPLC zur Aufreinigung der transkribierten RNAs ist mit einigen Vorteilen gegenüber der Gelelektrophorese verbunden. Der Zeitaufwand ist wesentlich geringer. Pro HPLC-Lauf benötigt man nur ein bis zwei Stunden, d.h. die Aufreinigung einer 20 ml-Transkription, aufgeteilt in zwei Fraktionen ist nach ca. vier Stunden abgeschlossen. Die anschließende Elektroelution entfällt. Die gereinigte RNA muß nur noch aus der Lösung gefällt und entsalzt werden. Zudem ist die Ausbeute im Vergleich zur Gelaufreinigung um gut 25 % größer. Allerdings ist die Reinheit der so aufgereinigten RNAs nicht so hoch wie bei der Elektrophorese.

2.7 Biochemische Synthese von U4/U6-A Konstrukten

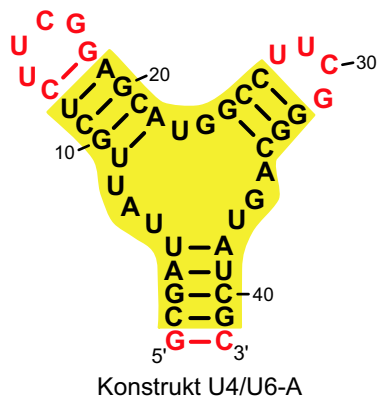


Abbildung 2.22: Kernbereich von U4 und U6

In den folgenden Abschnitten wird die biochemische Synthese von verschiedenen RNAs beschrieben, die den Kernbereich der Y-förmigen Verzweigung der beiden basen-gepaarten spleißosomalen RNAs U4 und U6 wiedergeben. Grundlage für das Design ist immer das 42 Basen lange Konstrukt U4/U6-A (Abb. 2.22) mit zwei UUCG-Loops, so daß das Konstrukt als einzelner RNA-Strang per T7-Transkription von einer entsprechenden DNA-Matrize dargestellt werden kann. Es wurden verschiedene Methoden zur Herstellung und Aufreinigung der RNAs verwendet, um eine in der Länge homogene RNA zu erhalten die in nur einer einzigen Konformation vor-

liegt und somit für NMR-Messungen geeignet ist. Alle Konstrukte wurden durch Transkription mit T7-Polymerase von einem DNA-Templat hergestellt. Die RNAs variieren aber in der Länge, da die Aufreinigung bzw. Homogenisierung mit verschiedenen Methoden, d.h. Ribozymen und DNA-Enzymen, erfolgte. Um die RNA am 5'- und/oder am 3'-Ende mittels Ribozymen oder DNA-Enzymen zu homogenisieren, mußte die entsprechende Sequenz zur Bindung der Enzyme verlängert werden. Ebenso wurden mit 2'-Methoxygruppen modifizierte DNA-Templates verwendet, um das N+1-Problem zu minimieren.

Die synthetisierten RNA-Oligonukleotide wurden nach einem systematischen Muster benannt (Abb. 2.23 auf der nächsten Seite). So kennzeichnet die Benennung u4u6a42 ein 42-langes U4/U6-A-Konstrukt, welches nicht durch Enzyme geschnitten wurde. u4u6a46hh2 bezeichnet eine 46 Nukleotide lange RNA nach dem Schneiden von der Substrat-RNA u4u6a46hh2_vs mit dem Hammerhead-Ribozym hh2_3 oder hh2_5. Von modifizierten DNA-Templaten transkribierte RNAs wurden durch Anhängen des Kürzels OMe gekennzeichnet.

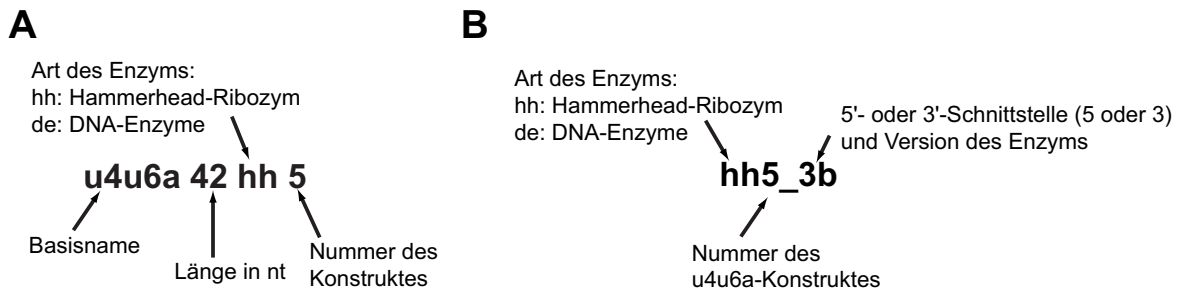


Abbildung 2.23: Benennung der verschiedenen hergestellten RNA-Oligomere. **A** U4U6-A-Konstrukte: Gemeinsam ist die Bezeichnung *u4u6a* zu Beginn, dann folgt die Länge der RNA in Nukleotiden, daran anschließend ob das Konstrukt mit einem Enzym behandelt wurde (*hh* für Hammerhead-Ribozym, *de* für DNA-Enzyme) und die Nummer des Enzyms, mit dem es geschnitten wurde. Ein *vs* am Ende des Namens kennzeichnet die ungeschnittene Substrat-RNA. **B** Die entsprechenden Ribozyme und DNA-Enzyme wurden mit *hh* bzw. *de* benannt, gefolgt von der Nummer des Enzyms. Durch einen Unterstrich getrennt wird die Lage der Schnittstelle angegeben: 5 für das 5'-Ende, 3 für das 3'-Ende. Gab es mehrere Varianten eines Enzyms wurden diese zusätzlich mit *b*, *c*, *d* etc. bezeichnet.

2.7.1 Synthese von u4u6a42 und u4u6a42-OMe von doppelsträngiger Templat-DNA

Um U4/U6-A-RNA herzustellen, ist die direkte Transkription von einem entsprechenden DNA-Templat eine Möglichkeit. Hierzu wird die gewünschte RNA-Sequenz in DNA übersetzt und mit dem T7-Promotor versehen. Für die Transkription muß die Promotorregion der Templat-DNA [159, 160] doppelsträngig sein. Die Effizienz wird weiter erhöht, wenn die erste kodierende Position der Templat-Region ebenfalls doppelsträngig ist. Speziell für die U4U6-A-Sequenz ergaben sich in früheren Arbeiten [122] Probleme bei der Transkription von einem nur in der Promotorregion doppelsträngigen DNA-Templat. Diese wurden auf die Bildung von Sekundärstrukturen der transkribierten RNA mit dem DNA-Einzelstrang während der Transkription zurückgeführt. Daher wurde bei allen in dieser Arbeit beschriebenen Transkriptionen vollständig doppelsträngige Templat-DNA verwendet.

Sequenzdesign

Um ein doppelsträngiges DNA-Templat zu erhalten, wurden die entsprechenden *sense*- und *antisense*-DNA-Stränge zusammen hybridisiert, bzw. die partiell doppelsträngi-

ge DNA aus T7-Promotor und *antisense*-Strang mit Hilfe des Klenow-Fragments zur doppelsträngigen DNA aufgefüllt. Bei der ersten Methode können insbesondere bei langen Sequenzen Probleme mit der Hybridisierung durch falsche oder ungenaue Basenpaarung auftreten, die man bei der zweiten Methode vermeiden kann.

Für die Sequenzen von u4u6a42 und u4u6a42-OMe erhält man so 59 Nukleotide lange doppelsträngige DNA-Template, bestehend aus dem 17 Nukleotiden langen T7-Promotor und der 42 Nukleotiden langen RNA-Sequenz. (Abb. 2.24). Für u4u6a42-

u4u6a42

5' GCG AUU AUU GCU CUU CGG AGC AUG GCC UUC GGG CAG UAU CGC 3' 42 nt

u4u6a42top

5' TAA TAC GAC TCA CTA TA GCG ATT ATT GCT CTT CGG AGC ATG GCC TTC GGG CAG TAT CGC 3'

u4u6a42bot

5' GCG ATA CTG CCC GAA GGC CAT GCT CCG AAG AGC AAT AAT CGC TAT AGT GAG TCG TAT TA 3'

Abbildung 2.24: RNA-Sequenz von u4u6a42 und u4u6a42-OMe (oben) und die entsprechenden DNA-Oligomere für die T7-Transkription (u4u6a42top und u4u6a42bot). In Grün ist die T7-Promotorregion gekennzeichnet. Bei der Verwendung von Klenow-Fragment zur Herstellung braucht man nur den T7-Promotor und den *antisense*-Strang (u4u6a42bot), die nach der Hybridisierung zum Doppelstrang aufgefüllt werden.

OMe wurden die ersten beiden Nukleotide in u4u6a42bot am 5'-Ende durch 2'-Methoxydeoxynukleotide ersetzt, um die Bildung von N+1-Produktion bei der Transkription zu vermindern [175, 176].

Herstellung des doppelsträngigen DNA-Templats

Für eine 4 ml Transkription werden ca. 10 nmol doppelsträngiges DNA-Templat benötigt. Zur Herstellung wurden 10 nmol *antisense*-Strang (u4u6a42bot) und unter 10 %igem Überschuß des T7-Promotors durch kurzes Aufheizen auf 70 °C und anschließendes langsames Abkühlen hybridisiert. Danach wurden 20 Einheiten Klenow-Fragment (New England Biolabs, NEB) und ein dNTP-Mix hinzugegeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde anhand eines 10 %igen nativen Polyacrylamidgels überprüft. Die doppelsträngige DNA läuft im Vergleich zu den einzelsträngigen DNA-Oligomeren entsprechend langsamer (Abb. 2.25 auf der nächsten Seite).

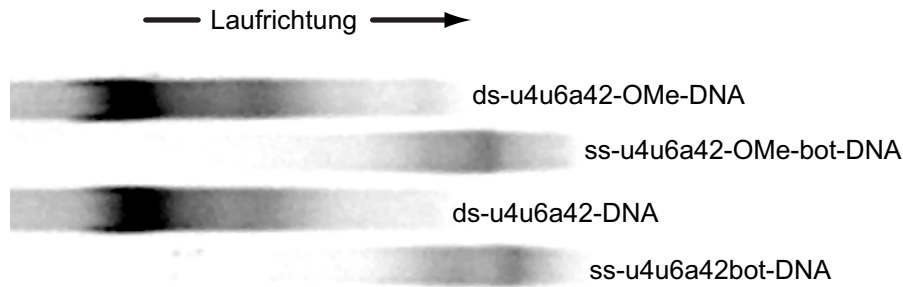


Abbildung 2.25: Natives Polyacrylamidgel (10 %, 3h bei 10 W, Kühlraum +4 °C, Anfärbung: EtBr/UV) der Templat-DNA vor und nach dem Auffüllen der partiell doppelsträngigen Templat-DNA mit Klenowfragment für u4u6a42 und u4u6a42-OMe.

Die doppelsträngige Templat-DNA wurde durch Chloroform/Phenol-Extraktion und anschließende Fällung aus einer ethanolschen Ammoniumacetatlösung isoliert.

Lagen schon beide Einzelstränge komplett mit T7-Promotor vor, wurden sie in Wasser gelöst und in entsprechender Konzentration zusammengegeben und hybridisiert. Diese Lösungen wurden direkt in den Transkriptionen verwendet.

Transkriptionsbedingungen

Die zu optimierenden Parameter bei der Transkription sind im wesentlichen die Konzentration der Magnesiumionen, der NTPs und das Verhältnis von DNA-Templat zu T7-Polymerase sowie die Reaktionszeit (Abschnitt 2.5.2 auf Seite 26). Hierbei wurde die Magnesiumionenkonzentration immer höher als die der NTPs gewählt, weil die Nukleotide auf jeden Fall mit Magnesium komplexiert sein müssen, um für die Transkription zu Verfügung zu stehen.

Für die beiden RNAs ergaben sich folgende optimale Bedingungen: 10 mM NTPs, 24 mM Mg²⁺, 100 pmol ds-DNA-Templat, 2 µl T7-Polymerase-Lsg. bei einem Gesamtvolumen von 40 µl. Die Variation der Reaktionsdauer ergab keine Unterschiede in der Effizienz, ein großer Unterschied zu der Transkription von Plasmid-Templaten.

Die Transkriptionen von u4u6a42 und u4u6a42-OMe verlaufen unterschiedlich. So wird im Falle von u4u6a42 ein 1:1 Gemisch der gewünschten RNA mit 42 nt (N)

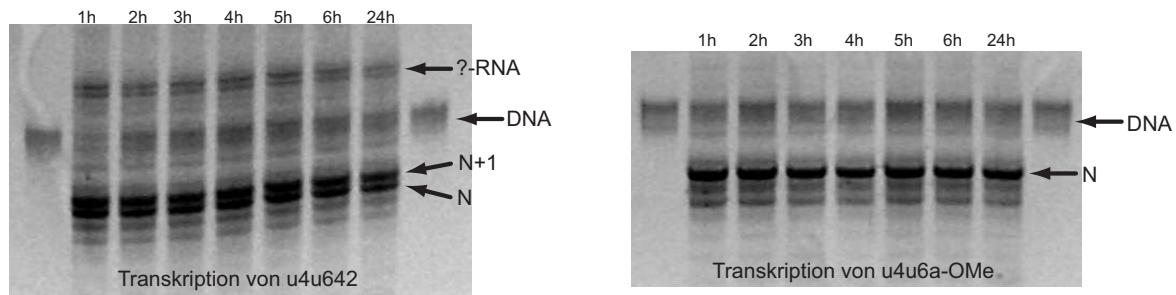


Abbildung 2.26: Gele (20 % Polyacrylamid, 7 M Harnstoff, 4 h, 20 W) der zeitlichen Optimierung der Transkription von u4u6a42 und u4u6a42-OMe. Schon nach ca. 1h ist die Transkription vollständig und danach ändert sich die Produktzusammensetzung nicht mehr wesentlich. Die Transkription des 2'-OMe modifizierten DNA-Templates (rechtes Gel) ergibt eine deutliche Verbesserung der Ausbeute des Vollängenproduktes, außerdem werden keine zusätzlichen wesentlich größeren RNAs als die Ziel-RNA gebildet wie im Falle von u4u6a42 (linkes Gel, die entsprechende Bande ist mit ?-RNA gekennzeichnet).

und des N+1-Produktes gebildet, während im Fall der 2'-OMe-Modifikation im DNA-Templatstrang nur eine dominante Hauptbande bei 42 nt zu beobachten ist. Zusätzlich werden in beiden Ansätzen noch N-1- und N-2-Produkte gefunden. Allerdings läßt sich das Verhältnis aufgrund EtBr-Anfärbung, die oftmals falsche Verhältnisse vortäuscht, nicht exakt bestimmen. Auffällig ist im Falle der u4u6a42 die zusätzliche RNA-Bande oberhalb der Bande der Templat-DNA mit einer Länge von ca. 65 nt (?-RNA). Ihre Herkunft ist ungeklärt, allerdings taucht sie bei der Verwendung von 2'-OMe DNA-Templaten nicht auf (Abb. 2.26).

4ml Synthese von u4u6a42

Um größere Mengen der gewünschten RNA zu produzieren, wurden die Ansätze aus der Optimierung auf 4 ml linear hochskaliert. Bei größeren Volumina ist darauf zu achten, daß die verwendeten Lösungen Raumtemperatur haben, um temporäre Ausfällungen zu vermeiden. Beim präparativen Ansatz wurden nach Ende der Transkription noch 200 Einheiten von DNase I (Boehringer-Ingelheim) zugegeben, um das DNA-Templat zu zerstören und so die Aufarbeitung zu erleichtern.

Die transkribierte RNA wird, wie bei den Optimierungsreaktionen auch, durch Chloroform/Phenol-Extraktion und durch anschließende Fällung aus einer ethanolschen Am-

moniumacetatlösung von der T7-Polymerase abgetrennt. Die weitere Aufreinigung erfolgte dann mittels denaturierender Anionenaustauscher-HPLC.

Da für größere Transkriptionsansätze von u4u6a42-OMe entsprechende Mengen an 2'-OMe modifizierter Templat-DNA benötigt werden, wurde diese Methode nicht für die präparative Herstellung von RNA verwendet.

Aufreinigung

Die präparative Aufreinigung mittels Anionenaustauscher-HPLC wurde mit Nucleogen DEAE 60-7 Säulen der Firma Machery-Nagel (Düren) durchgeführt. Als Puffer A

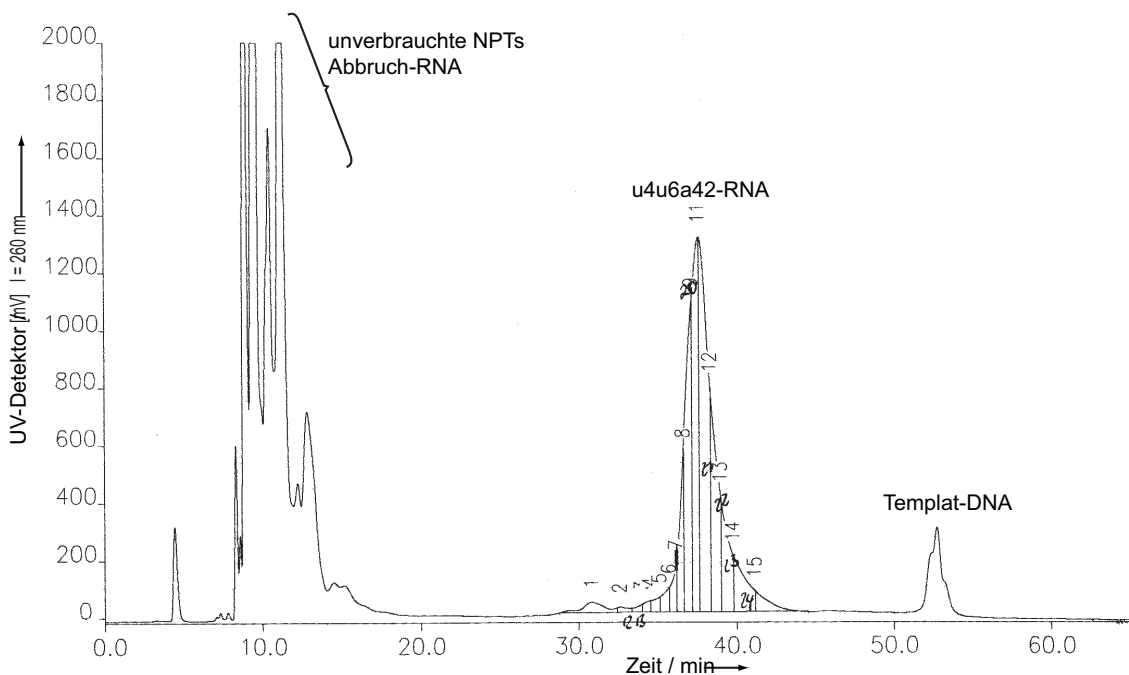


Abbildung 2.27: Chromatogramm einer präparativen HPLC-Aufreinigung von u4u6a42. Puffer A: 20 mM K_2HPO_4 , 5 M Harnstoff, pH = 6.5, Puffer B: Puffer A + 1 M KCl. Säule: Nucleogen DEAE 60-7, 10 x 125 mm (Machery & Nagel, Düren). Gradient: 0 min. 100 % A, 5 min. 30 % B, 55 min. 60 % B, 70 min. 80 % B, 75 min. 100 % B, 80 min. 100 % B, 85 min. 100 % A. In der Zeit von 8 bis 18 Minuten werden die unverbrauchten Nukleotide und Abbruchsequenzen eluiert, die den Großteil der Probe ausmachen. Zwischen 35 und 45 min. wird dann u4u6a42 eluiert, allerdings ist die Menge im Vergleich zu den Abbruchsequenzen bedeutend geringer.

wurde eine 20 mM K_2HPO_4 -Lösung, pH = 6.5 und Zusatz von 5 M Harnstoff verwendet, Puffer B entspricht Puffer A mit Zusatz von 1 M Kaliumchlorid. Die RNA wird nach Bindung an den Anionenaustauscher mittels eines KCl-Gradienten eluiert. Durch Zugabe von Harnstoff werden denaturierende Bedingungen geschaffen, die die Anzahl möglicher Konformere der RNA reduziert und somit die Trennung aufgrund der Länge erleichtern sollte. Für die analytischen Voruntersuchungen wurde eine Säule von 4 x 125 mm und eine Flußrate von 1 ml/min. verwendet, in den präparativen Läufen eine Säule von 10 x 125 mm und ein Fluß von 3.6 ml/min. In Abb. 2.27 auf der vorherigen Seite ist ein typischer präparativer HPLC-Lauf dargestellt.

Trotz der denaturierenden Bedingungen erreicht man keine Auflösung von einem Nucleotid, so daß der Produktpeak in mehrere Fraktionen unterteilt werden mußte. Anschließend wurden die gesammelten Fraktionen auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel untersucht. Die Fraktionen der RNA mit der passenden Länge wurden vereinigt (2.28).

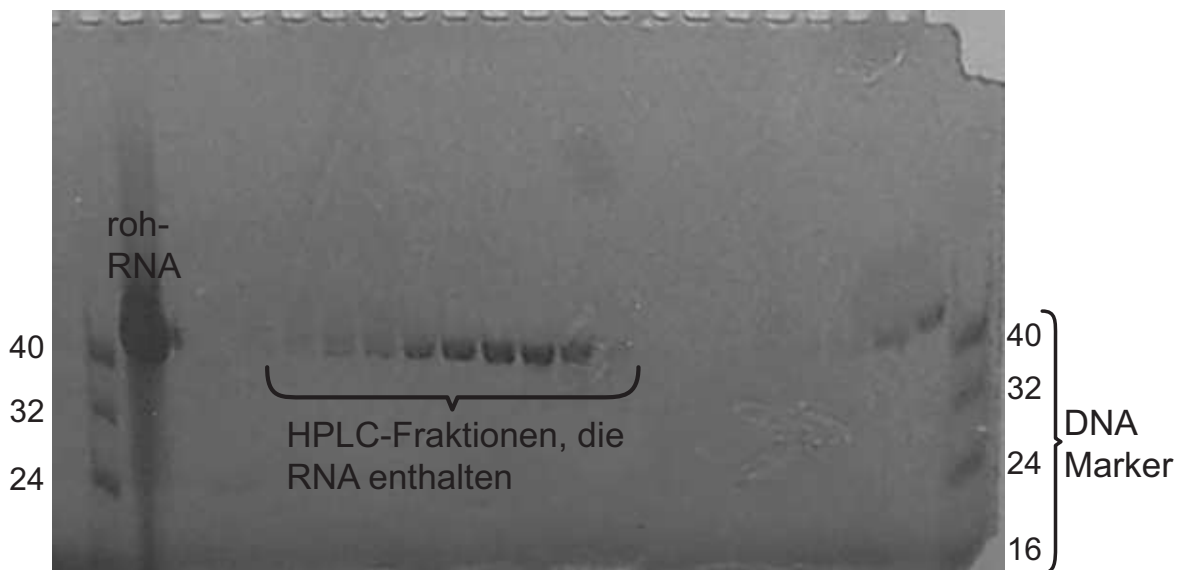


Abbildung 2.28: Denaturierendes Gel (15 % Polyacrylamid, 8 M Harnstoff, 2 h, 20 W) der Fraktionen aus der HPLC-Aufreinigung von u4u6a42 über eine Nucleogen DEAE 60-7.

Die gesammelten Fraktion enthalten noch 5 M Harnstoff, der über eine Größenausschlußsäule (Sephadex G15) von 4,5 x 80 cm entfernt wird. Durch Aufkonzentrieren im Vakuumkonzentrator konnten Rückgewinnungsraten von mehr als 90 % (UV) erzielt werden, wobei der Salzgehalt auf 1 % reduziert werden konnte. Trotzdem sind weitere Entsalzungsschritte mit Mikrokonzentratoren nötig.

Nach den weiteren Entsalzungsschritten wurde nochmals ein denaturierendes Gel der hergestellten u4u6a42-RNA gemacht. Statt der erwarteten einzelnen Bande wurde jedoch zwei gefunden, d.h. die hergestellte RNA liegt als Gemisch von zwei RNA unterschiedlicher Länge vor. Es wurde davon ausgegangen, daß die RNA nur am 3'-Ende inhomogen vorliegt und die Unterschiede in den NMR-Spektren gering ausfallen sollten.

Mit der hier vorgestellten Aufreinigungsprozedur ließen sich aus einer 4 ml Transkription von u4u6a42 durchschnittlich 270 nmol (ca. 4 mg) RNA isolieren. Diese Menge war ausreichend für erste NMR-Messungen. Es wurden Ausbeuten von 1-10 % bezogen auf die eingesetzten, unmarkierten Nukleotidtriphosphate erzielt.

NMR-Spektroskopie

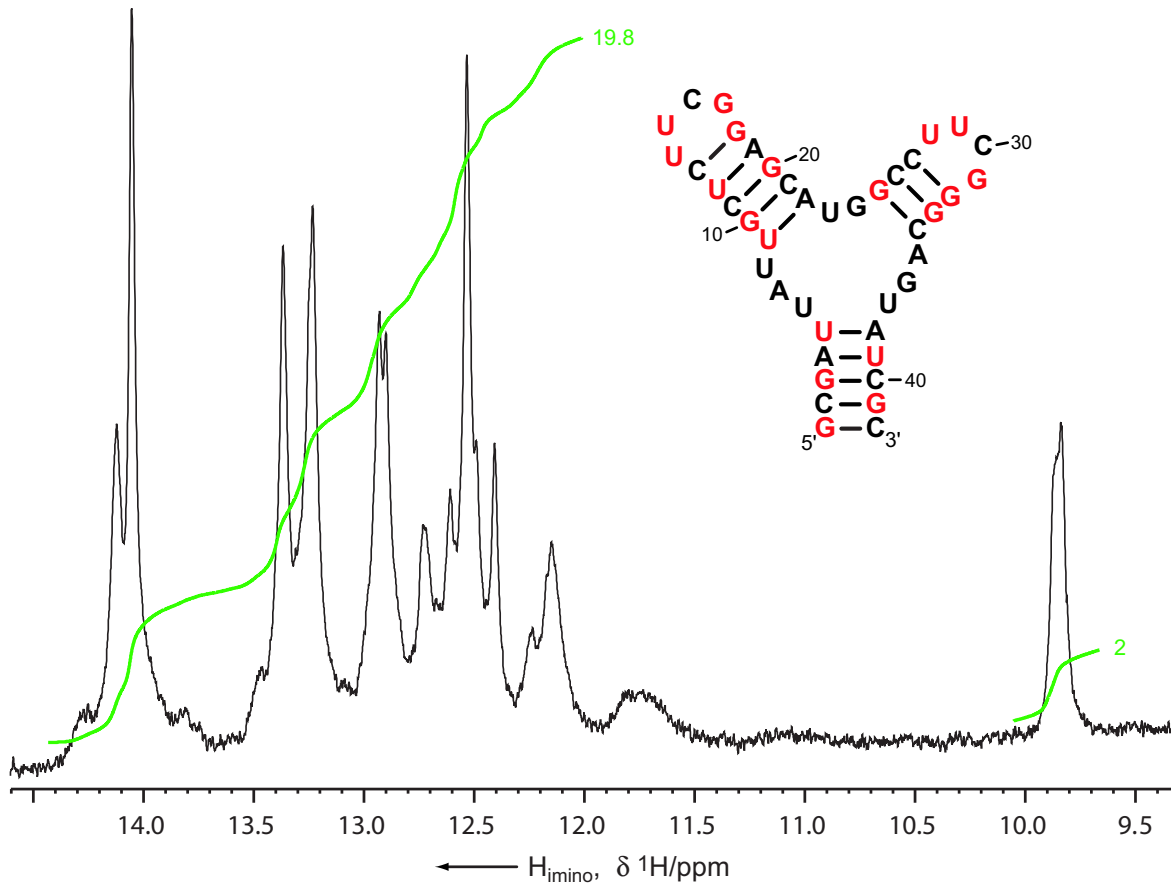


Abbildung 2.29: Iminobereich des J&R-Echo-Protonenspektrums der u4u6a42-RNA ($T=290$ K, 600 MHz). In grün sind die Integrale über die Iminoprotonen angegeben. Auffällig ist das separierte Signal der Guanosin-Iminoprotonen aus den beiden UUUG-Schleifen [114, 115] bei 9.85 ppm.

Die entsalzte u4u6a42-RNA wurde in einer Konzentration von 1 mM für die NMR-Messungen eingesetzt. Es wurde in einem 10 mM Kaliumphosphatpuffer mit 100 mM NaCl und 10 mM $MgCl_2$, dem 10 % D_2O zugesetzt waren, bei einem pH von 6.6 gemessen. Die beste Auflösung der Iminosignale wurde bei einer Temperatur von 290 K erreicht. Diese Temperatur wurde für alle weiteren Messungen beibehalten. Es wurden ein- und zweidimensionale Jump & Return-Echo Spektren gemessen [218], um Korrelationen der Iminoprotonen aufzulösen und daraus auf die Anzahl der vorliegenden Konformere der RNA zu schließen.

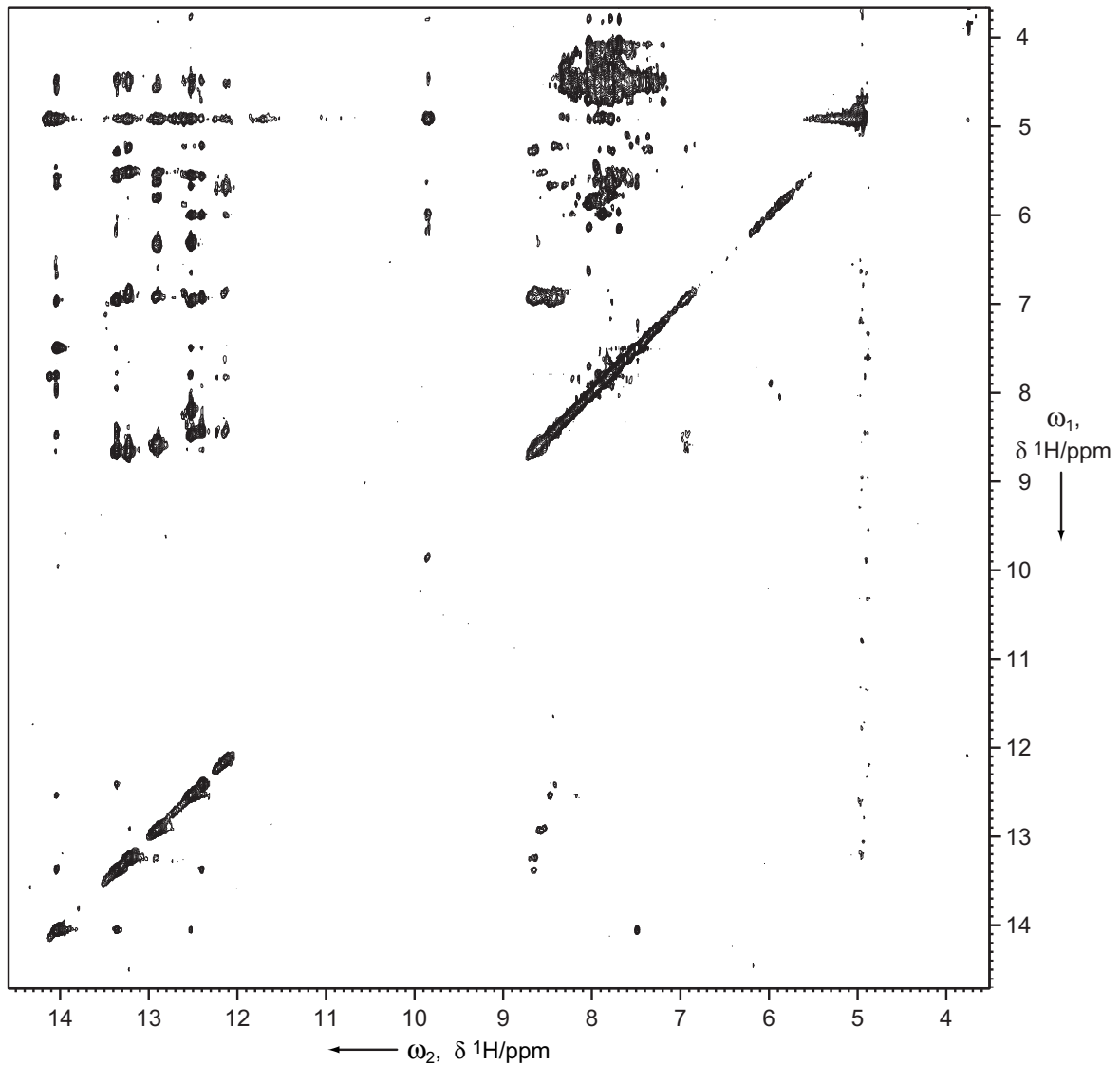


Abbildung 2.30: Ausschnitt aus dem 2D-J&R-NOESY-Spektrum von *u4u6a42*-RNA. ($T=290\text{ K}$, $\tau_m=300\text{ ms}$, 600 MHz) Gezeigt sind die Regionen der Imino- und Aromatensignale.

Im Bereich der in Wasserstoffbrücken eingebundenen Iminoprotonen im eindimensionalen Protonenspektrums (Abb. 2.29 auf der vorherigen Seite) erhält man durch Integration 22 Signale, wenn man das Signal bei 9.85 ppm auf eine Fläche von 2 eicht. Dieses Signal entspricht den beiden Iminoprotonen der Guanine in den UUCG-Schleifen [114,115]. Die Anzahl der gefundenen Signale entspricht der Größenordnung der Anzahl der erwarteten Signale. Nimmt man die in Abb. 2.29 auf der vorherigen Seite gezeigte Sekundärstruktur an, kommt man mit den rot gekennzeichneten Imino-

protonen der Basen auf 19. Daher kann man davon ausgehen, daß die RNAs vorrangig nur in einer Konformation mit den beiden UUCG-Schleifen vorliegen.

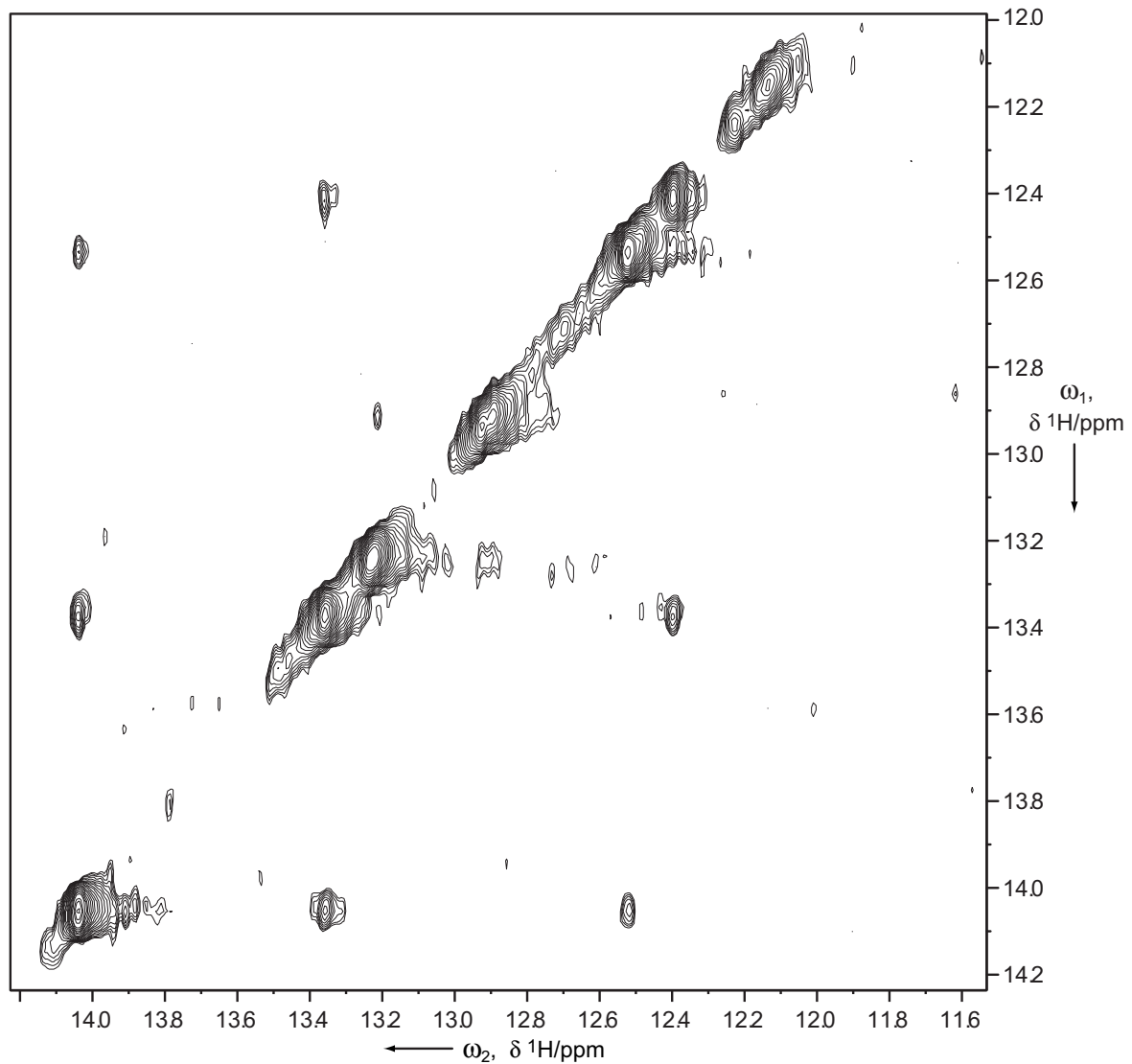


Abbildung 2.31: Iminoregion des 2D-J&R-NOESY-Spektrums von *u4u6a42* ($T=290$ K, $\tau_m=300$ ms, 600 MHz). Es sind mindestens fünf deutliche Kreuzsignale zwischen den Iminoprotonen zu erkennen.

Im zweidimensionalen J&R-NOESY mit einer Mischzeit von 300 ms erkennt man zahlreiche Kreuzsignale, die ebenfalls auf das Vorliegen einer gefalteten RNA hindeuten (Abb. 2.30 auf der vorherigen Seite). Ein detaillierter Blick auf die Kreuzsignale der Iminoregion (Abb. 2.31) ergibt mindestens fünf deutliche Kreuzsignale, deren Zuord-

nung allerdings nicht möglich ist, weil sich die Basenpaare in verschiedenen Stämmen wiederholen. Trotz der Längeninhomogenität scheint die u4u6a42-RNA nur in einer Konformation vorzuliegen.

2.7.2 Synthese von u4u6a42 von Plasmid-Templat-DNA

Um die Synthese doppelsträngiger DNA-Templates zu vereinfachen und den Einsatz von Klenow-Fragment und großer Mengen einzelsträngiger *antisense*-DNA-Oligomere zu reduzieren, wurde die Transkription auf plasmidische DNA-Templates umgestellt. Zur Etablierung der Synthese von RNA durch Transkription von einer plasmidischen Templat-DNA wurde u4u6a42 als Sequenz verwendet. Um u4u6a42-RNA von einer plasmidischen Templat-DNA zu transkribieren, muß die Sequenz in DNA übersetzt und mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen ausgestattet werden, um sie in ein Plasmid zu klonieren.

u4u6a42

5' GCG AUU AUU GCU CUU CGG AGC AUG GCC UUC GGG CAG UAU CGC 3' 42 nt

u4u6a42top-plasmid

5' AAT TC TAA TAC GAC TCA CTA TA GCG ATT ATT GCT CTT CGG AGC ATG GCC TTC GGG CAG TAT CGC CTG CAG A 3'

u4u6a42bot-plasmid

5' AGC TT CTG CAG GCG ATA CTG CCC GAA GGC CAT GCT CCG AAG AGC AAT AAT CGC TAT AGT GAG TCG TAT TA G 3'

Transkribierte Sequenz:

5' AATTC TAATACGACTCACTATAGCGATTATTGCTCTTCGGAGCATGGCCTTCGGGCAGTATCGCCTGCA|GA 3'

3' GATTATGCTGAGTGATATCGCTAATAACGAGAAGCCTCGTACCGGAAGCCCGTCATAGCGG|ACGTCCTCGA 5'

RNA

5' GCG AUU AUU GCU CUU CGG AGC AUG GCC UUC GGG CAG UAU CGC C 3' 43nt

Abbildung 2.32: Sequenzen für die Einklonierung in pUC19 von u4u6a42-Plasmid. In Grün ist der T7-Promotor gekennzeichnet, in Pink die EcoR I-Schnittstelle, in Rot die Pst I-Schnittstelle und Türkis die Hind III-Schnittstelle. Nach dem Schneiden an der Pst I-Schnittstellen wird die gelb unterlegte Region der Templat-DNA transkribiert, welche in einer um ein C verlängerten RNA resultiert.

In den beschriebenen Fällen wurde pUC19 als Plasmid verwendet, da es keinen T7-Promotor wie viele andere Plasmide enthält, so daß es keine Vorgaben bezüglich der Schnittstellen und der Anordnung in Bezug auf den T7-Promotor gibt. Daher mußte zusätzlich der T7-Promotor an die gewünschte RNA-Sequenz anhängt werden. Zur Linearisierung nach der Klonierung und erfolgreichen Vervielfältigung des Plasmids wird als Schnittstelle Pst I verwendet. Durch die Pst I-Schnittstelle wird die transkribierte RNA-Sequenz am 3'-Ende um ein C verlängert. Dies läßt sich nur verhindern,

wenn die transkribierte RNA nochmals mit einem RNA- oder DNA-Enzym geschnitten wird. Für die Transkription von u4u6a42-RNA vom Plasmid ergeben sich somit die in (Abb. 2.32 auf der vorherigen Seite) gezeigten RNA- und DNA-Sequenzen.

Plasmid-DNA als Templat

Um die Templat-DNA in das Plasmid zu klonieren, wird ein pUC19-Plasmid mit den beiden Restriktionsenzymen Eco RI und Hind III aufgeschnitten. Das so präparierte, offene Plasmid wird isoliert und kann dann für die Ligationsreaktion der Templat-DNA in pUC19 verwendet werden. Für die Ligation werden Templat-DNA und das offene pUC19-Plasmid gemischt und bei 16 °C mit T4-Ligase über Nacht inkubiert (Abschnitt 2.5.2 auf Seite 23). Nach der Transformation in BL21-Zellen wird die Ligation anhand einer PCR-Reaktion mit ungeschnittenen pUC19-Plasmiden als Referenz überprüft: Erfolgreiche Insertionen sind an einer langsam laufenden Bande im Vergleich zur Referenz erkennbar, da die amplifizierte Sequenz ca. 80-100 Nukleotide länger ist (Abb. 2.33).

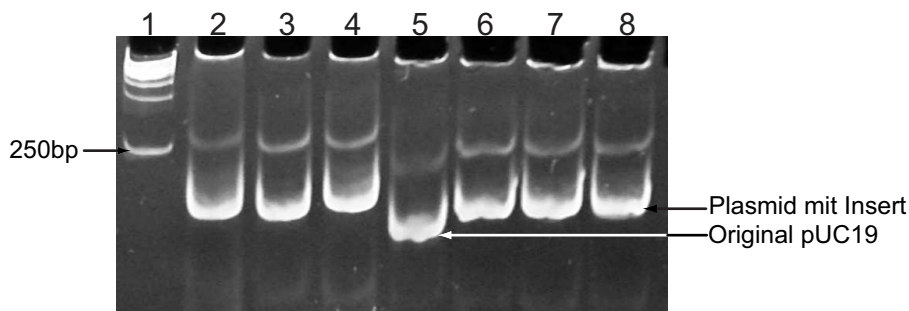


Abbildung 2.33: Natives Polyacrylamidgel (5 %, 1.5 h bei 70 V, Anfärbung: EtBr/UV) zur Kontrolle nach der PCR-Reaktion auf insertierte Templat-DNA in den pUC19-Vektor. In Spur 1 ist Marker aufgetragen, die unterste Bande entspricht einer 250 Basenpaaren langen doppelsträngigen DNA. Die Spuren 2–4 und 6–8 zeigen Plasmidabschnitte mit dem jeweiligen Insert, Spur 5 zeigt den PCR-amplifizierten Plasmidabschnitt von reinem pUC19-Vektor.

Das modifizierte pUC19-Plasmid wird in *E. coli* in größere Maßstab vervielfältigt (1 l Kulturen), mittels des Plasmid Mega Kit der Firma Qiagen (Hilden) isoliert und mit der Restriktionsendonuklease Pst I aufgeschnitten. Das so linearisierte Plasmid wird durch Fällung mit Isopropanol isoliert und kann nach Trocknung und Auflösen in Wasser für die Transkription verwendet werden.

Transkriptionsbedingungen

Die Transkriptionsbedingungen für Plasmide unterscheiden sich sehr von denen der Transkription von synthetischen doppelsträngigen DNA-Templaten. Die optimalen Bedingungen für u4u6a42 für eine 40 μ l-Transkription von plasmidischem DNA-Templat liegen bei 30 mM NTPs, 35 mM Magnesiumchlorid, 1.8 μ g Plasmid-DNA und 6 μ l T7-Polymerase (6.2 mg/ml). Abb. 2.34 zeigt ein Gel der unterschiedlichen Optimierungsbedingungen. Deutlich zu erkennen ist die unterschiedliche Ausbeute an u4u6a42-RNA und die Bildung von N+1- und N+2-Produkten.

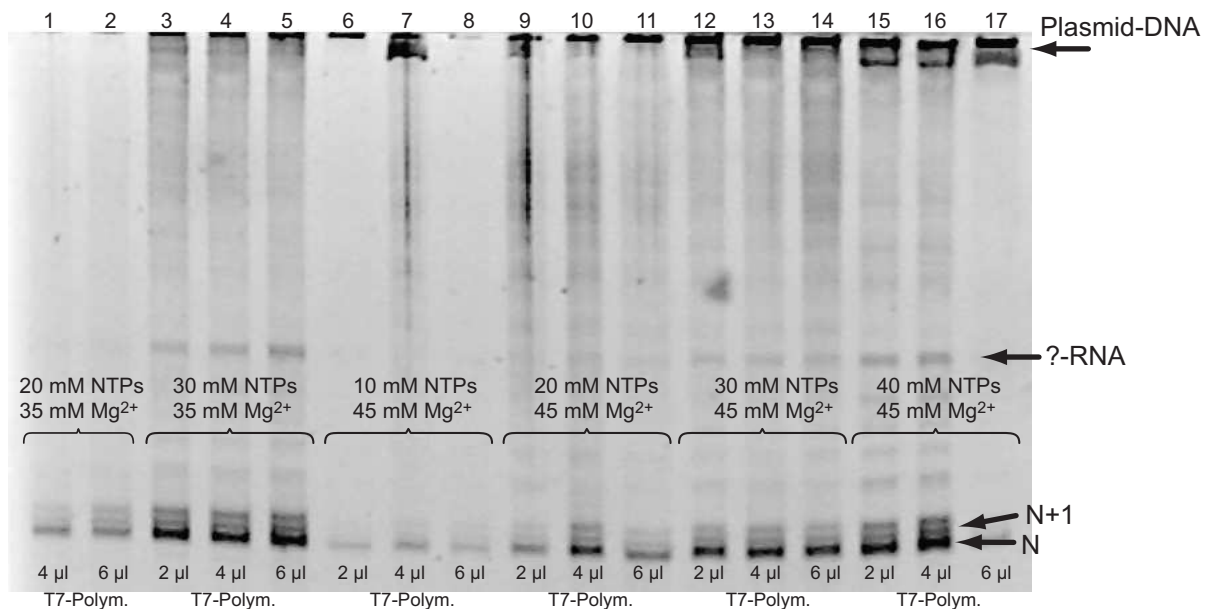


Abbildung 2.34: Denaturierendes Polyacrylamidgel (20 %, 7 M Harnstoff, 2h bei 50 W, Anfärbung: EtBr/UV) verschiedener Transkriptionsbedingungen von u4u6a42-RNA von plasmidischem DNA-Templat. Die Plasmidmenge wurde konstant gehalten, während die Konzentration an NTPs, Magnesiumchlorid und T7-Polymerase variiert wurde.

Aufreinigung

Nach der Etablierung der Transkription bei den optimalen Bedingungen im 40 μ l-Maßstab wurde die Reaktion auf 2 ml skaliert, um die Aufreinigung mittels Anionenaustauscher-HPLC zu etablieren. Hierbei wurde auf die DNAPac 100-Säule der Firma

Dionex gewechselt, da diese auch bei hohen Temperaturen (bis 90 °C) betrieben werden kann und so denaturierende Bedingungen ohne Zusatz von Harnstoff schafft. Es entfällt somit der Entsalzungsschritt über die Sephadex G15-Säule, um den Harnstoff zu entfernen.

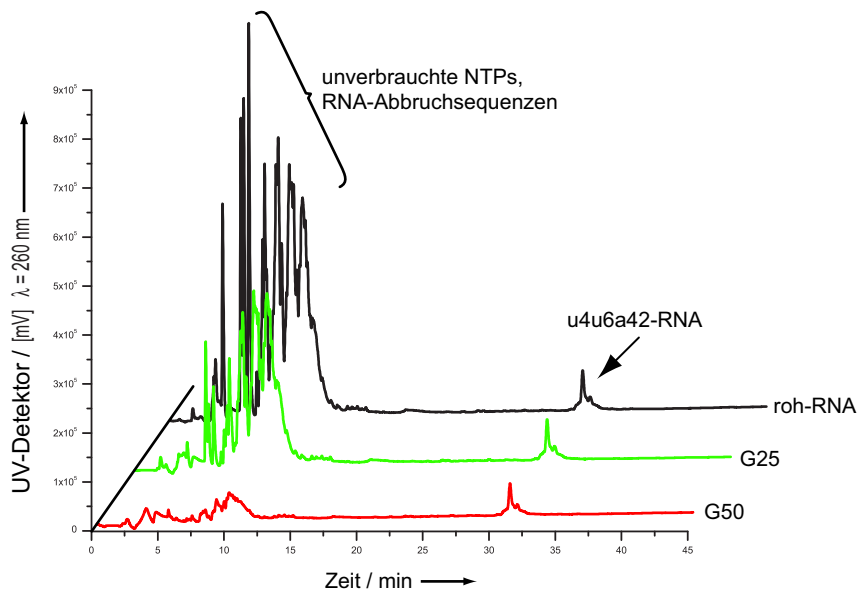


Abbildung 2.35: HPLC-Chromatogramme der mit verschiedenen Methoden vorgereinigten u4u6a42-RNAs. Puffer A: 25 mM TRIS, 2 mM EDTA pH 8.0; Puffer B: Puffer A + 1 M NH_4Cl . Säule: DNAPac PA 100, 4 x 250 mm (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Gradient: 0-55 % B 11 min., 55-100 % B 34 min., 100 % B 5 min., 100% B 5 min., 100 % A 5 min., 100% A 5 min. Flußrate: 1 ml/min. In schwarz ist die roh-RNA gekennzeichnet, in grün die über eine G25-M und in rot über eine G50-Säule gereinigte RNA. Man erkennt deutlich die Verringerung der NTPs und RNA-Abbruchsequenzen im Vergleich zur roh-RNA. Allerdings übertrifft ihr Anteil weiterhin den der u4u6a42-RNA um ein Vielfaches.

Ein Problem bei der Aufreinigung mittels HPLC stellen der große Anteil an nicht eingebauten Nukleotiden und die Abbruchsequenzen dar, dessen Konzentration im Vergleich zur gewünschten RNA um ein Vielfaches höher ist. Um die HPLC-Säule nicht zu überladen, muß entweder die Probe auf mehrere HPLC-Läufe verteilt oder die unverbrauchten NTPs und RNA-Abbruchsequenzen durch andere Methoden entfernt werden.

Hierzu wurden jeweils 2 ml Transkriptionen von u4u6a42-RNA von plasmidischer DNA verwendet und mittels Chloroform/Phenol-Extraktion aufgearbeitet. Die erhaltene roh-RNA wurde dann über verschiedene Säulenmaterialien vorgereinigt. Es wur-

de Sephadex G-25 M in Amersham Pharmacia PD-10 Säulen und Sephadex G-50 in Gravitationssäulen verwendet. Die Säulen hatten ungefähr das gleiche Volumen und wurden mit Wasser äquilibriert. Je 1 mg der roh-RNA wurde in 2.5 ml Wasser gelöst und auf die Säulen gegeben. Anschließend wurde mit 3.5 ml Wasser eluiert und die Fraktionen gesammelt. Die Lösungen wurden am Vakuumkonzentrator eingedampft und der Rückstand in 500 μ l HPLC-Puffer A aufgenommen. Für die analytischen Läufe wurden jeweils 50 μ l der Lösung eingespritzt.

Wie Abb. 2.35 auf der vorherigen Seite zeigt, nimmt der Anteil von NTPs und Abbruchsequenzen beim Wechsel von G25- auf G50-Säulenmaterial deutlich ab. Allerdings nimmt bei der Verwendung von Sephadex G50-Säulenmaterial auch die Konzentration der Zielsequenz ab. Durch die Verwendung von Sephadex-G25 lassen sich die unerwünschten Nebenprodukte um ca. 40 % verringern. Allerdings ist ihre Konzentration im Vergleich zur Ziel-RNA immer noch sehr hoch. Zusätzlich ist dieser Reinigungsschritt zeitaufwendig, da das Volumen der RNA-Lösungen nochmals verringert werden muß, um sie dann bei der HPLC verwenden zu können. Eine Verteilung auf mehrere HPLC-Läufe mit anschließender Vereinigung der reinen Fraktionen ist vom Aufwand her ähnlich. Daher wurde die vorherige Abtrennung der nicht eingebauten NTPs und Abbruchsequenzen in den weiteren Ansätzen nicht weiterverfolgt.

2.7.3 Synthese von u4u6a46hh1

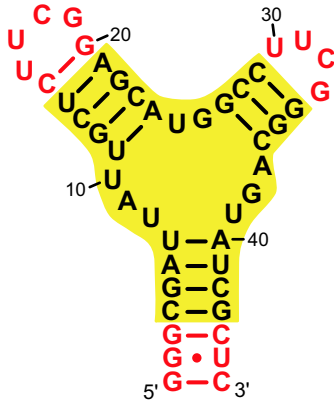


Abbildung 2.36: Sekundärstruktur von u4u6a46hh1

Um RNA-Oligomere von definierter Länge herstellen zu können, müssen die transkribierten Substrat-RNAs an einer definierten Stelle mit RNA- oder DNA-Enzymen geschnitten werden. Hierzu muß die transkribierte RNA um wenige Basen und die Schnittstelle ergänzt werden. Um dieses Konzept umzusetzen, wurde die u4u6a46hh1-RNA Sequenz mit folgender wahrscheinlicher Sekundärstruktur (Abb. 2.36) entworfen. Die RNA ist 46 Basenpaare lang und enthält zwei zusätzliche Basenpaare (G-C und G-U) am Ende. Das entsprechende Ribozym schneidet nach der CUC-Sequenz am 3'-Ende der RNA. Um die Schneidreaktion zu ermöglichen, muß die

gewünschte RNA-Sequenz um 5-8 Basen am 3'-Ende erweitert werden, die dann als Bindungsarme für das Ribozym dienen können (Sequenz rechts vom Pfeil in Abb. 2.37). Entsprechend muß das Ribozym die Schnittstelle eindeutig über Basenpaarungen erkennen können. Bei bekannter Sequenz ergibt sich für u4u6a46hh1 folgende zu transkribierende Sequenz u4u6a46hh1_vs von 52 Nukleotiden Länge (Abb. 2.37).

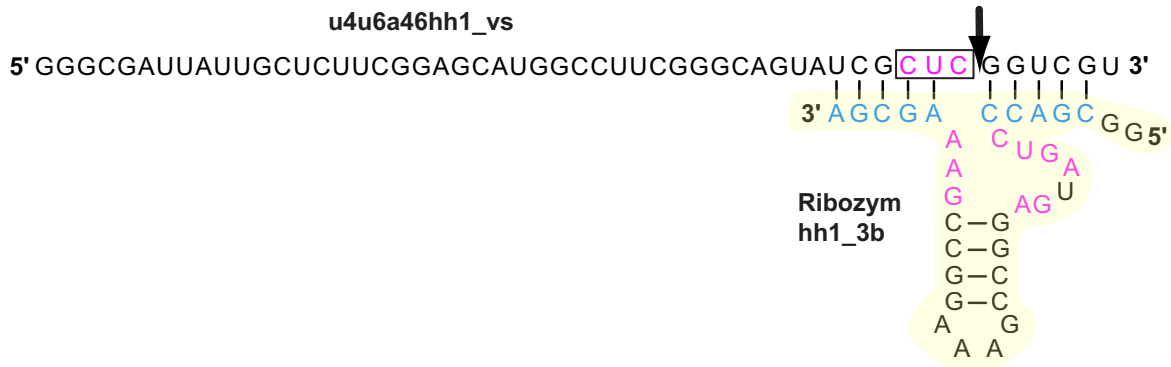


Abbildung 2.37: Design des Ribozyms hh1_3b, um die transkribierte u4u6a46hh1_vs-RNA zu schneiden. Das Ribozym bindet über zwei Bindungsarme (blau) an die RNA und schneidet nach Zugabe von Magnesiumionen nach der CUC-Sequenz (im Kasten). Man erhält die gewünschte 46 nt lange u4u6a46hh1-RNA.

Das entsprechende Ribozym hh1_3b ist insgesamt 34 Basen lang, es besteht ein Größenunterschied von zwölf Nukleotiden zur geschnittenen u4u6a46hh1-RNA. Dies sollte

ausreichen, um eine Reinigung per HPLC oder Gelelektrophorese durchführen zu können. Analog zur u4u6a42-RNA ergeben sich die DNA-Sequenzen für die Klonierung in den pUC19-Vektor, um die Transkription von plasmidischer DNA zu ermöglichen (Abb. 2.38). Die Plasmid-DNA für das Ribozym wird auf die gleiche Art hergestellt.

u4u6a46hh1

5' GG GCG AUU AUU GCU CUU CGG AGC AUG GCC UUC GGG CAG UAU CGC UC 3' 46 nt

u4u6a46hh1_vs

5' GG GCG AUU AUU GCU CUU CGG AGC AUG GCC UUC GGG CAG UAU CGC UC GGU CGU 3' 52 nt

u4u6a46hh1_vs_top

5' AAT TC TAA TAC GAC TCA CTA TA GG GCG ATT ATT GCT CTT CGG AGC ATG GCC TTC GGG CAG TAT CGC TC GGT CGT CTG CAG A 3'

u4u6a46hh1_vs_bot

5' AGC TT CTG CAG ACG ACC GA GCG ATA CTG CCC GAA GGC CAT GCT CCG AAG AGC AAT AAT CGC CC TAT AGT GAG TCG TAT TA G 3'

Transkribierte Sequenz:

5' AATTC TAATACGACTCACTATA GGGCGATTATTGCTCTTCGGAGCATGGCCCTTCGGGCAGTATCGCTCGGTCGTCTGCA|GA 3'
 3' GATTATGCTGAGTGATAT CCGCTAATAACGAGAAGCCTCGTACCCGAAGCCCGTCATAGCGAGCCAGCA|ACGTCCTCGA 5'

Transkribierte RNA

5' GGG CGA UUA UUG CUC UUC GGA GCA UGG CCU UCG GGC AGU AUC GCU CGG UCG UC 3' 53 nt

Ribozyme dazu:

hh1_3b

5' GGC GAC CCU GAU GAG GCC GAA AGG CCG AAA GCG A 3' 34 nt

hh1_3b_top

5' AAT TC TAA TAC GAC TCA CTA TA GGC GAC CCT GAT GAG GCC GAA AGG CCG AAA GCG A CTG CAG A 3'

hh1_3b_bot

5' AGC TT CTG CAG T CGC TTT CGG CCT TTC GGC CTC ATC AGG GTC GCC TAT AGT GAG TCG TAT TA G 3'

Abbildung 2.38: Sequenzen für die Einklonierung in pUC19 von u4u6a46hh1-Plasmid. In Grün ist der T7-Promotor gekennzeichnet, in Pink die EcoR I-Schnittstelle, in Rot die Pst I-Schnittstelle und Türkis die Hind III-Schnittstelle. Nach dem Schneiden an der Pst I-Schnittstellen wird die gelb unterlegte Region der Templat-DNA transkribiert, welche in einer um ein C verlängerten RNA resultiert. Außerdem sind die Sequenzen des zum Schneiden verwendeten Ribozyme hh1_3b angegeben.

Transkriptionsbedingungen

Für die beiden verschiedenen Konstrukte ergaben sich die folgenden optimierten Transkriptionsbedingungen (40- μ l-Ansatz):

u4u6a46hh1_vs: 40 mM NTPs, 45 mM Mg²⁺, 1.4 μ g Plasmid und 4 μ l T7-Polymerase;
 hh1_3b: 40 mM NTPs, 45 mM Mg²⁺, 1.4 μ g Plasmid und 2 μ l T7-Polymerase. Es wurden verschieden große Ansätze (2, 10 und 20 ml) von u4u6a46hh1_vs und hh1_3b transkribiert, um unterschiedliche Reinigungsbedingungen und ihre Auswirkungen auf die Effizienz der Schneidreaktion zu untersuchen. Alle Transkriptionen wurden mittels

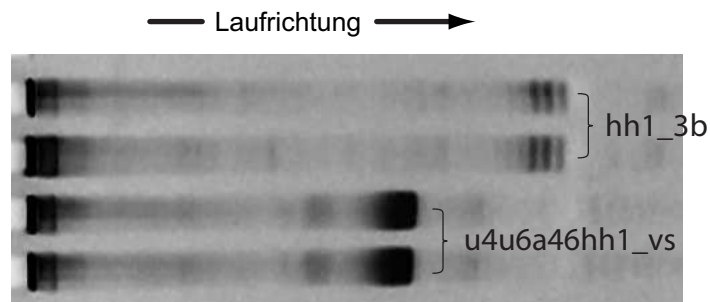


Abbildung 2.39: Denaturierendes Polyacrylamidgel (15 %, 7 M Harnstoff, 1.5 h bei 20 W, Anfärbung: EtBr/UV) der Transkription von *u4u6a46hh1_vs* und *hh1_3b* unter optimierten Bedingungen. Bei beiden RNAs sind deutlich mehr als eine Bande zu erkennen. Im Falle des Ribozyms sogar 4. Diese große Heterogenität rührt von Inhomogenitäten am 3'- und 5'-Ende her.

Chloroform/Phenol-Extraktion aufgearbeitet, um die T7-Polymerase abzutrennen. Im weiteren Verlauf wurde diese roh-RNA weiter aufgereinigt und dann in der Schneidreaktion eingesetzt.

Aufreinigung

Für die Aufreinigung der RNAs für die Schneidreaktion wurden verschiedene Verfahren getestet: Entsalzung über eine G25-Säule, HPLC- und Gelaufreinigung.

Da die Kapazität der PD-10-Säulen nicht für die Aufreinigung der roh-RNA einer 2 ml Transkription ausreicht, wurde eine größere Säule von 1.4 x 20.5 cm mit Sephadex G25-Material gepackt und zur Aufreinigung der roh-RNA eingesetzt. Die roh-RNA von *hh1_3b* und *u4u6a46hh1_vs* einer 2 ml Transkription wurden in 1.6 ml Wasser gelöst und über eine 5 ml-Probenschleife auf die Säule mit einer Flußrate von 1.3 ml/min aufgegeben. Die Trennung der Salze und nicht eingebauten NTPs konnte über die Detektion der UV-Absorption bei $\lambda = 254$ nm und der Leitfähigkeit verfolgt werden (Abb. 2.40 auf der nächsten Seite). Es wurde keine vollständige Abtrennung der NTPs und Abbruchsequenzen von der RNA erzielt, vielmehr gehen die Fraktionen ineinander über. Daher wurden Fraktionen von 2 ml aufgefangen und per denaturierenden Polyacrylamidgel untersucht.

Die Fraktionen mit der RNA wurden vereinigt und mit Natriumchloridlösung auf einen Salzgehalt von 0.3 M gebracht und mit 0.9 Volumenteilen Isopropanol über Nacht im

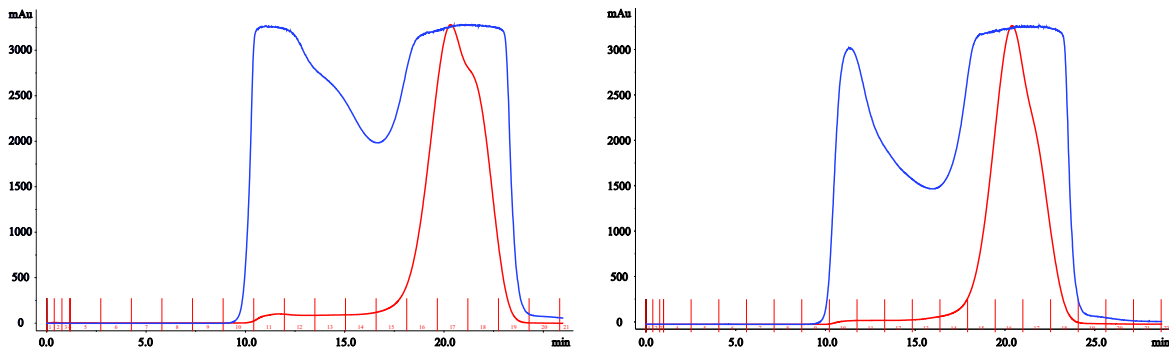


Abbildung 2.40: Chromatogramme der Reinigung von *u4u6a46hh1_vs* (links) und *hh1_3b roh-RNA* (rechts) über eine Sephadex G25-Säule. Die blaue Kurve zeigt den Verlauf der Absorption bei $\lambda = 254 \text{ nm}$ an, die rote Kurve die Leitfähigkeit. Die Salze und NTPs werden beim Anstieg der roten Kurve von der Säule eluiert. Die gereinigte RNA wird sofort eluiert (erste Hälfte der blauen Kurve).

Gefrierschrank gefällt. Die gefällte RNA wurde zentrifugiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser aufgelöst.

Für die Gelaufreinigung wurde die Hälfte der roh-RNA einer 20 ml Transkription verwendet. Die roh-RNA wird am Vakuumkonzentrator bis zur Trockene eingeeengt (2 h bei Heizung Stufe II (ca. $50 \text{ }^\circ\text{C}$)) und dann anschließend in 2 ml denaturierenden Probenpuffer (98 % Formamid mit Bromphenolblau und Xylencyanol als Marker) gelöst. In einigen Fällen bildete sich ein unlöslicher, zäher Schleim, der durch Einfrieren und Auftauen vermindert werden konnte. Gegebenenfalls wurde die Lösung weiter verdünnt. In manchen Fällen kann auch die zähe Lösung auf das Gel aufgetragen werden, die RNA wird während der Elektrophorese herausgelöst. Für diese großen Mengen an RNA wurden Gele von $53 \times 43 \text{ cm}$ und 3 mm Dicke verwendet und die RNA gleichmäßig über die ganze Breite aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit einer Leistung von 60 W und einer Dauer von 15-16 h durchgeführt. Dabei erwärmen sich die Gelplatten, so daß die denaturierenden Bedingungen des Gels weiter erhöht werden. Um einen Bruch der Platten zu verhindern, werden diese passiv über davor geklemmte Aluminiumplatten gekühlt. Nach Beendigung der Elektrophorese wird die Bande der RNA per UV-Shadowing mit einer UV-Handlampe sichtbar gemacht und markiert. Anschließend wird die Bande in kleinen Stücken ($5 \text{ mm} \times 5\text{-}7 \text{ cm}$ (Breite \times Länge)) herausgeschnitten. Aus den Gelstücken wird die aufgetrennte RNA mittels Elektroelution (EluTrap, Schleicher & Schüll) herausgelöst und in 1x TBE-Puffer gesammelt. Die Elektroelution wird bei einer Stromstärke von 8-10 mA pro Kammer und bei Kühlung

von +4 °C durchgeführt, um die Verluste an RNA gering zu halten. Der Puffer der Sammelkammer wurde nach 2-3 h erneuert. Die gesammelten Fraktionen der RNA werden wie im Falle der Aufreinigung mit der G25-Säule behandelt.

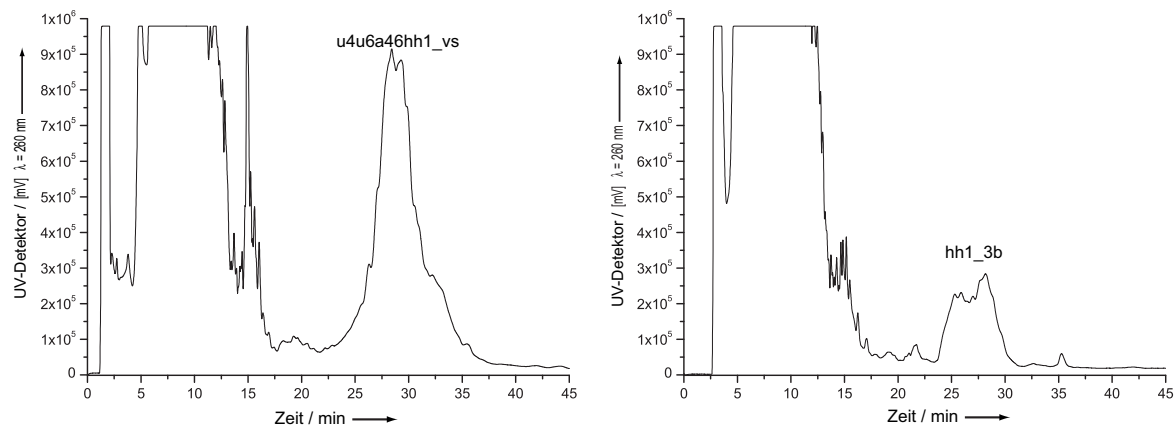


Abbildung 2.41: HPLC-Chromatogramme der präparativen Reinigung von *u4u6a46hh1_vs* (links) und *hh1_3b* roh-RNA (rechts) über eine DNAPac 100-Säule. Deutlich erkennbar ist der hohe Anteil an NTPs und RNA-Abbruchsequenzen (3-18 min), der die Ziel-RNA weit überragt.

Für die HPLC-Aufreinigung wurde eine präparative Säule Dionex DNAPac 100 mit einer Dimension von 9 x 250 mm verwendet. Um denaturierende Bedingungen herzustellen, wurden alle Läufe bei einer Temperatur von 85 °C durchgeführt. Die Flußrate betrug 2.5 ml/min. Als Puffer A diente eine Lösung von 25 mM TRIS, 2 mM EDTA pH 8.0; Puffer B war Puffer A plus 1 M NH₄Cl. Der Gradient wurde wie folgt variiert: 0-55 % B 11 min., 55-100 % B 34 min., 100 % B 5 min., 100% B 5 min., 100 % A 5 min., 100% A 5 min. Die Fraktionen wurden manuell gesammelt und über ein denaturierendes Gel überprüft. Insgesamt wurden für *u4u6a46hh1_vs* vier Fraktionen zwischen 24 und 35 min. gesammelt, für *hh1_3b* waren nur zwei Fraktionen zwischen 25 und 30 Minuten relevant (Abb. 2.41). Aus den vereinten Fraktionen wurde die RNA per Fällung mit Isopropanol gewonnen.

Von den drei angewandten Reinigungsmethoden ist die Gelaufreinigung die effektivste und liefert die sauberste RNA (Abb. 2.42 auf der nächsten Seite). An zweiter Stelle liegt die HPLC, die noch einige Verunreinigungen enthält, aber um den Faktor 10 schneller durchzuführen ist. Die schlechteste Methode, RNA zu reinigen ist die Entsalzung mit der Sephadex G25-Säule. Hier werden nur die Salze und die kleinen, nicht verbrauchten

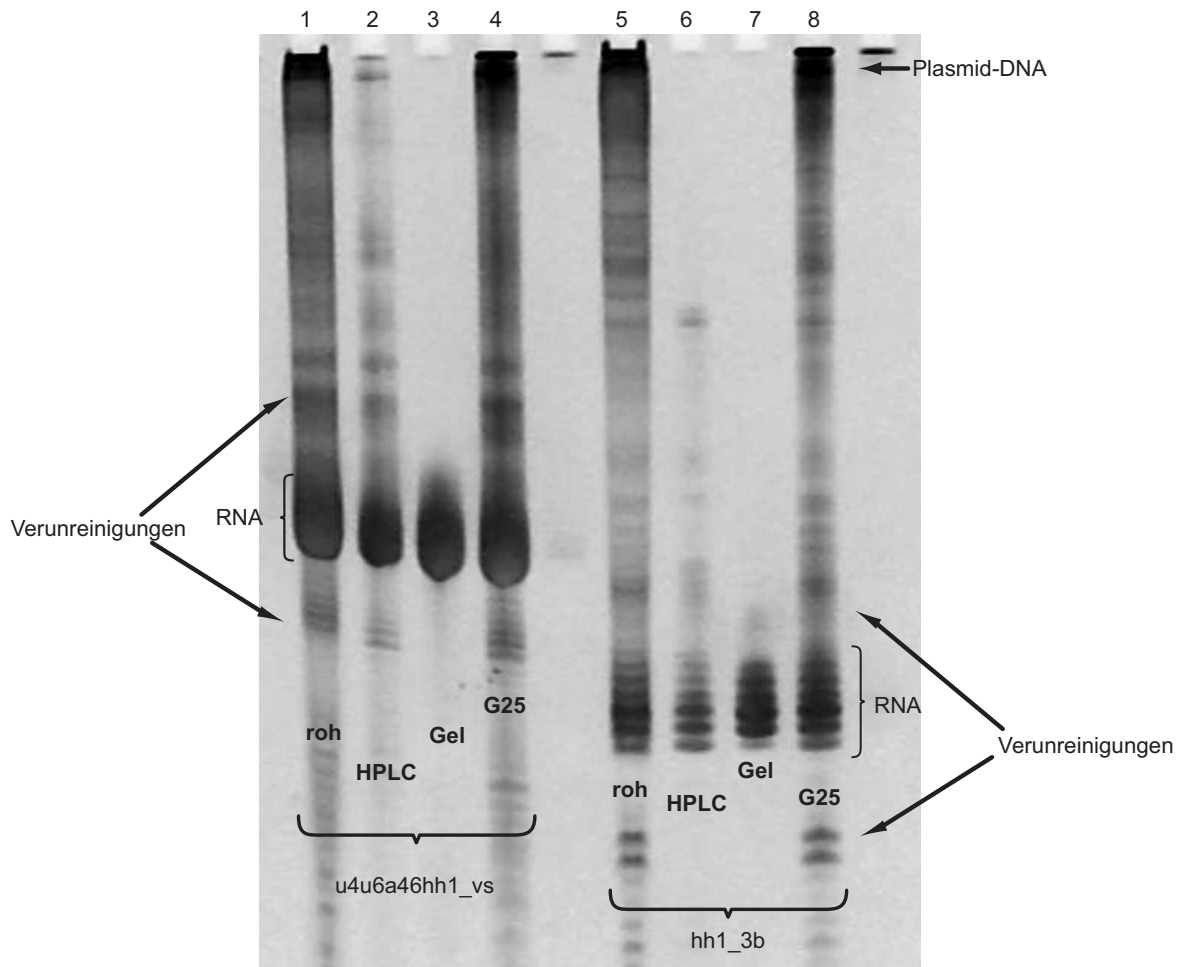


Abbildung 2.42: Denaturierendes Polyacrylamidgel (15 %, 7 M Harnstoff, 1.5 h bei 20 W, Anfärbung: EtBr/UV) der Aufreinigung von *u4u6a46hh1_vs* (links, Spur 1-4) und *hh1_3b* roh-RNA (rechts, Spur 5-8) mit verschiedenen Methoden.

NTPs abgetrennt, die größeren RNAs und das Plasmid können nicht separiert werden. Entscheidend für die verwendete Reinigung ist die Auswirkung auf die Effizienz der Schneidreaktion mit dem Ribozym.

Schneidreaktion von *u4u6a46hh1_vs* mit *hh1_3b*

Um die *u4u6a46hh1_vs*-RNA am 3'-Ende mit dem entsprechenden Ribozym *hh1_3b* schneiden zu können, müssen die beiden RNAs im Puffer der Schneidreaktion hybridisiert werden (40 mM TRIS, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7.4), damit das Ribozym auch an der Schnittstelle reagieren kann. Hierzu werden die beiden RNAs im Puffer

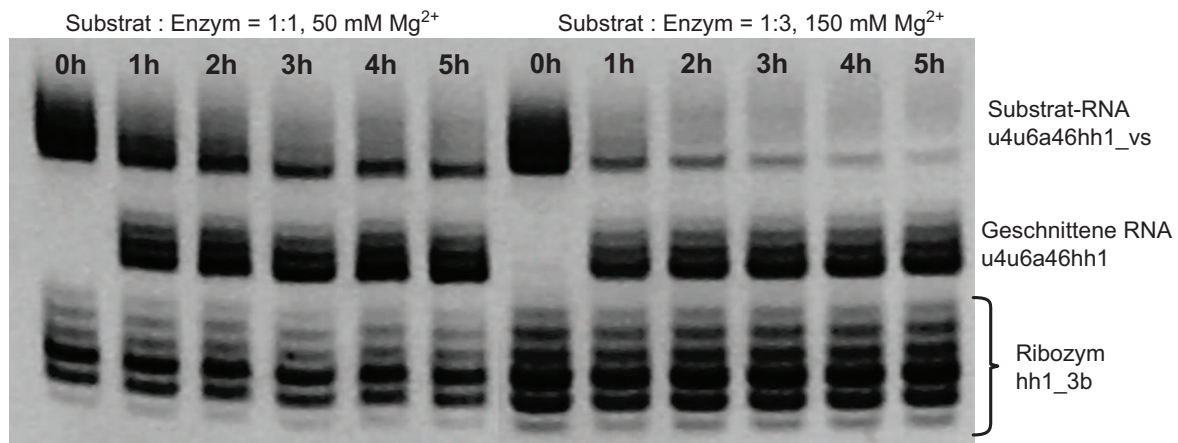


Abbildung 2.43: Denaturierendes Polyacrylamidgel (15 %, 7 M Harnstoff, 2 h bei 50 W, Anfärbung: EtBr/UV): Vergleich der Schneidreaktion der Substrat-RNA u4u6a46hh1_vs mit hh1_3b-Ribozym bei unterschiedlichen Bedingungen. Bei einem Substrat:Enzym-Verhältnis von 1:1 und 50 mM Mg²⁺ läuft die Schneidreaktion nur relativ langsam ab und ist nach 5 h immer noch nicht vollständig abgelaufen (links). Bei höherer Ribozym- und Magnesiumkonzentration hingegen ist sie nach 3 h schon fast vollständig (rechts). Die Spur der geschnittenen RNA zeigt statt der erwarteten einen Bande drei Banden.

für drei Minuten auf 85 °C erwärmt und anschließend über eine halbe Stunde auf 37 °C abgekühlt. Zum Start der Schneidreaktion wird Magnesiumchloridlösung zugegeben. Die Magnesiumionenkonzentration wurde dabei zwischen 50, 100 und 150 mM variiert. Sinnvoll ist hierbei eine möglichst niedrige Konzentration um eine durch Magnesiumionen katalysierte Hydrolyse der RNA zu vermeiden. Ebenso wurde das Verhältnis von Substrat-RNA zu Ribozym von 1:1, 1:2 und 1:3 geändert, um auf jeden Fall eine vollständige Reaktion zu erhalten. Zudem wurde die Zeit in Schritten von einer bis zu fünf Stunden variiert. Sie sollte ebenfalls nur so lang sein, bis das Substrat vollständig geschnitten ist. Für diese ersten Versuche wurde nur über Gelelektrophorese aufgereinigte RNA verwendet, um mögliche Einflüsse von Verunreinigungen zu vermeiden.

Unter allen angegebenen Bedingungen wird die Substrat-RNA u4u6a46hh1_vs geschnitten (Abb. 2.43). Je mehr Ribozym und Magnesium zugesetzt werden, desto schneller ist die Reaktion. Nach 5 h ist in dem angefärbten Gel keine signifikante Bande der Substrat-RNA zu erkennen. Die Reaktionszeit wurde wegen der zunehmenden Hydrolysegefahr nicht verlängert.

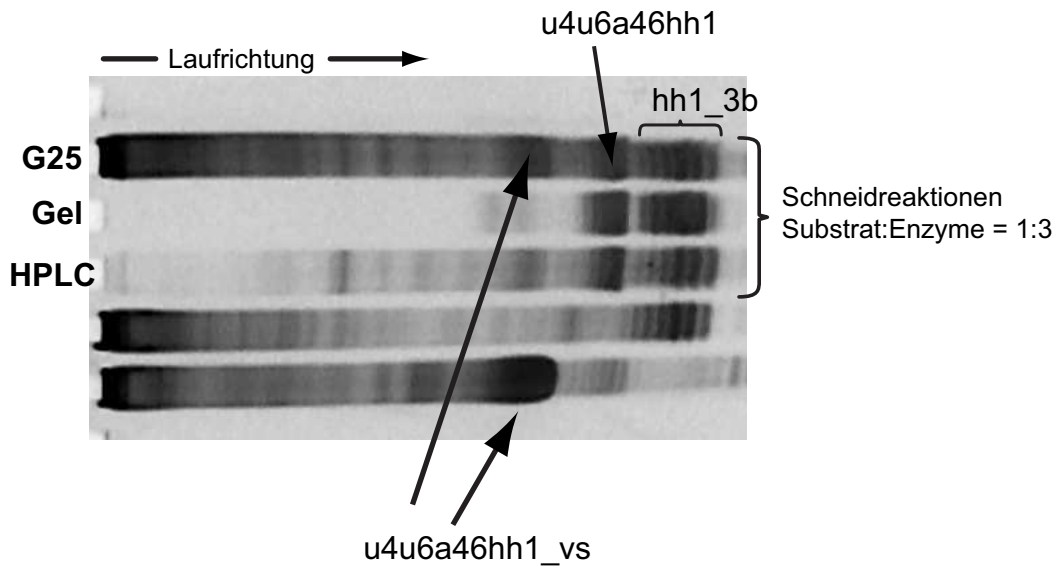


Abbildung 2.44: Denaturierendes Polyacrylamidgel (15 %, 7 M Harnstoff, 1.5 h bei 20 W, Anfärbung: EtBr/UV) der Schneidreaktion von unterschiedlich aufgereinigter u4u6a46hh1_vs-Substrat RNA mit dem dreifachen Überschuß an hh1_3b-Ribozym und einer Magnesiumionenkonzentration von 150 mM. Es wurde insgesamt 10 h bei 37 °C inkubiert, damit die Substrat-RNA auch möglichst vollständig geschnitten wird.

Außerdem wurden die unterschiedlich aufgereinigte Substrat-RNA im dreifachen Überschuß mit dem Ribozym in der Schneidreaktion bei 150 mM Magnesiumchlorid eingesetzt (Abb. 2.44). Wie man eindeutig sieht, ist die über eine Sephadex G25-Säule aufgereinigte RNA nicht zur Durchführung der Schneidreaktion geeignet. Im Gegensatz hierzu wurde die Gel- oder HPLC-aufgereinigte RNA fast vollständig geschnitten.

Die Schneidreaktion ergibt allerdings nicht ein homogenes Produkt, sondern unter allen Bedingungen findet man drei bis vier Produktbanden. Dies könnte auf eine ungenügende Bindung des Ribozyms an das Substrat oder mögliche Fehler im Sequenzdesign zurückzuführen sein.

Um die Ursache der vielen Produktbanden zu klären, wurden sowohl die Substrat-RNA als auch die Ribozyme modifiziert und dann unter ähnlichen Bedingungen in neuen Schneidreaktionen getestet.

Modifizierte Ribozyme für u4u6a46hh1_vs:

hh1_3c

5' GAC GAC CCU GAU GAG GCC GAA AGG CCG AAA GCG AUA C 3' 37 nt

hh1_3c_top

5' AAT TC TAA TAC GAC TCA CTA TA GAC GAC CCT GAT GAG GCC GAA AGG CCG AAA GCG ATA C CTG CAG A 3'

hh1_3c_bot

5' AGC TT CTG CAG GTA TCG CTT TCG GCC TTT CGG CCT CAT CAG GGT CGT C TA TAG TGA GTC GTA TTA G 3'

hh1_3d

5' GAC GAC CCU GAU GAG CUG ACU UGU CAG AAG CGA UAC 3' 36 nt

hh1_3d_top

5' TAA TAC GAC TCA CTA TA GAC GAC CCT GAT GAG CTG ACT TGT CAG CGA AAG CGA TAC 3'

hh1_3d_bot

5' GTA TCG CTT TCG CTG ACA AGT CAG CTC ATC AGG GTC GTC TA TAG TGA GTC GTA TTA 3'

Abbildung 2.45: RNA-Sequenzen der modifizierten Ribozyme hh1_3c und hh1_3d zum Schneiden von u4u6a46hh1_vs. Es sind außerdem die entsprechenden DNA-Sequenzen für die Transkription angegeben. In Grün ist der T7-Promotor gekennzeichnet, in Pink die EcoR I-Schnittstelle, in Rot die Pst I-Schnittstelle und Türkis die Hind III-Schnittstelle.

Modifizierte Ribozyme für das Schneiden am 3'-Ende

Um den Aufwand möglichst gering zu halten, wurde die Substrat-RNA nicht modifiziert. Stattdessen wurde das Ribozym in der Länge der Bindungsarme und in der Sequenz modifiziert. Die Bindungsarme wurden im Falle von hh1_3c am 5'-Ende auf sechs und am 3'-Ende auf sieben Basen erweitert. Für hh1_3d auf sechs bzw. acht Basen am 5'- und 3'-Ende. Außerdem wurde die Gerüstsequenz verändert [187], um eventuelle Unterschiede zu hh1_3b und 3c festzustellen. Die modifizierten Ribozyme wurden von chemisch synthetisierter doppelsträngiger Templat-DNA transkribiert, um in kürzester Zeit Ergebnisse bezüglich der Schneidreaktion zu erhalten (Abb. 2.45).

Die Transkription der neuen Ribozyme wurde in 40 μ l Ansätzen mit 40 mM NTPs, 45 mM Mg²⁺ und 2 μ l T7-Polymerase getestet. Aus Transkriptionen von 400 μ l unter denselben Bedingungen wurden über Gelaufreinigung und anschließender Elektroelution präparativ die Ribozyme für die Schneidreaktionen gewonnen. Für die Schneidreaktion wurden die RNA und das jeweilige Ribozym im Verhältnis 1:2 unter Zusatz von 150 mM Magnesiumionen eingesetzt. Es wurde für vier Stunden bei 37 °C inkubiert (Abb. 2.46 auf der nächsten Seite).

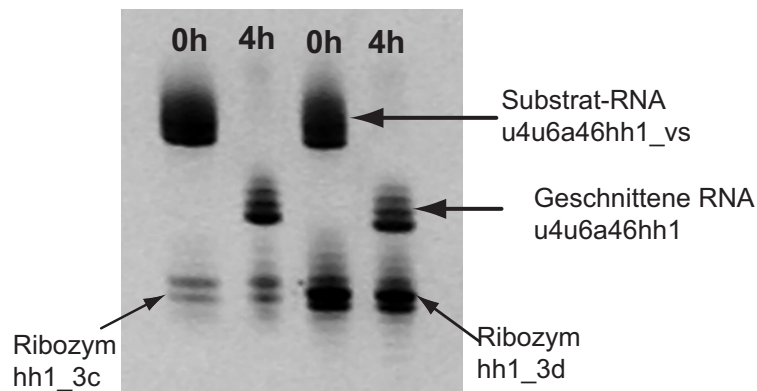


Abbildung 2.46: Denaturierendes Polyacrylamidgel (15 %, 7 M Harnstoff, 1.5 h bei 20 W, Anfärbung: EtBr/UV) der Schneidreaktion von u4u6a46hh1_vs mit den modifizierten Ribozymen hh1_3c und hh1_3d. Die Substrat-RNA wird in beiden Fällen komplett geschnitten, aber wieder erhält man ein inhomogenes Produkt, bestehend aus jeweils vier Banden der geschnittenen u4u6a46hh1-RNA.

Wie auf den Gelen zu sehen ist, werden für die geschnittene Substrat-RNA u4u6a46hh1_vs wieder vier Banden (N bis N+3) für u4u6a46hh-RNA gefunden. Die modifizierten Ribozyme haben also nicht den gewünschten Erfolg gebracht.

Um die Ursache der Heterogenität zu ermitteln, wurden im nächsten Schritt verschiedene Substrat-RNAs mit den entsprechenden Ribozymen synthetisiert.

2.7.4 Synthese von u4u6a46hh2 bis u4u6a46hh4

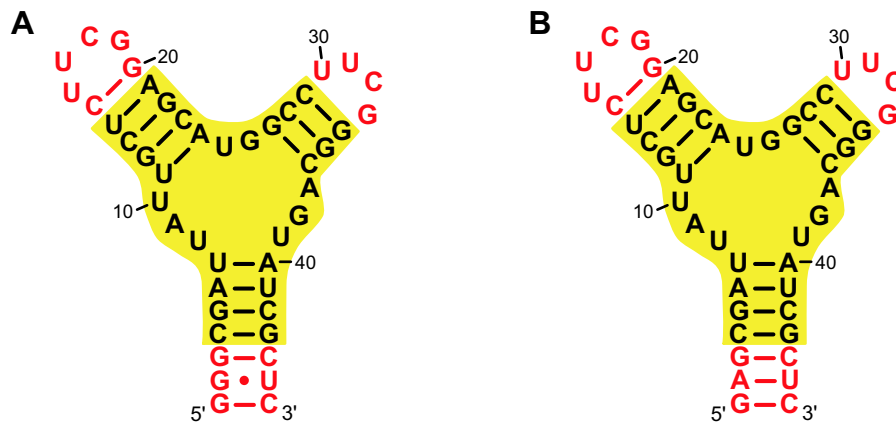


Abbildung 2.47: Sekundärstruktur der drei neuen Ziel-RNAs u4u6a46hh2 (A), u4u6a46hh3 und u4u6a46hh4 (B). Sie unterscheiden sich am 5'- und 3'-Ende in den letzten drei Basenpaarungen.

Wie oben beschrieben konnte mit u4u6a46hh1 keine homogene RNA nach dem Schneiden mit den entsprechenden Ribozymen erhalten werden. Um die Heterogenität der geschnittenen RNA aufzulösen, wurden drei weitere RNAs konstruiert: u4u6a46hh2, u4u6a46hh3 und u4u6a46hh4. Die Kernstruktur ist für alle Konstrukte gleich. Sie unterscheiden sich nur in den letzten drei Basenpaarungen (Abb. 2.47).

Sequenzdesign



Abbildung 2.48: Sequenzen der drei neuen RNA-Konstrukte zum Schneiden am 3'-Ende. Mit blauer Farbe sind die Nucleotide für die Bindung des entsprechenden Ribozyms gekennzeichnet. Der Pfeil markiert die Schnittstelle, an der die RNA geschnitten wird.

Die Unterschiede zwischen den neuen RNAs liegen in den Substrat-RNAs, die dann mit dem passenden Ribozym geschnitten werden. u4u6a46hh2_vs und u4u6a46hh3_vs

sind 56 Basen lang und haben am 3'-Ende Bindungsarme von zehn Basen für das Ribozym. u4u6a46hh4_vs ist 54 Basen lang und besitzt am 3'-Ende nur 8 Basen für die Bindung des Ribozyms. Die Bindungsarme am 5'-Ende sind zehn, neun und sieben Basen lang (Abb. 2.48 auf der vorherigen Seite).

hh2_3

5' GGG CAU GGC CCU GAU GAG CAC UUG UGC GAA AGC GAU ACU G 3' 40 nt

hh3_3

5' GGU GAC CUG CCU GAU GAG CAC UUG UGC GAA AGC GAU ACU 3' 39 nt

hh4_3

5' GGC CGU CCC UGA UGA GCU GAC UUG UCA GCG AAA GCG AUA C 3' 40 nt

Abbildung 2.49: Sequenzen der drei Ribozyme zum Schneiden der Substrat-RNAs u4u6a46hh2_vs-hh4_vs. Mit blauer Farbe sind die Nukleotide der Bindungsarme gekennzeichnet.

Entsprechend wurden die Ribozyme entworfen. Alle Ribozyme unterscheiden sich in der Länge zu der geschnittenen Substrat-RNA um mindestens fünf Basen. Dies sollte eine unkomplizierte Aufreinigung nach der Schneidreaktion sicherstellen (Abb. 2.49).

Transkription und Aufreinigung

Die Substrat- wie auch die Ribozym-RNAs wurden von chemisch synthetisierten DNA-Templaten transkribiert. Hierzu wurden die DNA-Einzelstränge, bestehend aus T7-Promotor und RNA-Sequenz, unter Erhitzen und langsamen Abkühlen hybridisiert. Die so gewonnen DNA-Doppelstränge wurden direkt für die Transkription verwendet. Die Transkriptionsbedingungen wurden nicht für die jeweilige RNA optimiert, es wurden stattdessen die Bedingungen der u4u6a46hh1-RNA übernommen, da sich die Sequenzen nicht sehr stark unterscheiden.

Es wurden 400 μ l Transkriptionen mit 40 mM NTPs, 45 mM Mg^{2+} , 20 μ l T7-Polymerase und 1 μ M-DNA-Templat durchgeführt. Es wurde für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Abtrennung des Proteins durch Chloroform/Phenol-Extraktion wurde die RNA mit Isopropanol gefällt und anschließend über ein denaturierendes 20 %-Gel (7 M Harnstoff, keine Kühlung) aufgereinigt (Abb. 2.50 auf der nächsten Seite). Die gereinigte RNA wurde durch Elektroelution aus dem Gel wiedergewonnen.

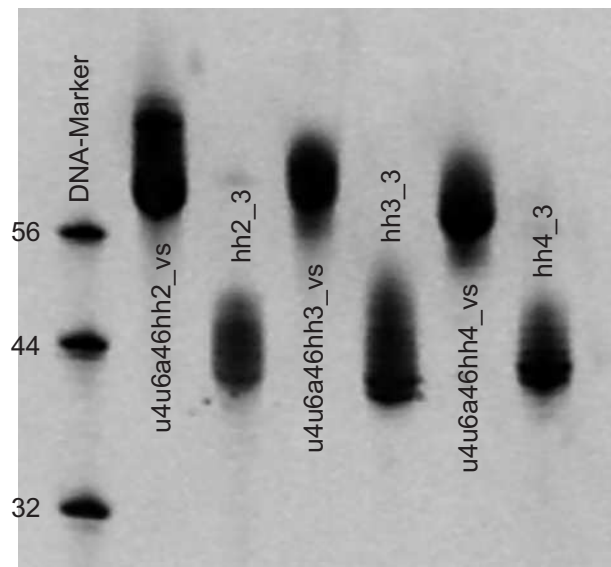


Abbildung 2.50: Denaturierendes Polyacrylamidgel (15 %, 7 M Harnstoff, 1.5 h bei 20 W, Anfärbung: EtBr/UV) der gereinigten RNAs. Es sind die jeweiligen Substrat-RNAs mit ihren Ribozymen nebeneinander aufgetragen.

Es wurden Ausbeuten von 311 bis 622 μg erzielt, ausreichend um die Schneidreaktion mit den Substrat-RNAs zu testen.

Schneidreaktionen von u4u6a46hh2_vs-hh4_vs

Für die Schneidreaktionen der verschiedenen Substrat-RNA/Ribozym-Kombination wurde jeweils die gleiche Konzentration von 50 μM Substrat-RNA und ein Substrat: Ribozym-Verhältnis von 1:2 gewählt. Die beiden RNAs wurden drei Minuten bei 85 °C erhitzt und innerhalb 45 min auf Raumtemperatur langsam abgekühlt. Zu dem so entstandenen Komplex wurde Magnesiumchloridlösung bis zu einer Konzentration von 150 mM gegeben. Die Schneidreaktion wurde für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurden 1 μl -Aliquote entnommen und auf einem denaturierenden Gel aufgetrennt (Abb. 2.51 auf der nächsten Seite).

Die Reaktion verläuft für u4u6a46hh2_vs und u4u6a46hh3_vs quantitativ, bei u4u6a46hh4_vs bleibt noch ungeschnittene RNA zurück. In allen drei Fällen erhält man wie im Fall von u4u6a46hh1 mehr als ein Bande. Die Verlängerung der Bindungsarme und Modifikation der RNA-Sequenz hat nicht den gewünschten Erfolg gebracht. Es wurden außerdem Kontrollexperimente mit einer niedrigeren Konzentration

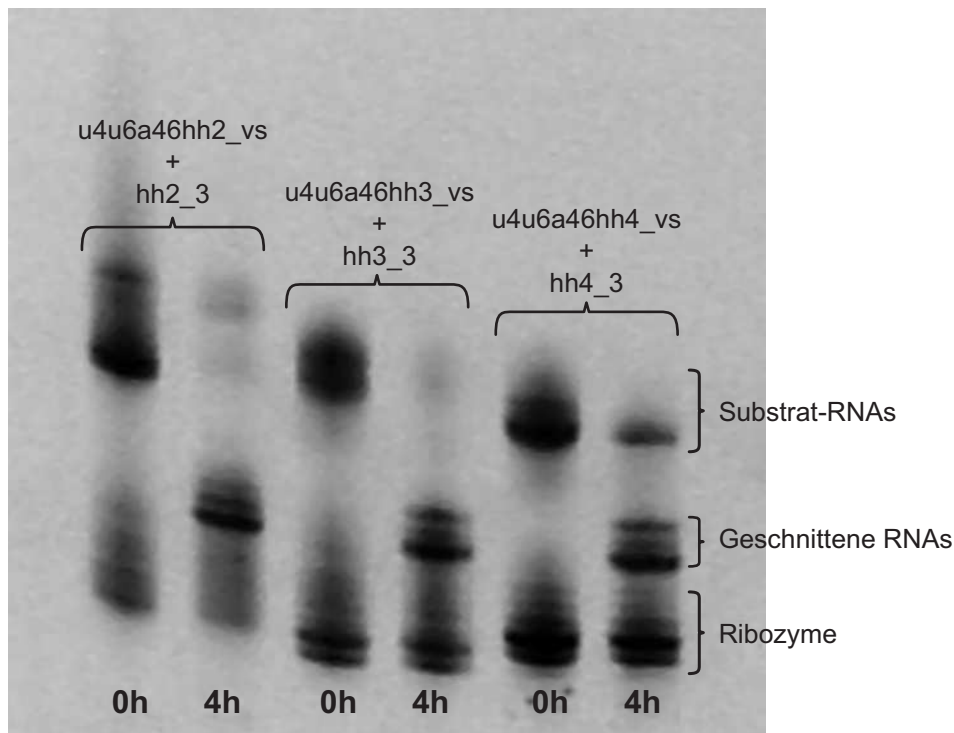


Abbildung 2.51: Denaturierendes Polyacrylamidgel (15 %, 7 M Harnstoff, 1.5 h bei 22 W, Anfärbung: EtBr/UV) der Schneidreaktionen von u4u6a46hh2_vs-hh4_vs mit ihren entsprechenden Ribozymen. Die RNAs wurden hybridisiert und durch Zugabe von Magnesiumionen (150 mM) wurde die Schneidreaktion gestartet. Es wurde vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Bei allen drei Konstrukten erhält man ein inhomogenes Produkt aus drei bis vier Banden.

on von 5 μ M Substrat-RNA und niedrigeren Magnesiumkonzentration von 10 bzw. 25 mM durchgeführt. Alle Schneidreaktionen zeigen die gleichen Verteilung von mehreren Banden für die geschnittene RNA. Auch eine autokatalytische Schneidreaktion der Substrat-RNA konnte durch Inkubieren derselben bei 150 mM Mg^{2+} ohne Zusatz von Ribozym ausgeschlossen werden. Als wahrscheinlichste Quelle blieb nur eine 5'-Inhomogenität der transkribierten Substrat-RNA übrig.

Schneidreaktion von am 5'-Ende radioaktiv markierter Substrat-RNA

Für eine schnelle und effiziente Erforschung der Quelle der Längeninhomogenität der geschnittenen Substrat-RNAs, bietet sich die radioaktive Markierung der RNA am 5'-Ende an. Im Falle einer Inhomogenität am 5'-Ende der Substrat-RNA sollte diese auch nach der Schneidreaktion durch die Radioaktivität sichtbar sein. Hierzu wurden

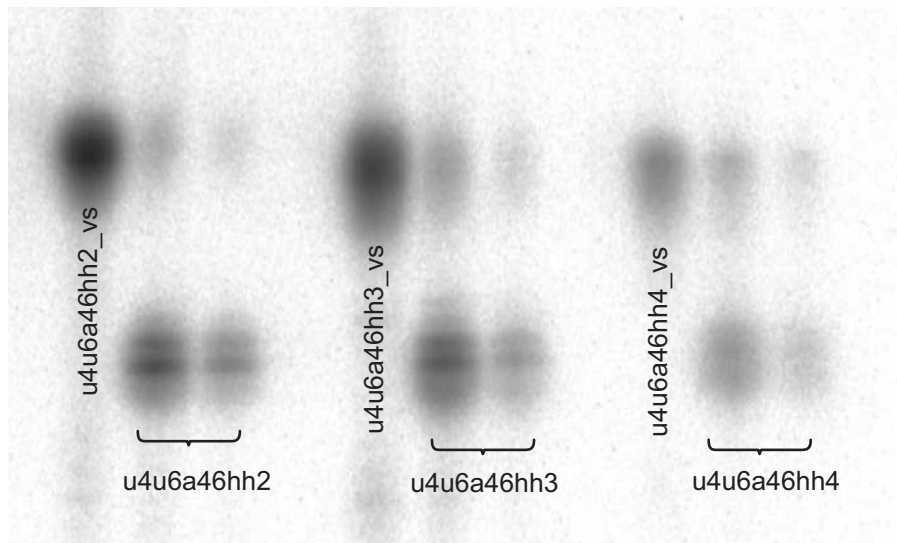


Abbildung 2.52: Denaturierendes Polyacrylamidgel (15 %, 7 M Harnstoff, 3 h bei 20 W) der Schneidreaktionen der am 5'-Ende radioaktiv markierten *u4u6a46hh2_vs-hh4_vs* mit ihren entsprechenden nicht-radioaktiven Ribozymen. Es sind von jeder Substrat-RNA drei Spuren zu sehen: ungeschnittene Referenz, geschnittene RNA und eine 1:10 Verdünnung der geschnittenen RNA. Nach dem Schneiden am 3'-Ende ist die Radioaktivität des 5'-Endes der geschnittenen RNA über mehrere Banden verteilt. Ein Indiz für die vorhandene 5'-Inhomogenität der Substrat-RNA. Die Banden wurden mit Hilfe eines Phosphorimagers sichtbar gemacht.

jeweils 100 μg von transkribierter *u4u6a46hh2_vs-hh4_vs* mit Phosphatase selektiv am 5'-Ende dephosphoryliert. Die Aufreinigung erfolgte durch Chloroform/Phenol-Extraktion und anschließende Fällung aus ethanolischer Lösung. Das freie 5'-Ende wurde durch enzymatische Phosphorylierung mit radioaktivem γ -ATP durch T4 Polynukleotid Kinase markiert. Die so markierte RNA wurde über ein semipräparatives denaturierendes Gel aufgereinigt.

Für die Schneidreaktion wurden Substrat-RNAs und nicht-radioaktive Ribozyme im Verhältnis 1:1 und einer Magnesiumionenkonzentration von 50 mM eingesetzt. Es wurde wie in den obigen Versuchen hybridisiert und vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Die entnommenen Aliquote aus der Reaktion wurden über ein denaturierendes Gel von 20 x 38 cm und 1 mm Dicke über drei Stunden aufgetrennt. Die radioaktiven Banden wurden über einen Phosphorimager sichtbar gemacht (Abb. 2.52).

Wie die Gele eindeutig belegen, ist nach dem Schneiden am 3'-Ende der Substrat-RNAs die Radioaktivität am 5'-Ende über mehrere Banden verteilt. Somit ist eine schon vor der Schneidreaktion vorhandene 5'-Inhomogenität der transkribierten Substrat-

RNAs die Ursache der Inhomogenität der geschnittenen RNA. Somit kann mit den bisher hergestellten Substrat-RNAs keine homogene RNA durch Schneiden am 3'-Ende erhalten werden.

2.7.5 Synthese von u4u6a46hh5

Wie in den vorherigen Abschnitten gezeigt werden konnte, besteht bei allen bisher verwendeten Substrat-RNAs eine 5'-Inhomogenität, die durch Schneiden am 3'-Ende prinzipiell nicht aufgehoben werden kann. Deshalb wurde eine neue Substrat-RNA, u4u6a46hh5_vs, konstruiert, die mit zwei Ribozymen am 3'- und 5'-Ende simultan in einer Schneidreaktion geschnitten wird. Dieses Vorgehen sollte zu einer homogenen geschnittenen RNA führen. Hierbei wurden *trans*-Ribozyme eingesetzt, um diese Methode auch gegebenenfalls bei der Synthese von markierten RNAs einsetzen zu können, ohne das unnötig markierte NTPs auch in die Ribozyme eingebaut werden, wie es bei der Verwendung von *cis*-Ribozymen der Fall wäre (2.6.2 auf Seite 31).

Sequenzdesign

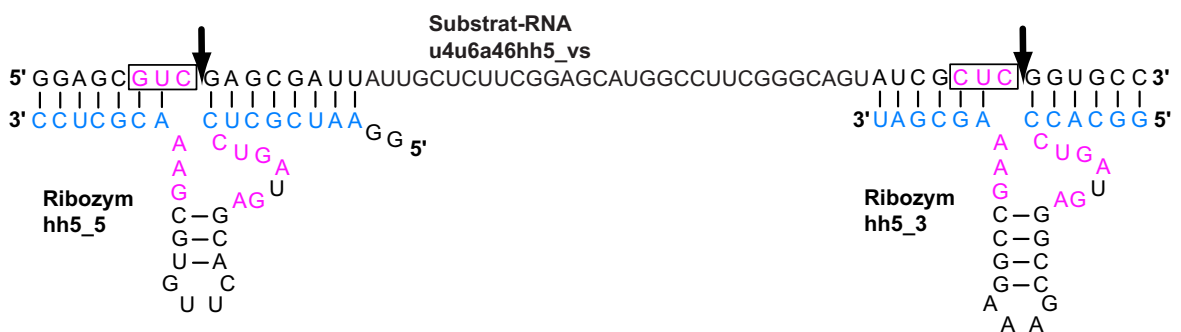


Abbildung 2.53: Sequenzdesign für *u4u6a46hh5_vs*. Gezeigt ist die *u4u6a46hh5_vs*-RNA vor dem Schneiden mit den beiden entsprechenden HH-Ribozymen am 5'- und 3'-Ende. In Blau sind die Nukleotide der Bindungsarme der Ribozyme gekennzeichnet, in Pink sind die konservierten, für die Schneidreaktion nötigen Nukleotide herausgehoben. Der Pfeil bezeichnet die Schnittstellen an der Substrat-RNA *u4u6hh5_vs*.

Um eine RNA sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende schneiden zu können, müssen an beiden Enden die entsprechenden Erkennungssequenzen als auch die Bindungsarme für die hier verwendeten HH-Ribozyme vorhanden sein (Abb. 2.53).

2 Synthese einer spleißosomalen U4/U6-RNA

u4u6a46hh5_vs

5'GGA GCG UC|GAG CGA UUA UUG CUC UUC GGA GCA UGG CCU UCG GGC AGU AUC GCU C|GGU GCC 3' 60 nt

Nach dem Schneiden mit hh5-Ribozymen: u4u6a46hh5

5'GAG CGA UUA UUG CUC UUC GGA GCA UGG CCU UCG GGC AGU AUC GCU C 3' 46 nt

u4u6a46hh5_top

5'AAT TC TAA TAC GAC TCA CTA TA GGA GCG TC GAG CGA TTA TTG CTC TTC GGA GCA TGG CCT TCG GGC AGT ATC GCT C GGT GCC CTG CAG A 3'

u4u6a46hh5_bot

5'AGC TT CTG CAG GGC ACC G AGC GAT ACT GCC CGA AGG CCA TGC TCC GAA GAG CAA TAA TCG CTC GA CGC TCC TAT AGT GAG TCG TAT TA G 3'

hh5_5

5'GG AA UCG CUC CU GAU GAG CAC UUG UGC GAA A CGC UCC 3' 37 nt

hh5_5_top

5'AAT TC TAA TAC GAC TCA CTA TA GG AA TCG CTC CT GAT GAG CAC TTG TGC GAA A CGC TCC CTG CAG A 3'

hh5_5_bot

5'AGC TT CTG CAG GGA GCG T TTC GCA CAA GTG CTC ATC AG GAG CGA TT CC TAT AGT GAG TCG TAT TA G 3'

hh5_3

5'GGC ACC CU GAU GAG CAC UUG UGC GAA AGC GAU 3' 32 nt

hh5_3_top

5'AAT TC TAA TAC GAC TCA CTA TA GGC ACC CT GAT GAG CAC TTG TGC GAA AGC GAT CTG CAG A 3'

hh5_3_bot

5'AGC TT CTG CAG ATC GCT TTC GCA CAA GTG CTC ATC AG GGT GCC TAT AGT GAG TCG TAT TA G 3'

Abbildung 2.54: Sequenzen der RNAs für das Schneiden von u4u6a46hh5_vs mit den Ribozymen hh5_5 und hh5_3 zusammen mit den entsprechenden DNA-Templaten. In Grün ist der T7-Promotor gekennzeichnet, in Pink die EcoR I-Schnittstelle, in Rot die Pst I-Schnittstelle und Türkis die Hind III-Schnittstelle.

Basierend auf der Sequenz von u4u6a46hh1_vs wurde am 5'-Ende die Erkennungssequenz GUC zusammen mit fünf weiteren Nukleotiden als Bindungsarm angefügt. Dementsprechend wurden auch die beiden HH-Ribozyme für die Bindung gestaltet. Die u4u6a46hh5_vs-RNA ist vor dem Schneiden 60 Basen lang, danach 46. Das 3'-Ribozym hh5_3 ist 32 und das 5'-Ribozym hh5_5 37 Basen lang, so daß eine Trennung nach der Schneidreaktion problemlos möglich sein sollte (Abb 2.54).

Testschneidreaktion

Um die Konstrukte zu überprüfen, wurden die u4u6a46hh5_vs-RNA und die Ribozyme zuerst von einem synthetischen DNA-Templat in 400 µl Ansätzen mit T7-Polymerase transkribiert. Es wurde keine Optimierung durchgeführt, sondern, wie bereits weiter oben beschrieben, die Transkriptionsbedingungen von u4u6a46hh1 übernommen (40 mM NTPs, 45 mM Mg²⁺, 400 pmol DNA-Templat, 2 µl T7-Polymerase und vier Stunden Inkubationszeit bei 37 °C). Die transkribierten RNAs wurden über ein denaturierendes Gel mit anschließender Elektroelution aufgereinigt. Es wurden

Ausbeuten von 117 μg bis 862 μg erzielt, ausreichend für eine Schneidreaktion mit einer Substratkonzentration von 50 μM .

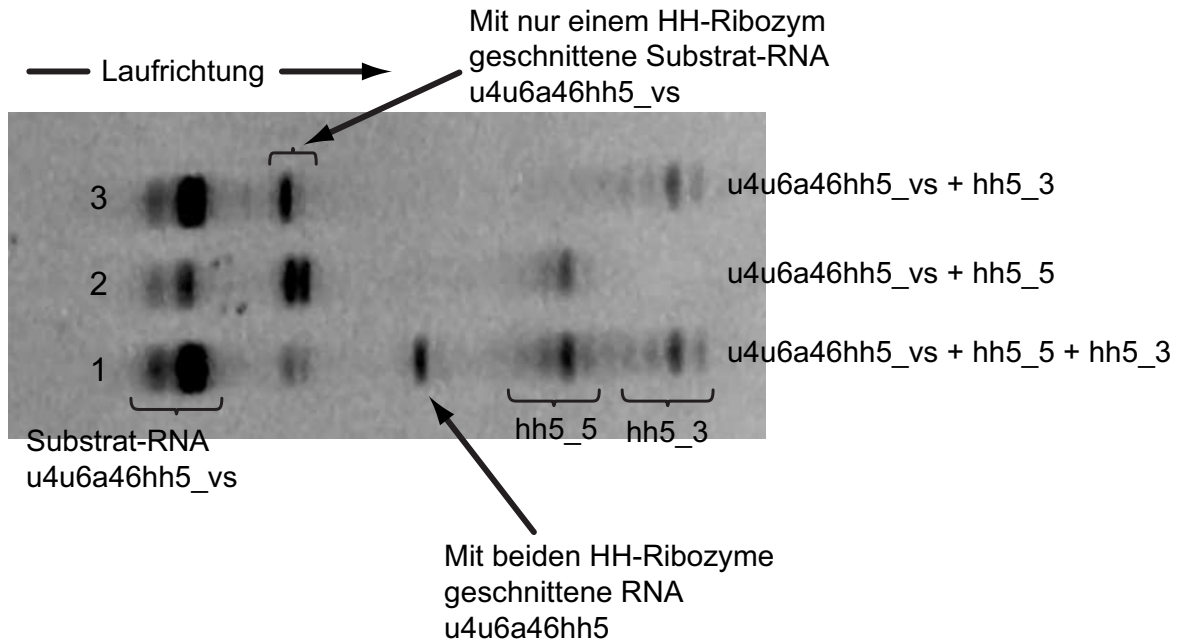


Abbildung 2.55: Denaturierendes Polyacrylamidgel (15 %, 7 M Harnstoff, 2 h bei 20 W, Anfärbung: EtBr/UV) der Test-Schneidreaktion von *u4u6a46hh5_vs* mit *hh5_5* und *hh5_3* (Spur 1). Außerdem ist noch die Reaktion von *u4u6a46hh5_vs* mit *hh5_5* (Spur 2) und *u4u6a46hh5_vs* mit *hh5_3* (Spur 3) gezeigt.

Für die Schneidreaktion wurden Substrat-RNA und die beiden HH-Ribozyme im Verhältnis 1:1:1 eingesetzt. Als Kontrolle wurde jeweils die Substrat-RNA mit nur einem HH-Ribozym im Verhältnis 1:1 zur Reaktion gebracht. Die Reaktionspartner wurden durch Erhitzen bei 85 °C und anschließendes langsames Abkühlen hybridisiert. Durch Zugabe von 150 mM Magnesiumchlorid wurde die Reaktion gestartet. Eine erste Kontrolle des Reaktionsgemisches nach vier Stunden ergab nur eine sehr schwache Bande von geschnittener RNA. Deshalb wurde die Reaktion über Nacht fortgesetzt. Nach 24 Stunden war so viel *u4u6a46hh5_vs*-RNA umgesetzt, daß Banden der geschnittenen RNA durch Anfärben mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden konnten (Abb. 2.55).

Anhand des Gels ist eine eindeutig homogene RNA nach dem Schneiden mit beiden Ribozymen zu erkennen, auch wenn die Schneidreaktion nicht vollständig abgelaufen ist (Abb. 2.55, Spur 1). Die Schneidreaktion mit nur einem Ribozym hat im Falle des

5'-Ribozym zu am 3'-Ende inhomogener RNA geführt (Abb. 2.55 auf der vorherigen Seite, Spur 2), so wie es bei der Transkription mittels T7-Polymerase üblich ist. Beim Schneiden mit dem 3'-Ribozym wird wieder Erwartet nur eine Produktbande (Abb. 2.55 auf der vorherigen Seite, Spur 3) erhalten. Im Vergleich zu den zuvor getesteten RNAs ist dieses Produkt unerwartet, da auch hier die Substrat-RNA mit zwei G-Nukleotiden beginnt, welche 5'-Inhomogenitäten begünstigt [169,170].

Transkription und Aufreinigung

Nach dem erfolgreichen Testschneiden von u4u6a46hh5_vs wurden die Sequenzen der drei RNAs getrennt in Plasmide inkloniert. Die Transkription von den linearisierten Plasmiden wurde für jede RNA einzeln optimiert. Für die 40 µl-Transkriptionsbedingungen ergaben folgende Bedingungen:

u4u6a46hh5_vs:

1 µg Plasmid, 40 mM NTPs, 45 mM Mg²⁺ und 6 µl T7-Polymerase, 4:30 h;

hh5_3: 1,4 µg Plasmid, 30 mM NTPs, 45 mM Mg²⁺ und 6 µl T7-Polymerase, 4:30 h;

hh5_5: 1,8 µg Plasmid, 40 mM NTPs, 45 mM Mg²⁺ und 6 µl T7-Polymerase; 4:30 h.

Die präparativen Transkriptionen wurden auf dieser Basis auf ein Volumen von 20 ml erweitert. Die präparativen Ansätze wurden nach einer Inkubation von viereinhalb Stunden auf zwei Fraktionen à 10 ml aufgeteilt und dann einer Chloroform/Phenol-Extraktion unterzogen. Anschließend wurde die roh-RNA aus der Wasserphase durch Zugabe von 0.9 Volumenprozent Isopropanol über Nacht im Gefrierschrank gefällt. Die roh-RNA wird danach über große denaturierende präparative Gele über 14-16 h mit anschließender Elektroelution aufgereinigt.

Schneidreaktion von u4u6a46hh5_vs mit hh5_5 und hh5_3

Nachdem sich beim Test der Schneidreaktion herausgestellt hatte, daß diese nur über Nacht zu den gewünschten Produkten führt, wurden nach der Transkription von größeren Mengen der RNA mehrere Optimierungen der Schneidreaktion durchgeführt. Erste Optimierungen wurden bei Magnesiumionenkonzentrationen von 100 bzw. 300 mM und Substrat-RNA:Ribozyme-Verhältnissen von 1:1:1 und 1:2:2 (Substrat-RNA:hh5_5:hh5_3) durchgeführt (Abb. 2.56 auf der nächsten Seite).

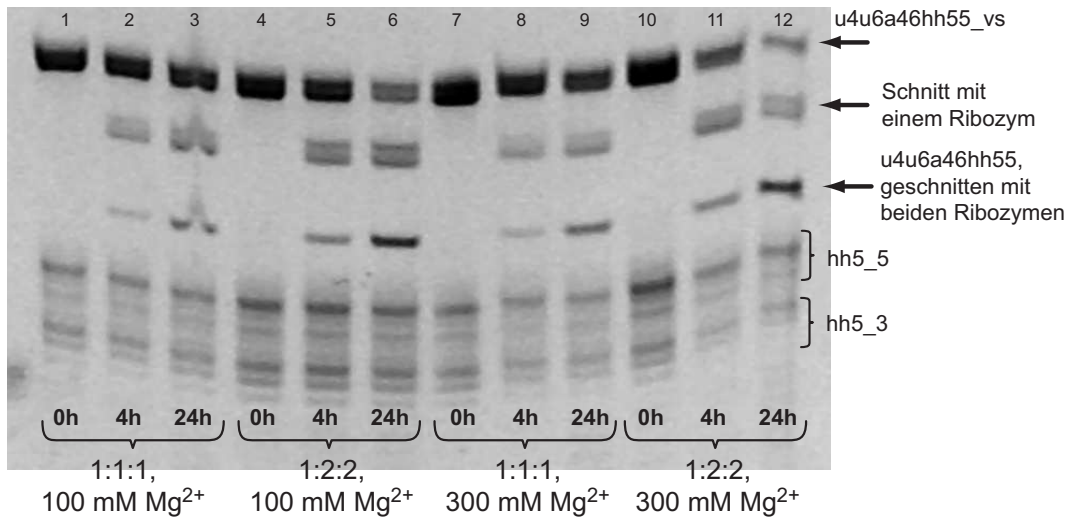


Abbildung 2.56: Denaturierendes Polyacrylamidgel (15 %, 7 M Harnstoff, 2 h bei 50 W, Anfärbung: EtBr/UV) der Schneidreaktion von *u4u6a46hh55_vs* mit *hh5_5* und *hh5_3* im Verhältnis 1:1:1 bei 100 mM Mg^{2+} , nach 0 h, 4 h und 24 h (Spur 1-3). Daneben die im Verhältnis 1:2:2 (Spur 4-6). Rechts davon mit jeweils 300 mM Mg^{2+} .

Auffällig war bei den Schneidreaktionen die Unvollständigkeit des Schnitts auch unter hohen Magnesiumkonzentrationen und unter einem Überschuss der Ribozyme. In den meisten Fällen wird die Substrat-RNA selbst nach 24 h nicht annähernd vollständig geschnitten, mit Ausnahme bei 300 mM Mg^{2+} und doppelter Ribozymkonzentration. Zum Vergleich wurde die Substrat-RNA mit nur jeweils einem Ribozym im Verhältnis 1:1 und 100 mM Mg^{2+} eingesetzt (Abb. 2.57 auf der nächsten Seite). Man erkennt einen deutlichen Unterschied in der Effizienz der beiden Ribozyme, obwohl beide die RNA selbst nach 24 h nicht vollständig geschnitten haben. Immerhin wird mit *hh5_5* nach 24 h soviel RNA geschnitten, daß man zwei Produktbanden erhält. Im Falle von *hh5_3* ist hingegen nur eine schwache Bande zu erkennen. Eine systematische Erhöhung der Konzentrationen von Ribozym und Magnesium während der Schneidreaktion führte zu besseren Ergebnissen nach 24 h (Abb. 2.58 auf Seite 75). So wird die Substrat-RNA bei Magnesiumkonzentrationen von 500 und 750 mM und einem fünffachen Ribozymüberschuß nach 24 h fast vollständig geschnitten. Diese Bedingungen sind allerdings in der Praxis nicht anwendbar, da unter diesen Bedingungen zunehmend die Gefahr besteht, daß die RNAs hydrolysiert werden. Zudem entsteht ein erheblicher Aufwand für die Herstellung der Ribozyme.

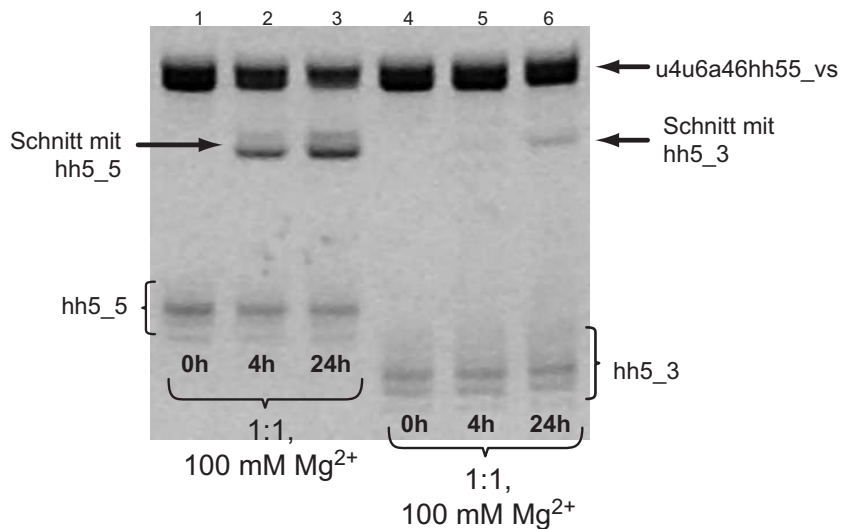


Abbildung 2.57: Denaturierendes Polyacrylamidgel (15 %, 7 M Harnstoff, 1.5 h bei 20 W, Anfärbung: EtBr/UV) der Schneidreaktion von u4u6a46hh5_vs mit hh5_5 im Verhältnis 1:1 bei 100 mM Mg²⁺, nach 0 h, 4 h und 24 h (Spur 1-3). Daneben mit hh5_3 unter den gleichen Bedingungen (Spur 4-6).

Die Ursache für die langsame und unvollständige Schneidreaktion liegt hauptsächlich beim hh5_3-Ribozym. Selbst bei dreifachem Überschuss im Vergleich zur Substrat-RNA und einer Magnesiumkonzentration von 50 mM beginnt die Schneidreaktion erst nach ca. 4h und nach 24 h ist erst ein Bruchteil der Substrat-RNA umgesetzt (Abb. 2.59 auf der nächsten Seite). Eine Verdoppelung der Magnesiumkonzentration hat keinen sichtbaren Effekt.

Im Gegensatz dazu verläuft die Schneidreaktion mit hh5_5 wesentlich schneller (Abb. 2.60 auf Seite 76). Schon nach einer Stunde sind deutliche Produktbanden der geschnittenen Substrat-RNA zu erkennen. Nach 24 h ist über die Hälfte der eingesetzten RNA bereits geschnitten. Allerdings sind auch diese Bedingungen nicht optimal, so daß der Entwurf von neuen Substrat-RNAs mit effizienter schneidenden Ribozymen notwendig wurde.

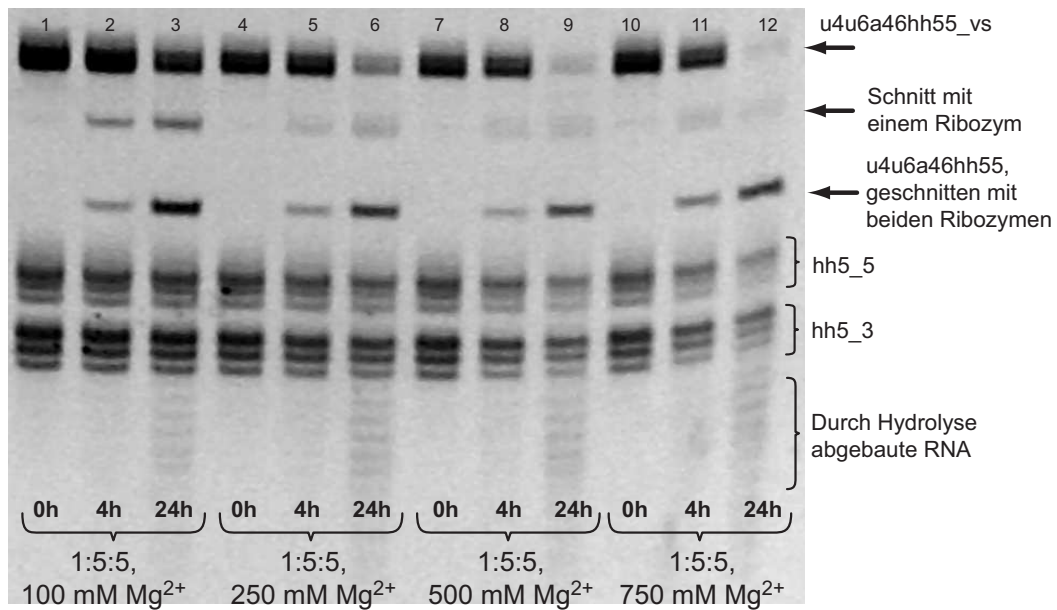


Abbildung 2.58: Denaturierendes Polyacrylamidgel (15 %, 7 M Harnstoff, 1.5 h bei 20 W, Anfärbung: EtBr/UV) der Schneidreaktion von u4u6a46hh5_vs mit hh5_5 und hh5_3 im Verhältnis 1:5:5 und bei verschiedenen Magnesiumkonzentrationen von 100, 250, 500 und 750 mM Mg²⁺. Es wurden Aliquote nach 0 h, 4 h und 24 h entnommen. Nach 24 Stunden erkennt man den Beginn der Hydrolyse der RNA.

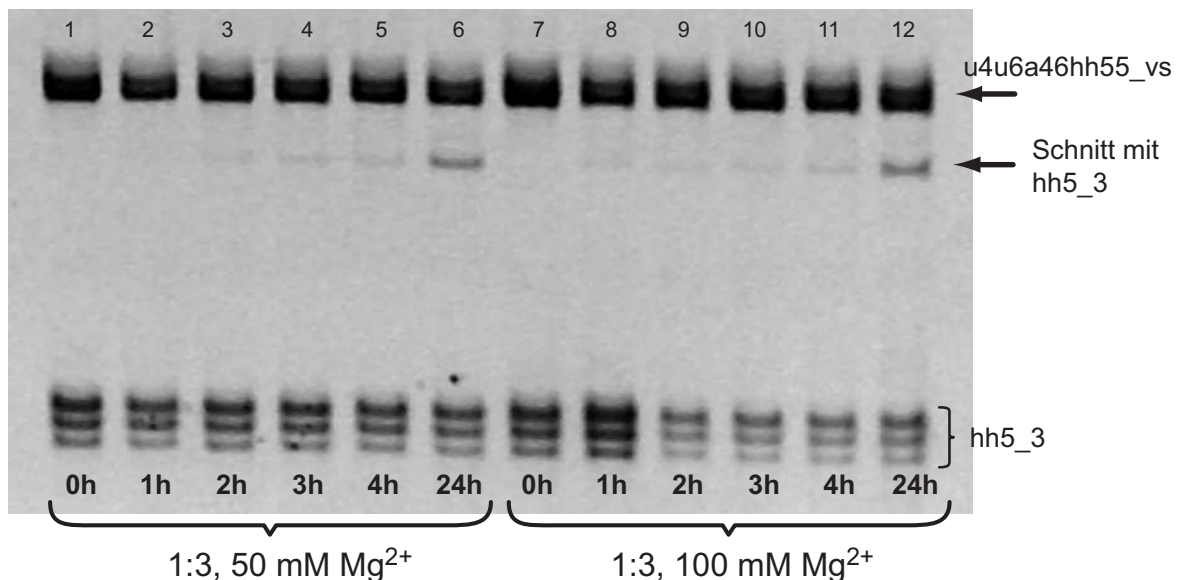


Abbildung 2.59: Denaturierendes Polyacrylamidgel (15 %, 7 M Harnstoff, 2 h bei 50 W, Anfärbung: EtBr/UV) des zeitlichen Verlaufs der Schneidreaktion von u4u6a46hh5_vs mit hh5_3 im Verhältnis 1:3 mit 50 mM Mg²⁺, nach 0 h, 4 h und 24 h (Spur 1-6). Daneben mit 100 mM Mg²⁺ (Spur 7-12).

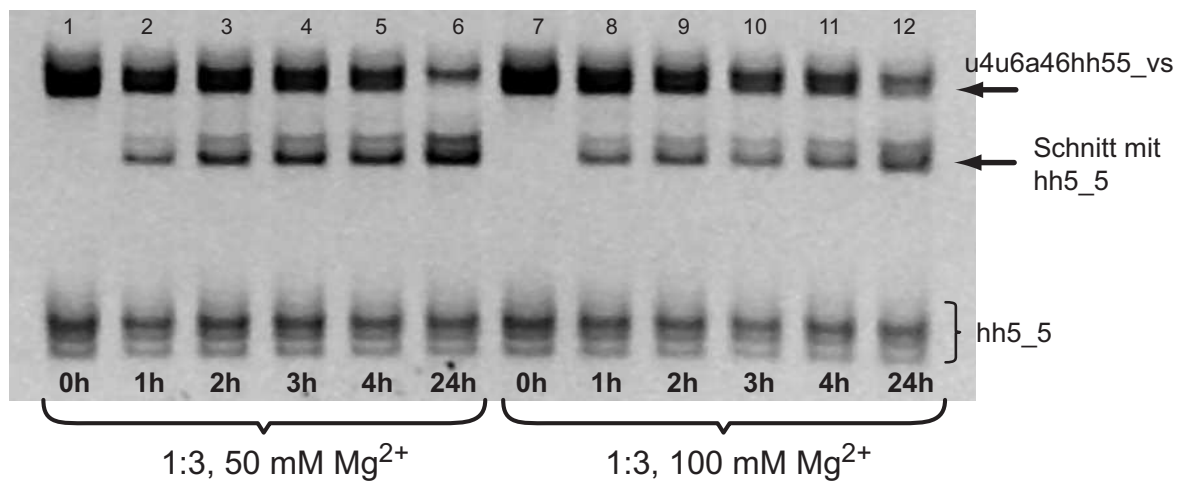


Abbildung 2.60: Denaturierendes Polyacrylamidgel (15 %, 7 M Harnstoff, 2 h bei 50 W, Anfärbung: EtBr/UV) des zeitlichen Verlaufs der Schneidreaktion von u4u6a46hh5_vs mit hh5_5 im Verhältnis 1:3 mit 50 mM Mg²⁺, nach 0 h - 4 h und 24 h (Spur 1-6). Daneben mit 100 mM Mg²⁺ (Spur 7-12). Die Reaktion liefert schon nach einer Stunde geschnittene RNA.

2.7.6 Synthese von u4u6a44hh7

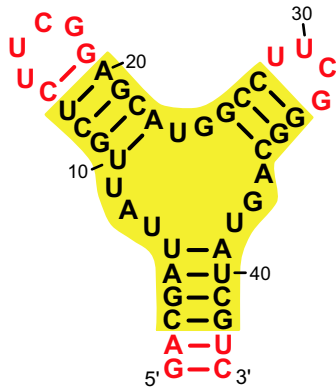


Abbildung 2.61: Sekundärstruktur von u4u6a44hh7

Nachdem gezeigt wurde, daß die u4u6a46hh5_vs-RNA unter Verwendung von hh5_3 eindeutig geschnitten wird (2.55 auf Seite 71), wurde ein weiteres RNA-Konstrukt, welches nur am 3'-Ende geschnitten werden soll, entworfen: u4u6a44hh7. Am 5'-Ende der Sequenz wird nur das für die verbesserte Transkription notwendige G plaziert und am 3'-Ende wird die GUC-Sequenz für die Ribozymerkennung verwendet, um die Schneidreaktion schneller und effizienter ablaufen zu lassen. Die entsprechende Sekundärstruktur der resultierenden u4u6a44hh7-RNA ist in Abb. 2.61 dargestellt.

Sequenzdesign

u4u6a44hh7_vs

5'GAC GAU UAU UGC UCU UCG GAG CAU GGC CUU CGG GCA GUA UCG UC G ACG GAG U 3' 52 nt

Nach dem Schneiden mit hh7_3b-Ribozym: u4u6a44hh7

5'GAC GAU UAU UGC UCU UCG GAG CAU GGC CUU CGG GCA GUA UCG UC 3' 44 nt

u4u6a44hh7top-plasmid

5'AAT TC TAA TAC GAC TCA CTA TA GAC GAT TAT TGC TCT TCG GAG CAT GGC CTT CGG GCA GTA TCG TCG ACG GAG T CTG CAG A 3'

u4u6a44hh7bot-plasmid

5'AGC TT CTG CAG ACT CCG TCG ACG ATA CTG CCC GAA GGC CAT GCT CCG AAG AGC AAT AAT CGT C TAT AGT GAG TCG TAT TA G 3'

hh7_3b

5'GA CUC CGU CCU GAU GAG CAC UUG UGC GAA ACG AUA C 3' 37 nt

hh7_3b_top

5'AAT TC TAA TAC GAC TCA CTA TA GGA CTC CGT CCT GAT GAG CAC TTG TGC GAA ACG ATA C CTG CAG A 3'

hh7_3b_bot

5'AGC TT CTG CAG CCT GAG GCA GGA CTA CTC GTG AAC ACG CTT TGC TAT G TAT AGT GAG TCG TAT TA G 3'

Abbildung 2.62: RNA- und DNA-Sequenzen für die Einklonierung von u4u6a44hh7_vs und hh7_3b in pUC19. In Grün ist der T7-Promotor gekennzeichnet, in Pink die EcoR I-Schnittstelle, in Rot die Pst I-Schnittstelle und in Türkis die Hind III-Schnittstelle. Die Basen für die Bindung des Ribozyms an die Substrat-RNA sind in blau gekennzeichnet.

Um eine eindeutige Bindung des hh7_3-Ribozyms am 3'-Ende zu gewährleisten, wurden acht Basen verwendet. Entsprechend den vorangegangenen Kapiteln ergeben sich für die Substrat-RNA u4u6a44hh7_vs und das dazu passende Ribozym hh7_3b die Sequenzen für die Einklonierung in pUC19 (Abb. 2.62).

Transkription und Aufreinigung

Die DNA-Sequenzen wurden für Testtranskriptionen von u4u6a44hh7_vs und hh7_3 von hybridisierter doppelsträngiger Templat-DNA verwendet. Die transkribierten RNAs wurden über Gelelektrophorese aufgereinigt und dann in einer Testschneidreaktion verwendet. Danach wurden die DNA-Sequenzen für die Klonierung und Herstellung der linearen plasmidischen DNA-Templates verwendet. Die Transkriptionsbedingungen wurden in 40 μ l-Transkriptionen optimiert. Für die beiden RNAs ergaben sich folgende Konditionen:

u4u6a44hh7_vs:

40 mM NTPs, 45 mM Mg^{2+} , 1.2 μ g Plasmid, 6 μ l T7-Polymerase., 6 h;

hh7_3b: 30 mM NTPs, 35 mM Mg^{2+} , 1.2 μ g Plasmid, 4 μ l T7-Polymerase, 24 h.

Für die präparativen Ansätze wurden die 40 μ l-Ansätze auf 20 ml skaliert. Die Transkriptionen wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen durchgeführt. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde zusätzlich Anorganische Phosphatase (*Inorganic Phosphatase*, IPP) zur Reaktionsmischung gegeben, um das gebildete Diphosphat zu Monophosphaten abzubauen [167].

Die Aufarbeitung erfolgt analog zu den bisher beschriebenen RNAs. Die Transkription wird nach der optimierten Zeit durch Zugabe von EDTA-Lösung beendet, um die Magnesiumionen zu komplexieren und so die Lösung möglichst Mg^{2+} -frei zu machen. Anschließend wird die Probe auf je 10 ml aufgeteilt, um Probleme mit einer zu großen Interphase bei der Chloroform/Phenol-Extraktion zu vermeiden. Nach Abtrennung der Proteine wird die roh-RNA durch Zugabe von Isopropanol zur wässrigen Phase in der Kälte über Nacht ausgefällt. Diese roh-RNA wird über ein großes denaturierendes 20 %-Polyacrylamidgel weiter für die Schneidreaktion aufgereinigt. Für die Substrat-RNA bzw. das Ribozym dauert die Elektrophorese 16 bzw. 14 h. Anschließend wird die saubere RNA aus dem Gel mittels Elektroelution zurückgewonnen und nochmals durch Zusatz von Isopropanol aus einer wässrigen Lösung gefällt. Die RNA wird zentrifugiert und die Pellets der RNA werden anschließend mit 70 %-Ethanol gewaschen und am Vakuumkonzentrator getrocknet. Für die 20 ml Transkriptionen von u4u6a44hh7_vs und hh7_3b ergaben sich Ausbeuten von 106 bis 169 nmol und 67 bis 300 nmol.

Neben der Aufreinigung mittels Gelelektrophorese wurde auch die HPLC-Aufreinigung für u4u6a44hh7_vs etabliert. Hierzu wurde die roh-RNA analog zur Gelelektrophorese

aufgearbeitet. Das Pellet der Hälfte einer 20 ml Transkription wurde in 1 ml Wasser gelöst und auf die Säule aufgetragen (Abb. 2.63).

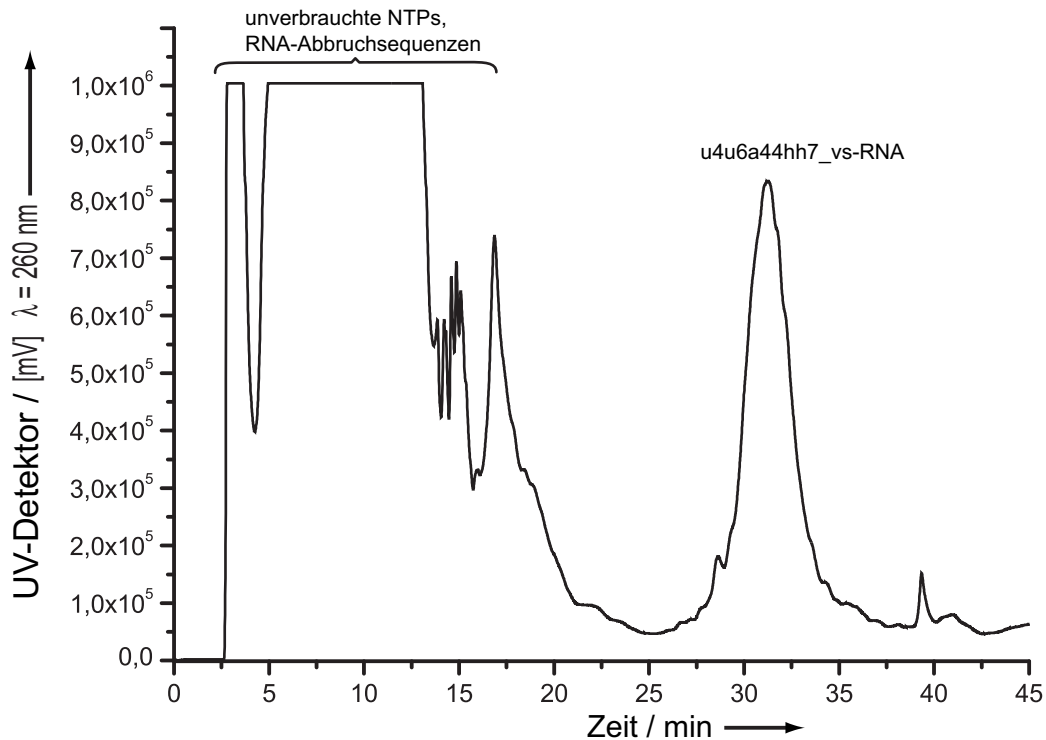


Abbildung 2.63: Chromatogramm der präparativen HPLC-Aufreinigung von u4u6a44hh7_vs. Puffer A: 25 mM TRIS, 2 mM EDTA pH 8.0; Puffer B: Puffer A + 1 M NH_4Cl . Säule: DNAPac PA 100, 9 x 250 mm (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Gradient: 0-55 % B 11 min., 55-100 % B 34 min., 100 % B 5 min., 100% B 5 min., 100 % A 5 min., 100% A 5 min. Flußrate: 2.5 ml/min., Temperatur: 85 °C.

Die HPLC-Trennung ist in kürzerer Zeit als die Elektrophorese durchführbar. Die so aufgereinigte RNA ist aber nicht so sauber wie nach einer Elektrophorese mit anschließender Elektroelution (Abb. 2.64 auf der nächsten Seite). Allerdings ist nach der UV-spektrometrischen Konzentrationsbestimmung die Gesamtausbeute der HPLC-gereinigten RNA um ca. 60 % höher als nach der Gelelektrophorese. Dies erklärt sich durch den Anteil der mitgeschleppten Verunreinigungen (RNA-Abbruchsequenzen) bei der HPLC, trotzdem bleibt der Unterschied groß. Aus dem Gel läßt sich kein quantitativer Vergleich ziehen, da die Banden zu intensiv sind. Um eine Aussage über den Einfluß der Verunreinigungen auf die Effizienz der Schneidreaktion zu treffen, muß diese mit gel- als auch HPLC-aufgereinigter RNA durchgeführt werden (s.u.).

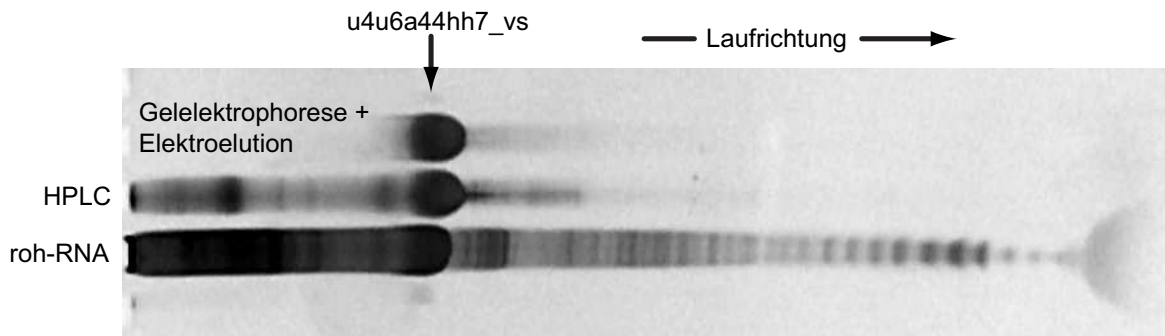


Abbildung 2.64: Denaturierendes Polyacrylamidgel (20 %, 7 M Harnstoff, 1:50 h bei 20 W, Anfärbung: EtBr/UV) des Vergleichs der Aufreinigung von u4u6a44hh7_vs durch Gelelektrophorese und HPLC. Als Vergleich die roh-RNA nach der Transkription.

Schneidreaktion

Zum Optimieren der Bedingungen der Schneidreaktion wurden jeweils Volumina von 20 μ l mit einer Konzentration der Substrat-RNA von 50 μ M verwendet. Das Ribozym wurde in gleichem Verhältnis 1:1 und 2:1 bei Magnesiumionenkonzentrationen von 25 mM und 50 mM zugesetzt. Als Reaktionspuffer diente eine Lösung von 40 mM TRIS,

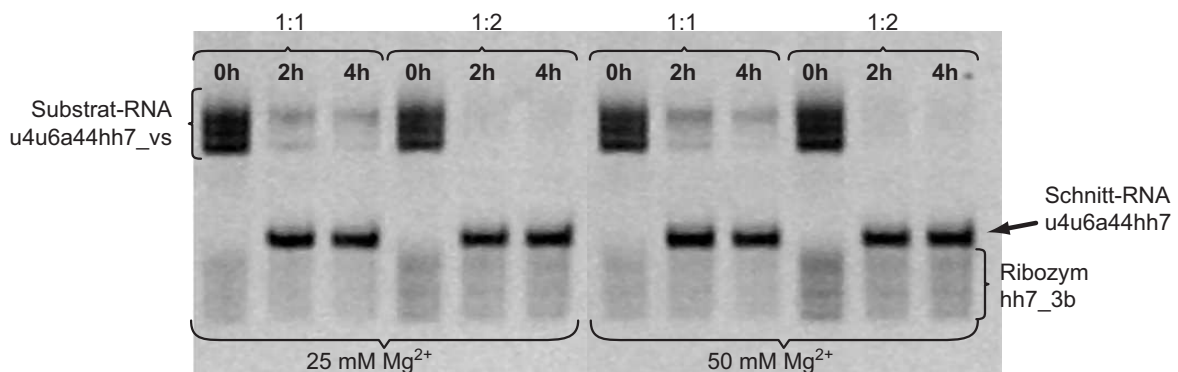


Abbildung 2.65: Denaturierendes Polyacrylamidgel (15 %, 7 M Harnstoff, 2 h bei 50 W, Anfärbung: EtBr/UV) der Schneidreaktion von u4u6a44hh7_vs mit hh7_3b bei unterschiedlichen Bedingungen. Nach zwei Stunden ist die Substrat-RNA bei 100 % Überschuß des Ribozyms vollständig geschnitten.

100 mM NaCl und 2 mM EDTA bei einem pH-Wert von 7.4. Es wurden nach 0, 2, 4 und 24 h Proben zum Fortgang der Schneidreaktion entnommen. Die Schneidreaktion der Aliquote wurde durch Zugabe von EDTA-Lösung gestoppt. Die Produkte wurden

mit einem denaturierenden (7 M Harnstoff) Polyacrylamidgel untersucht (Abb. 2.65 auf der vorherigen Seite).

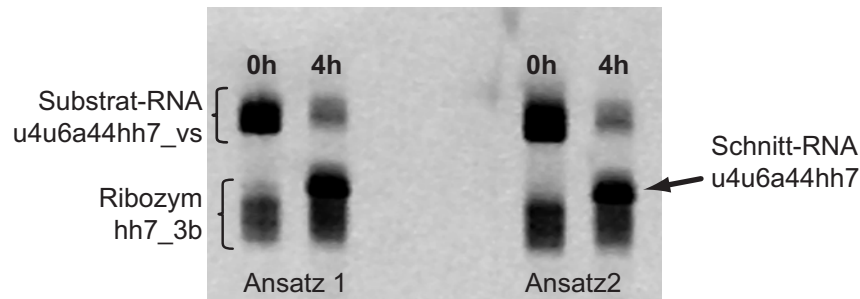


Abbildung 2.66: Denaturierendes Polyacrylamidgel (15 %, 7 M Harnstoff, 1 h bei 20 W, Anfärbung: EtBr/UV) der präparativen Schneidreaktion von *u4u6a44hh7_vs* mit *hh7_3b* im Verhältnis 1:1.2 mit 25 mM Mg^{2+} bei 37 °C nach vier Stunden.

Die Schneidreaktion verläuft schon bei Magnesiumionenkonzentrationen von 25 mM und einem Substrat-RNA:Ribozym-Verhältnis von 1:2 vollständig ab. Für die Erprobung unter präparativen Bedingungen stand das Ribozym *hh7_3b* nicht in ausreichender Menge zu Verfügung, daher wurde die Substrat-RNA und das Ribozym nur im Verhältnis 1:1.2 und nicht wie unter optimalen Bedingungen nötig im Verhältnis 1:2 eingesetzt. Für die Schneidreaktion wurden mit Elektrophorese aufgereinigte RNAs verwendet. Es wurden zwei Schneidreaktionen à 1 ml mit einer Konzentration von 84 μ M der Substrat-RNA *u4u6a44hh7_vs* angesetzt. Die beiden RNAs wurden im Reaktionspuffer (40 mM TRIS, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7.4) ohne Magnesiumchlorid durch Erhitzen auf 85 °C für 3 min und langsamen Abkühlen auf 37 °C hybridisiert. Durch Zugabe von Magnesiumchloridlösung wurde die Schneidreaktion initiiert. Zur Reaktionskontrolle wurden nach vier Stunden 0.5 μ l-Aliquote entnommen und auf einem Polyacrylamidgel untersucht (Abb. 2.66).

Nach vier Stunden ist bereits der größte Teil der Substrat-RNA geschnitten. Die Reaktion wurde nach fünfeinhalb Stunden durch Zugabe von EDTA-Lösung und Formamidpuffer beendet. Diese Reaktionslösung wurde anschließend über ein großes denaturierendes Gel (53 x 43 cm, 3 mm dick) aufgereinigt, um das Ribozym von der geschnittenen RNA zu separieren. Nach 15 h wurde die Elektrophorese beendet, die Bande des Ribozyms und der *u4u6a44hh7*-RNA waren ca. 1 cm voneinander getrennt. Die beiden Banden wurden ausgeschnitten und einer Elektroelution unterzogen. Die RNA wurde durch Fällung mit Isopropanol aus dem Elektroelutionspuffer isoliert.

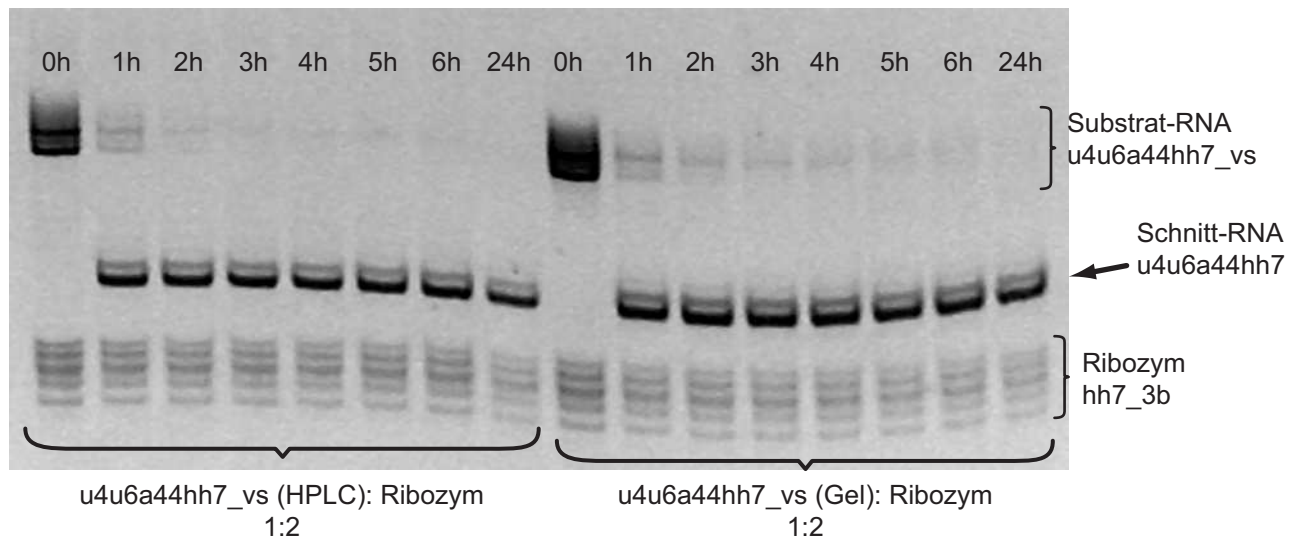


Abbildung 2.67: Denaturierendes Polyacrylamidgel (20 %, 7 M Harnstoff, 4 h bei 50 W, Anfärbung: EtBr/UV) des Vergleichs der Schneidreaktion von mit HPLC-aufgeklärter u4u6a44hh7_vs-RNA (links) mit Gel-aufgeklärter u4u6a44hh7_vs-RNA mit hh7_3b (gel-aufgeklärt) im Verhältnis 1:2 mit 25 mM Mg²⁺ bei 37 °C.

Es wurden durchschnittlich 56 % der eingesetzten RNA, bezogen auf die eingesetzte Substrat-RNA u4u6a44hh7_vs, nach der Aufreinigung der Schneidreaktion isoliert.

Der Vergleich von HPLC- und Gel-aufgeklärter Substrat-RNA u4u6a44hh7_vs beim Schneiden mit gelaufgereinigtem hh7_3b-Ribozym zeigt keine Unterschiede in der Effizienz (Abb. 2.67).

NMR-Spektren

Die entsalzte RNA wurde in insgesamt 250 µl 10 mM Kaliumphosphatpuffer mit 2 mM EDTA unter Zusatz von 10 % D₂O, pH = 6.6 gelöst. Die Konzentration betrug 0.62 mM. Vor der Abfüllung in das Shigemiröhrchen wurde die Lösung 3 min auf 85 °C erhitzt und dann schnell auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die optimale Auflösung der Iminosignale bei den Jump & Return-Echo Spektren wurde bei einer Temperatur von 290 K und einem Delay τ von 40 µs erreicht. Es wurden ein- und zweidimensionale Jump & Return-Echo Spektren gemessen, um Korrelationen der Iminoprotonen aufzulösen und daraus auf die Anzahl der vorliegenden Konformere der RNA zu schließen.

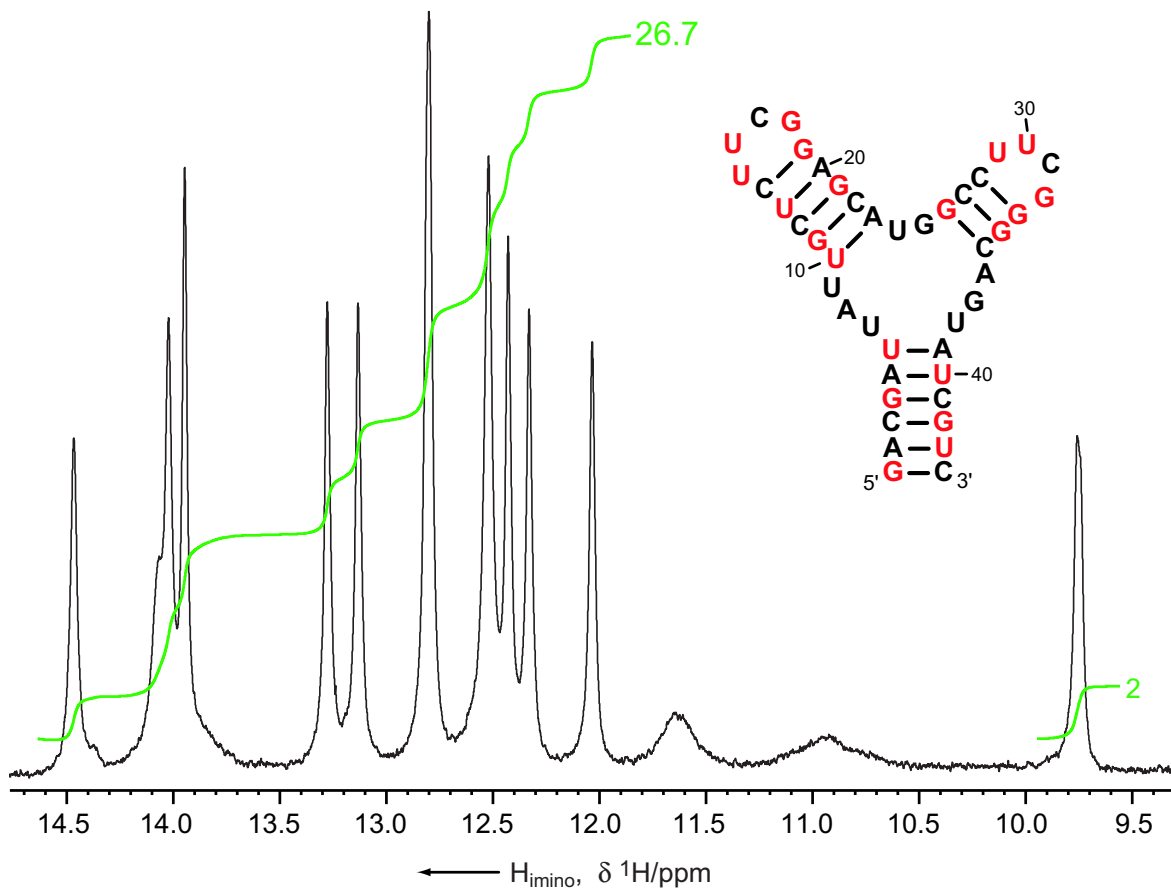


Abbildung 2.68: Iminobereich des J&R-Echo-Protonenspektrums der u4u6a44hh7-RNA ($T=290$ K, 600 MHz). In grün sind die Integrale über die Iminoprotonen angegeben. Auffällig ist das separierte Signal der Guanosin-Iminoprotonen aus den beiden UUCG-Schleifen [114, 115] bei 9.75 ppm.

Im Bereich der in Wasserstoffbrücken eingebundenen Iminoprotonen im eindimensionalen Protonenspektrums (Abb. 2.68) erhält man durch Integration insgesamt 29 Signale, wenn man das Signal bei 9.75 ppm auf eine Fläche von 2 entsprechend den beiden Iminoprotonen des Guanins aus den UUCG-Schleifen kalibriert [114, 115]. Diese Zahl der gefundenen Signale ist größer als erwartet, wenn man die gezeigte Sekundärstruktur von u4u6a44hh7-RNA zu Grunde legt. D.h. die RNA liegt nicht nur vorrangig in einer Konformation vor sondern wahrscheinlich als Gemisch verschiedener Konformationen. Allerdings ist der Unterschied zu den erwarteten 20 Signalen auch nicht zu groß.

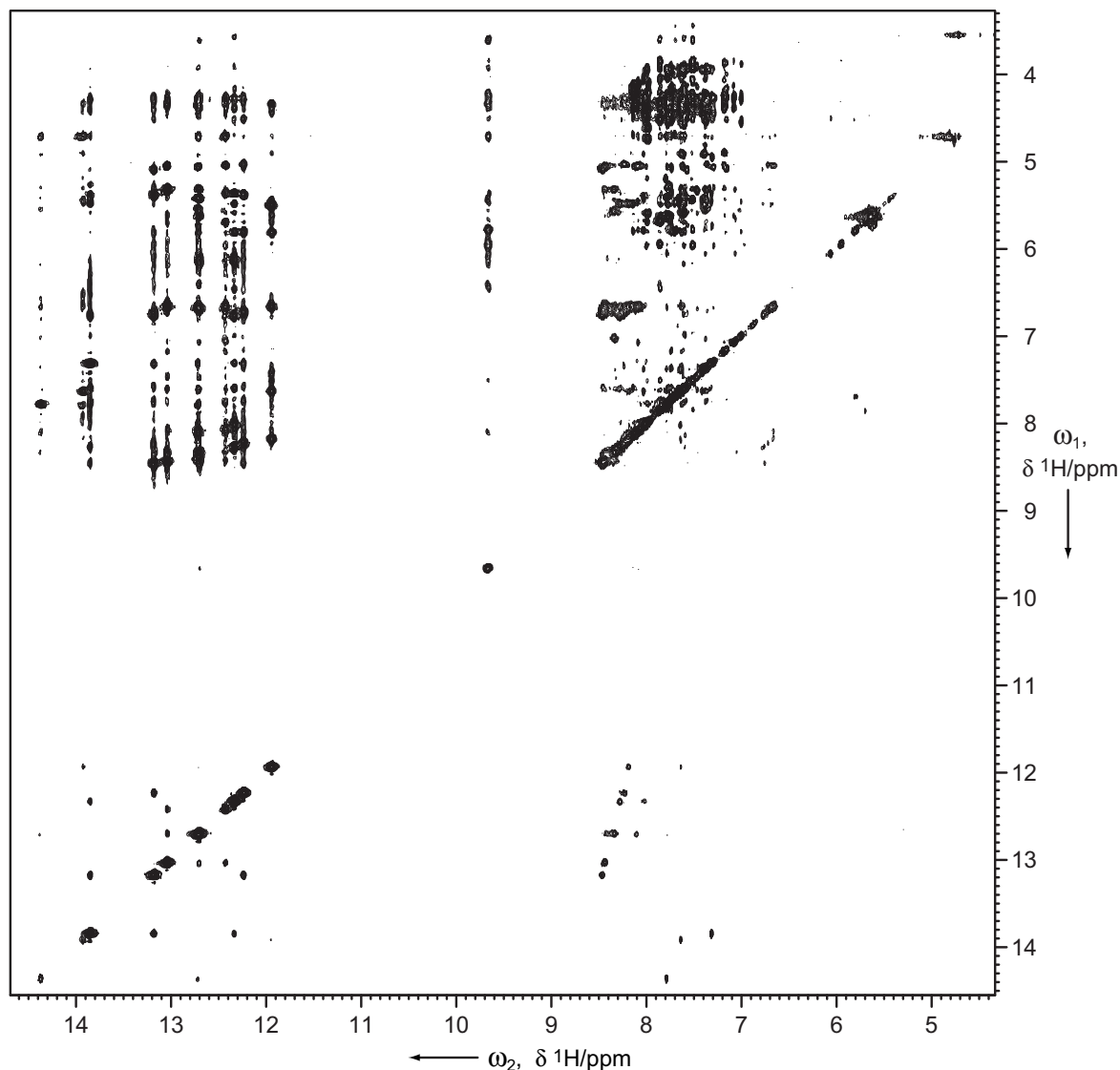


Abbildung 2.69: Ausschnitt aus dem 2D-J&R-NOESY-Spektrum von *u4u6a44hh7*-RNA. ($T=290\text{ K}$, $\tau_m=300\text{ ms}$, 600 MHz).

Im zweidimensionalen J&R-NOESY mit einer Mischzeit von 300 ms erkennt man zahlreiche Kreuzsignale, die ebenfalls auf das Vorliegen einer gefalteten RNA hindeuten (Abb. 2.69). Ein detaillierter Blick auf die Kreuzsignale der Iminoregion (Abb. 2.70 auf der nächsten Seite) zeigt deutlich das Kreuzsignal von G1 zu U43, welches in den anderen Konstrukten nicht vorhanden ist. Die chemische Verschiebung von U43 mit 14.5 ppm ist auffällig tieffeldig. Dieses Kreuzsignal ist nur einmal vorhanden, aber das Integral über das Signal im eindimensionalen Spektrum (Abb. 2.68 auf der vorherigen

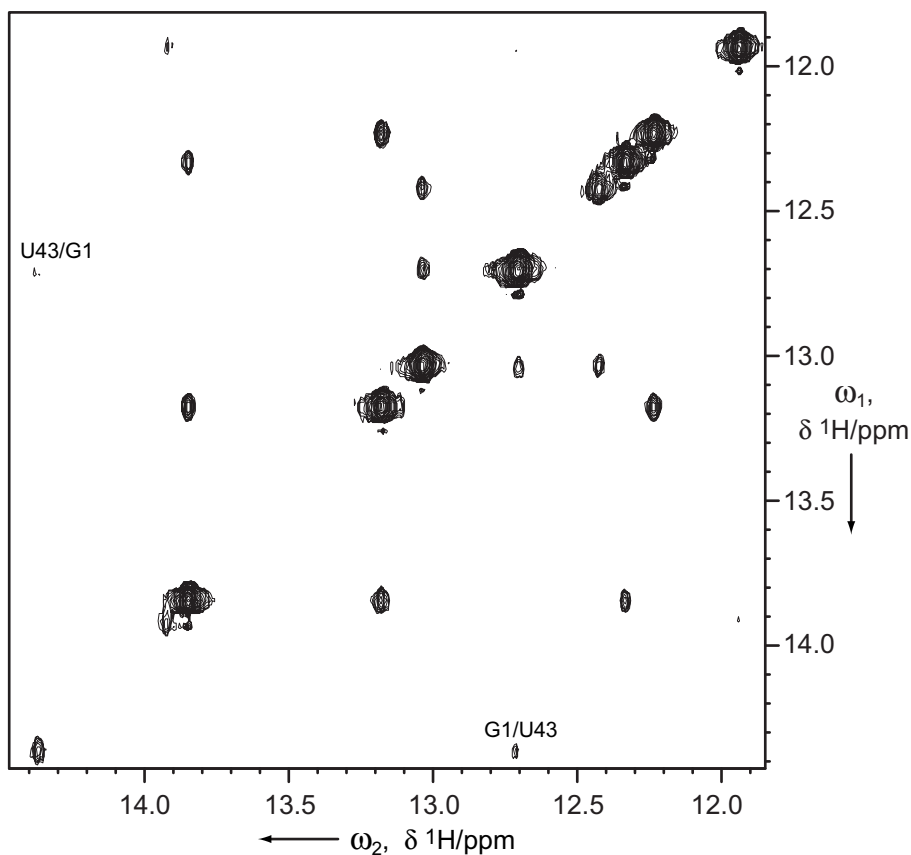


Abbildung 2.70: Imino-region des 2D-J&R-NOESY-Spektrums von u4u6a44hh7 ($T=290$ K, $\tau_m=300$ ms, 600 MHz). Deutlich erkennbar ist das Kreuzsignal zwischen den Iminoprotonen von G1 und U43. Die Imino-resonanz von U43 kommt bei 14.5 ppm sehr tieffeldig.

Seite) ist ungefähr zwei, d.h. daß wahrscheinlich zwei solcher Basenpaarungen vorhanden sind. Dies spricht für eine Mischung von Konformeren von u4u6a44hh7, die zu mehreren Signalsätzen führen.

2.7.7 Synthese von u4u6a46phh2

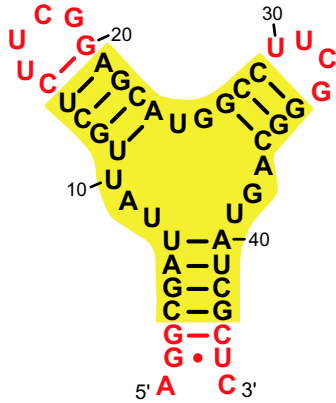


Abbildung 2.71: Sekundärstruktur von u4u6a46phh2

Unter Umständen schlechter als bei normalen T7-Promotor ablaufen, so daß die Ausbeuten dementsprechend sinken.

Neben der u4u6a44hh7-RNA wurde noch eine andere Methode zur Vermeidung von der 5'-Inhomogenität getestet. Wird eine andere Promotorsequenz in der Templat-DNA verwendet, läßt sich der Anteil der 5'-Heterogenität entscheidend verringern [171]. Von diesem sogenannten ϕ -Promotor beginnt die Transkription mit einem A als Startnukleotid statt des G. Dies führt dazu, daß die Sequenz, die den Kernbereich der U4/U6-Wechselwirkung enthalten soll, am 5'-und 3'-Ende modifiziert werden muß. Man erhält nach dem Schneiden am 3'-Ende mit dem passenden hh2_3b-Ribozym eine 46 Basen lange RNA u4u6a46phh2 (Abb. 2.71). Durch den veränderten Promotor und das beginnende A der Templatsequenz kann die Transkription unter Umständen schlechter als bei normalen T7-Promotor ablaufen, so daß die Ausbeuten dementsprechend sinken.

Sequenzdesign

Für die Substrat-RNA u4u6a44hh7_vs und das entsprechende Ribozym hh2_3b wurden die in Abb. 2.72 auf der nächsten Seite gezeigten Sequenzen für die Einklonierung in pUC19 verwendet. Zu beachten ist das Ende des ϕ -Promotors mit TA (Position 16 und 17 im Promotor) im Vergleich zu AG im normalen T7-Promotor.

Transkription und Aufreinigung

Analog zur u4u6a44hh7-RNA (2.7.6 auf Seite 77) wurde vor dem Klonieren der Templat-DNA in pUC19 die RNA von den hybridisierten DNA-Einzelsträngen transkribiert und nach anschließender Gelaufreinigung einer Testschneidreaktion mit dem entsprechenden hh2_b-Ribozym unterzogen. Dieser Test verlief erfolgreich, so daß im folgenden die plasmidische Templat-DNA mit diesen Methoden in größeren Mengen hergestellt wurde. Die Transkriptionsbedingungen wurden wie vorher beschrieben (Abschnitt 2.8.6) optimiert. Folgende Bedingungen wurden für die präparativen Transkriptionen verwendet:

u4u6a46phh2_vs
 5'A GG CGA UUA UUG CUC UUC GGA GCA UGG CCU UCG GGC AGU AUC GCU CGG CCA UGC CC 3' 56 nt

Nach dem Schneiden mit hh2_3b-Ribozym: u4u6a46phh2
 5'AGG CGA UUA UUG CUC UUC GGA GCA UGG CCU UCG GGC AGU AUC GCU C 3' 46 nt

u4u6a46phh2top-plasmid
 5'AAT TC TAA TAC GAC TCA CTA TTA GG CGA TTA TTG CTC TTC GGA GCA TGG CCT TCG GGC AGT ATC GCT CGG CCA TGC CC CTG CAG A 3'

u4u6a46phh2bot-plasmid
 5'AGC TT CTG CAG GG GCA TGG CCG AGC GAT ACT GCC CGA AGG CCA TGC TCC GAA GAG CAA TAA TCG CC TAAT AGT GAG TCG TAT TA G 3'

hh2_3b
 5'GG CAU GGC CCU GAU GAG CAC UUG UGC GAA AGC GAU AC 3' 37 nt

hh2_3b_top
 5'AAT TC TAA TAC GAC TCA CTA TA GG CAT GGC CCT GAT GAG CAC TTG TGC GAA AGC GAT AC CTG CAG A 3'

hh2_3b_bot
 5'AGC TT CTG CAG GT ATC GCT TTC GCA CAA GTG CTC ATC AGG GCC ATG CC TAT AGT GAG TCG TAT TA G 3'

Abbildung 2.72: RNA- und DNA-Sequenzen für die Einklonierung von u4u6a46phh2_vs und hh2_3b in pUC19. In Grün ist der T7-Promotor gekennzeichnet, in Pink die EcoRI-Schnittstelle, in Rot die Pst I-Schnittstelle und in Türkis die Hind III-Schnittstelle. Unterstrichen sind die beiden, im Vergleich zum normalen T7-Promotor, unterschiedlichen Basen.

u4u6a46phh2_vs:

30 mM NTPs, 45 mM Mg²⁺, 1.4 µg Plasmid, 4 µl T7-Polymerase, 6 h;

hh2_3b: 40 mM NTPs, 45 mM Mg²⁺, 1.8 µg Plasmid, 4 µl T7-Polymerase, 6 h.

Ebenso wie bei der u4u6a44hh7_vs wurden die RNAs über Gelelektrophorese und Anionenaustauscher-HPLC für die Schneidreaktion gereinigt. Das Ribozym wurde einer Gelelektrophorese unterzogen, dabei wurden Ausbeuten von 109 bis 263 nmol aus einer 20 ml Transkription erzielt. Für u4u6a46phh2_vs-RNA konnten im Fall der Gelelaufreinigung 22.6 - 100 nmol und über HPLC 92.5 nmol aus einer 20 ml Transkription isoliert werden. Für die Herstellung der NMR-Probe wurde nur die per Gelelektrophorese gereinigte Substrat-RNA verwendet, um Verunreinigungen, die eventuell aus der HPLC-Aufreinigung mitgeschleppt wurden, zu vermeiden.

Schneidreaktion

Analog zur u4u6a44hh7_vs-RNA (2.7.6 auf Seite 77), wurde die Schneidreaktion mit Volumina von 20 μ l mit einer Konzentration der Substrat-RNA von 50 μ M durchgeführt. Das Ribozym wurde in gleicher und doppelter Menge bei Mg^{2+} -Konzentrationen von 25 mM und 50 mM zugesetzt. Es wurden nach 0 h, 2 h, 4 h und 24 h Proben zum Fortgang der Schneidreaktion entnommen. Diese Aliquote wurden durch Zugabe von EDTA-Lösung gestoppt und dann über ein denaturierendes (7 M Harnstoff) Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb. 2.73). Für eine schnelle und vollständige Schnei-

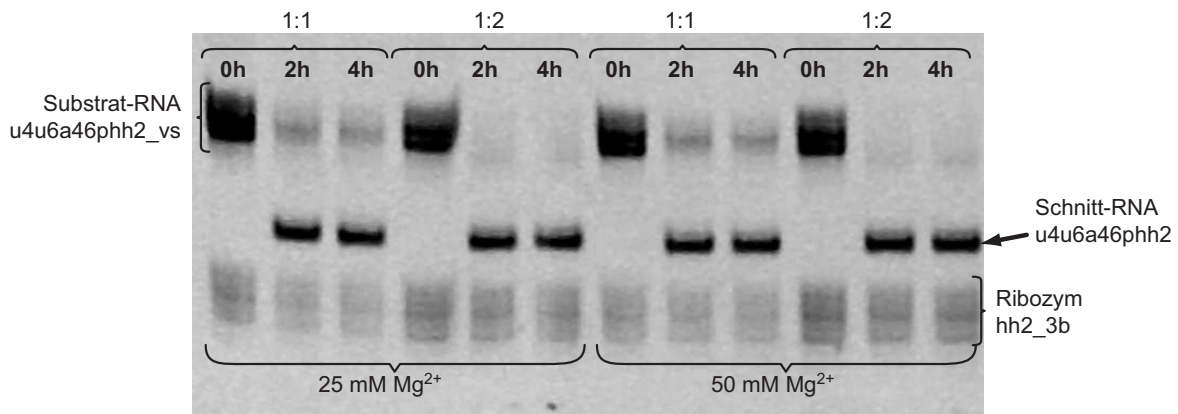


Abbildung 2.73: Denaturierendes Polyacrylamidgel (15 %, 7 M Harnstoff, 2 h bei 50 W, Anfärbung: EtBr/UV) der Schneidreaktion von u4u6a46phh2_vs mit hh2_3b bei unterschiedlichen Bedingungen. Nach zwei Stunden ist die Substrat-RNA bei 100 %igen Überschuss des Ribozyms vollständig geschnitten.

reaktion haben sich folgende Bedingungen als optimal herausgestellt: 25 mM Mg^{2+} und ein Verhältnis von Substrat-RNA zu Ribozym von 1:2. Dementsprechend wurden die präparativen Schneidreaktionen analog zu den oben beschriebenen Reaktionen von u4u6a44hh7_vs angesetzt. Nach vier Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA-Lösung gestoppt und die geschnittene RNA durch Gelelektrophorese von der Ribozym-RNA und der abgeschnittenen RNA gereinigt. Insgesamt wurde die RNA von zwei 20 ml-Transkriptionen zur Herstellung einer NMR-Probe verwendet. Nach der Aufreinigung der geschnittenen RNA wurden durchschnittlich 48 % in Bezug auf die eingesetzte Substrat-RNA erhalten.

NMR-Spektren

Die RNA wurden in insgesamt 250 μl Volumen für die Verwendung von Shigemi-Röhrchen gelöst. Die NMR-Messungen wurden mit einer RNA-Konzentration von 0.38 mM durchgeführt. Die zuvor entsalzte RNA wurde hierzu in einer Lösung von 10 mM Kaliumphosphatpuffer mit 2 mM EDTA unter Zusatz von 10 % D_2O , pH = 6.6 gelöst. Die Lösung wurde vor der Messung 3 min. auf 85 °C erhitzt und dann schnell auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

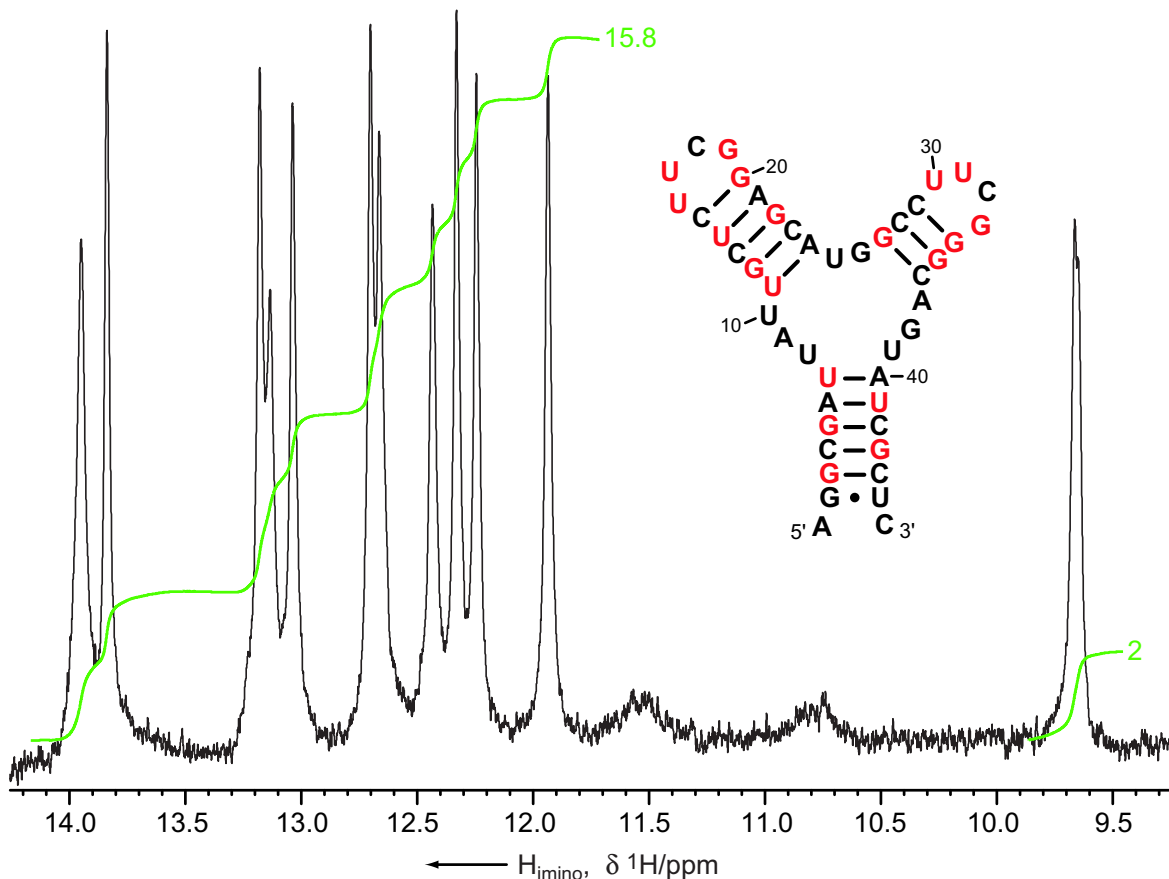


Abbildung 2.74: Iminobereich des J&R-Echo-Protonenspektrums der *u4u6a46phh2*-RNA ($T=290$ K, 600 MHz). In grün sind die Integrale über die Iminoprotonen angegeben. Das Integral des separierten Signals der Guanodin-Iminoprotonen aus den beiden UUCG-Schleifen [114, 115] bei 9.65 ppm wurde auf zwei kalibriert.

Die beste Auflösung der Iminosignale der basengepaarten Protonen wurden bei einer Temperatur von 290 K und einem Delay τ von 40 μs gefunden. Alle Jump & Return-Echo Spektren wurden unter diesen Bedingungen aufgenommen. Aus der Integration

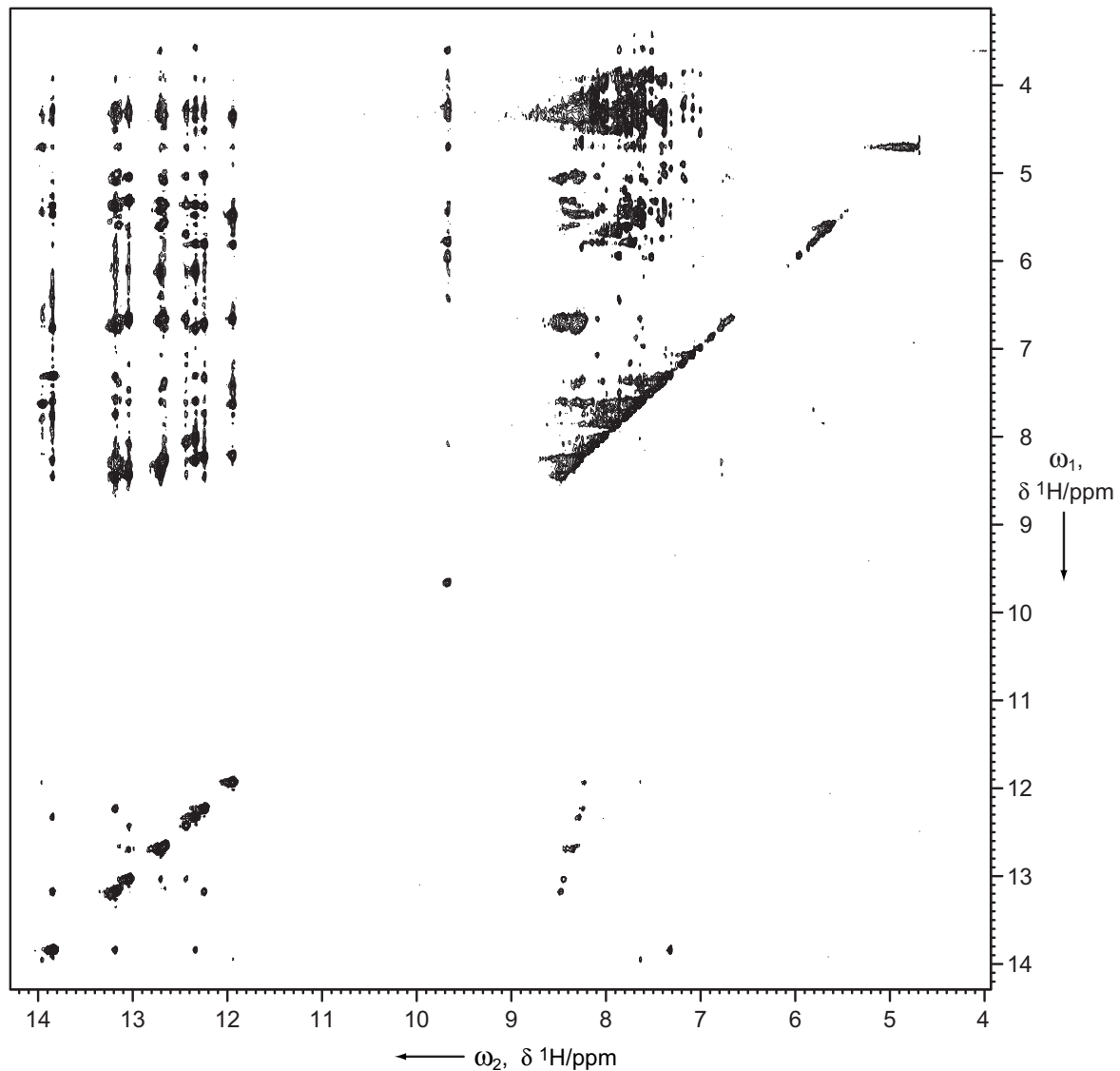


Abbildung 2.75: Ausschnitt aus dem 2D-J&R-NOESY-Spektrum von u4u6a46phh2-RNA. ($T=290\text{ K}$, $\tau_m=300\text{ ms}$, 600 MHz).

der Signale im Iminobereich erhält man ungefähr ein Verhältnis von ca. 1:9. Dies entspricht 18 Protonen, wenn die Protonen der Guanine aus den UUCG-Schleifen auf zwei kalibriert werden. Diese Anzahl entspricht der erwarteten Anzahl von Iminosignalen für die angenommene Sekundärstruktur von u4u6a46phh2. Die Iminoprotonen des Wobble-Basenpaares G·U sind aufgrund des offenen Stamms in diesem Konstrukt nicht in Wasserstoffbrücken fixiert und im Spektrum nicht sichtbar. Somit liegt die u4u6a46phh2-RNA sehr wahrscheinlich nur in einer Konformation vor. Ob diese der

erwarteten Sekundärstruktur entspricht, müssen weitere Experimente mit $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -gelabelter RNA zeigen. Im zweidimensionalen J&R-NOESY mit einer Mischzeit von 300 ms erkennt man, wie bei den anderen bisher synthetisierten RNAs auch, zahlreiche Kreuzsignale, die ebenfalls auf das Vorliegen einer gefalteten RNA hindeuten (Abb. 2.75 auf der vorherigen Seite). Ein detaillierter Blick auf die Kreuzsignale der

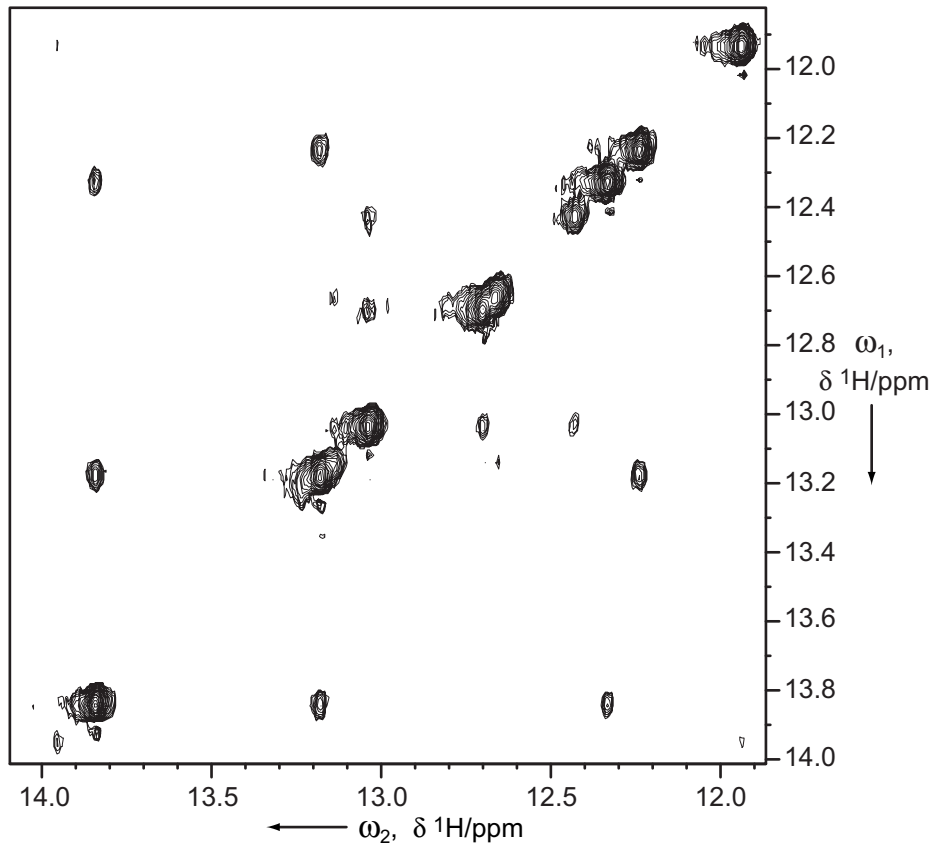


Abbildung 2.76: Iminoregion des 2D-J&R-NOESY-Spektrums von u4u6a46phh2 ($T=290\text{ K}$, $\tau_m=300\text{ ms}$, 600 MHz).

Iminoregion (Abb. 2.76) zeigt ein ähnliches Muster für die Kreuzsignale wie sie auch für u4u6a42 und u4u6a44hh7 gefunden wurden. Somit weist auch u4u6a46phh2 mit hoher Wahrscheinlichkeit die gleichen Basenpaarungen wie die anderen Konstrukte aus der Kernregion des U4/U6-A Konstruktes auf.

2.7.8 Synthese von u4u6a43de1

Neben Ribozymen kann man auch sogenannte DNA-Enzyme verwenden, um eine homogene RNA durch Schneiden am 3'-Ende herzustellen. Um diese Methode zu etablieren wurde daher ein dementsprechendes Konstrukt, u4u6a43de1_vs durch Transkription von plasmidischer Templat-DNA hergestellt und anschließend einer Schneidreaktion mit den passenden DNA-Enzym de1_3 unterzogen.

Sequenzdesign

Für die Schneidreaktion wurde das sogenannte 10-23 DNA-Enzym verwendet (2.6.3 auf Seite 34), welches die Sequenz RY innerhalb der Substrat-RNA nach dem R schneidet (R= A oder G und Y= U oder C). Somit mußte die ursprüngliche Sequenz der U4U6-A-RNA um ein G verlängert werden. Daraus resultiert nach dem Schneiden eine am 3'-Ende ungepaarte RNA. Je nach vorhergehenden Basenpaaren kann dies zu Instabilitäten bei der Ausbildung der Sekundärstruktur führen. Um eine definierte Bindung des DNA-Enzyms an die RNA zu gewährleisten, wurden Bindungsarme von je acht Basen an jedem Ende gewählt (Abb. 2.77). Somit ist die zu schneidende

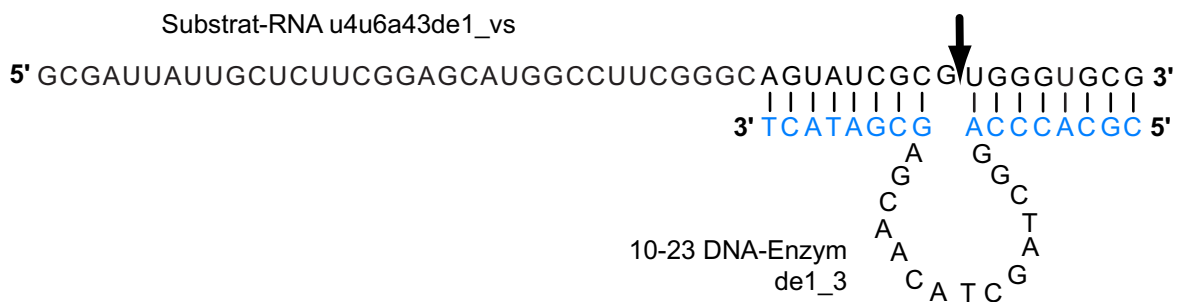


Abbildung 2.77: Sekundärstrukturen des Komplexes aus zu schneidender u4u6a43de1_vs-RNA mit dem entsprechenden DNA-Enzym de1_3. In Blau sind die Basen der Bindungsarme des DNA-Enzyms gekennzeichnet, der Pfeil markiert die Schnittstelle an der Substrat-RNA.

RNA u4u6a43de1_vs 51 Basen lang, das entsprechende 10-23-DNA-Enzyme de1_3 31 Basen. Die Sequenz für die Substrat-RNA wurde in pUC19 inkloniert. Das DNA-Enzym wurde hingegen bei der Firma Metabion, Martinsried, bestellt. Dabei wurden die folgenden Sequenzen verwendet (Abb. 2.78 auf der nächsten Seite).

u4u6a43de1_vs
 5'GCG AUU AUU GCU CUU CGG AGC AUG GCC UUC GGG CAG UAU CGC GUG GGU GCG 3' 51 nt

Nach dem Schneiden mit de1_3-DNA-Enzym: u4u6a43de1
 5'GCG AUU AUU GCU CUU CGG AGC AUG GCC UUC GGG CAG UAU CGC G 3' 43 nt

u4u6a43de1top-plasmid
 5'AAT TC TAA TAC GAC TCA CTA TA GCG ATT ATT GCT CTT CGG AGC ATG GCC TTC GGG CAG TAT CGC GTG GGT GCG CTG CAG A 3'

u4u6a43de1bot-plasmid
 5'AGC TT CTG CAG CGC ACC CAC GCG ATA CTG CCC GAA GGC CAT GCT CCG AAG AGC AAT AAT CGC TAT AGT GAG TCG TAT TA G 3'

de1_3
 5'CGC ACC CAG GCT AGC TAC AAC GAG CGA TAC T 3' 31 nt

Abbildung 2.78: *Verwendete Sequenzen für die Klonierung bzw. Bestellung der DNA-Enzyms. In Grün ist der T7-Promotor gekennzeichnet, in Pink die EcoR I-Schnittstelle, in Rot die Pst I-Schnittstelle und in Türkis die Hind III-Schnittstelle. Die Basen der Bindungsarme sind in Blau markiert.*

Transkription und Aufreinigung

Die Transkription von u4u6a43de1_vs-RNA wurde unter folgenden optimalen Transkriptionsbedingungen durchgeführt: 1.6 μg Plasmid, 30 mM NTPs, 35 mM Mg^{2+} und 6 μl T7-Polymerase über 4 h. Es wurden mehrere Transkriptionen à 2 ml durchgeführt. Die roh-RNA wurde mittels Anionenaustauscher-HPLC an einer präparativen DIONEX DNAPac-100 Säule gereinigt. Es wurden die gleichen Bedingungen wie für die u4u6a44hh7_vs-RNA (2.7.6 auf Seite 77) angewendet. Die gesammelten Fraktionen wurden auf einem denaturierenden Gel überprüft und dann vereinigt. Die im HPLC-Puffer gelöste RNA wurde gefriergetrocknet, um das Volumen zu verringern. Das noch enthaltene Salz wurde über eine PD-10-Säule entfernt, die RNA wiederum gefriergetrocknet und dann anschließend in 500 μl Wasser gelöst. Aus zwei 2 ml-Transkriptionen wurden schließlich 26.5 nmol u4u6a43de1_vs-RNA erhalten.

Schneidreaktion

Für die Schneidreaktion wurden jeweils getrennte Lösungen der RNA bzw. des DNA-Enzyms à 25 μl im Reaktionspuffer angesetzt (20 mM MgCl_2 , 150 mM NaCl, 50 mM EPPS pH 7.5). RNA und DNA-Enzym wurden in folgenden Verhältnissen eingesetzt: 1:1, 2:1, 5:1 und 10:1. Die beiden Reaktionslösungen wurden auf 37 °C erwärmt und dann zusammengegeben. Es wurde für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Reaktionskontrolle wurden nach 20, 40, 60, 120 min und nach 24 Stunden Aliquote entnom-

men und mit EDTA-Lsg. gestoppt. Die Proben wurden auf einem denaturierenden 15 %-Gel aufgetrennt und mit EtBr-Lösung angefärbt (Abb. 2.79). Schon nach 20 Minu-

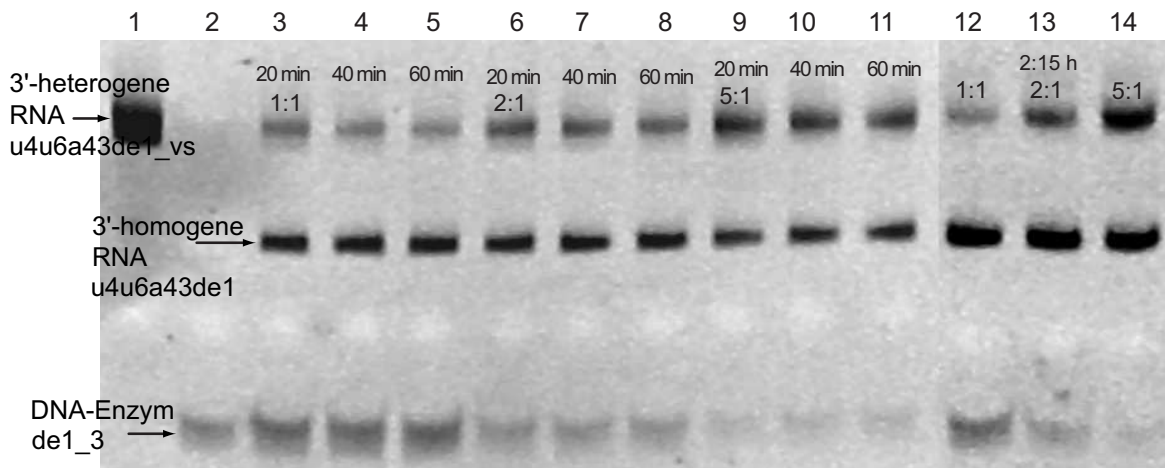


Abbildung 2.79: Denaturierendes Polyacrylamidgel (15 %, 7 M Harnstoff, 1:30 h bei 20 W, Anfärbung: EtBr/UV) der Schneidreaktion von u4u6a43d1_vs-RNA mit dem DNA-Enzym de1_3 bei mit verschiedenen Konzentrationen des DNA-Enzyms bei 20 mM Mg²⁺. Gut zu erkennen ist in Spur 12, daß nach 2:15 h bei einem Substrat-Enzym-Verhältnis von 1:1 fast die komplette heterogen Substrat-RNA verschwunden ist.

ten erkennt man die Bande der geschnittenen u4u6a43de1-RNA. Nach mehr als zwei Stunden ist die Bande der Substrat-RNA fast vollständig verschwunden (Abb. 2.79, Spur 12). Wird das DNA-Enzym im Unterschuß eingesetzt, läuft die Reaktion erkennbar langsamer ab (Spur 6 und 9).

Trotz des offensichtlichen Erfolges der Testreaktion wurde diese Methode bei der präparativen Herstellung von RNA nicht herangezogen, da die benötigte Menge an DNA-Enzyme den finanziellen Rahmen gesprengt hätte.

2.8 U4/U6-A aus chemischer Synthese

u4u6a42chem

Als Referenz für die biochemisch hergestellten U4/U6-A Konstrukte wurde die RNA auch chemisch synthetisiert. Die Synthese von Herrn Dr. Brian Sproat am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie wurde nach der TBDMS-Methode durchgeführt [219–222]. Es wurden 1 μmol des Natriumsalzes der u4u6a42-RNA synthetisiert. Die RNA wurde über HPLC gereinigt und als lyophilisierte Substanz zur Verfügung gestellt.

NMR-Spektren

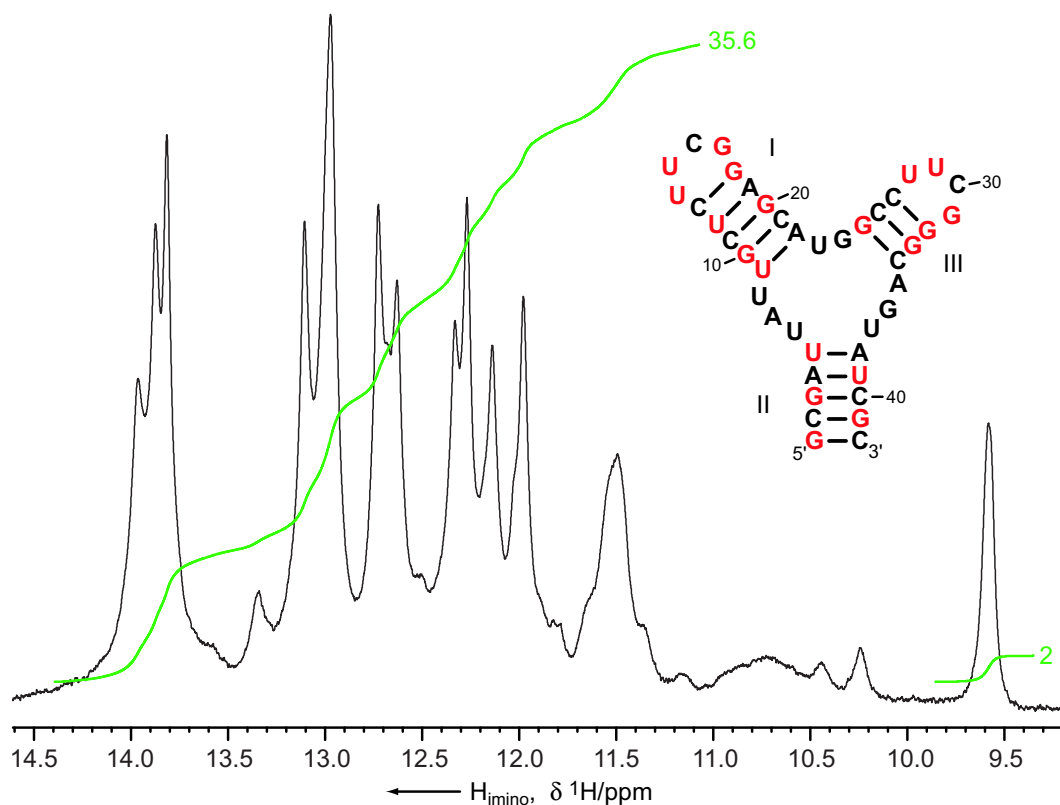


Abbildung 2.80: Iminobereich des J&R-Echo-Protonenspektrums der u4u6a42chem-RNA ($T=290\text{ K}$, 600 MHz). In grün sind die Integrale über die Iminoprotonen angegeben. Das Integral des separierten Signals der Guanosin-Iminoprotonen aus den beiden UUCG-Schleifen [114, 115] bei 9.6 ppm wurde auf zwei kalibriert.

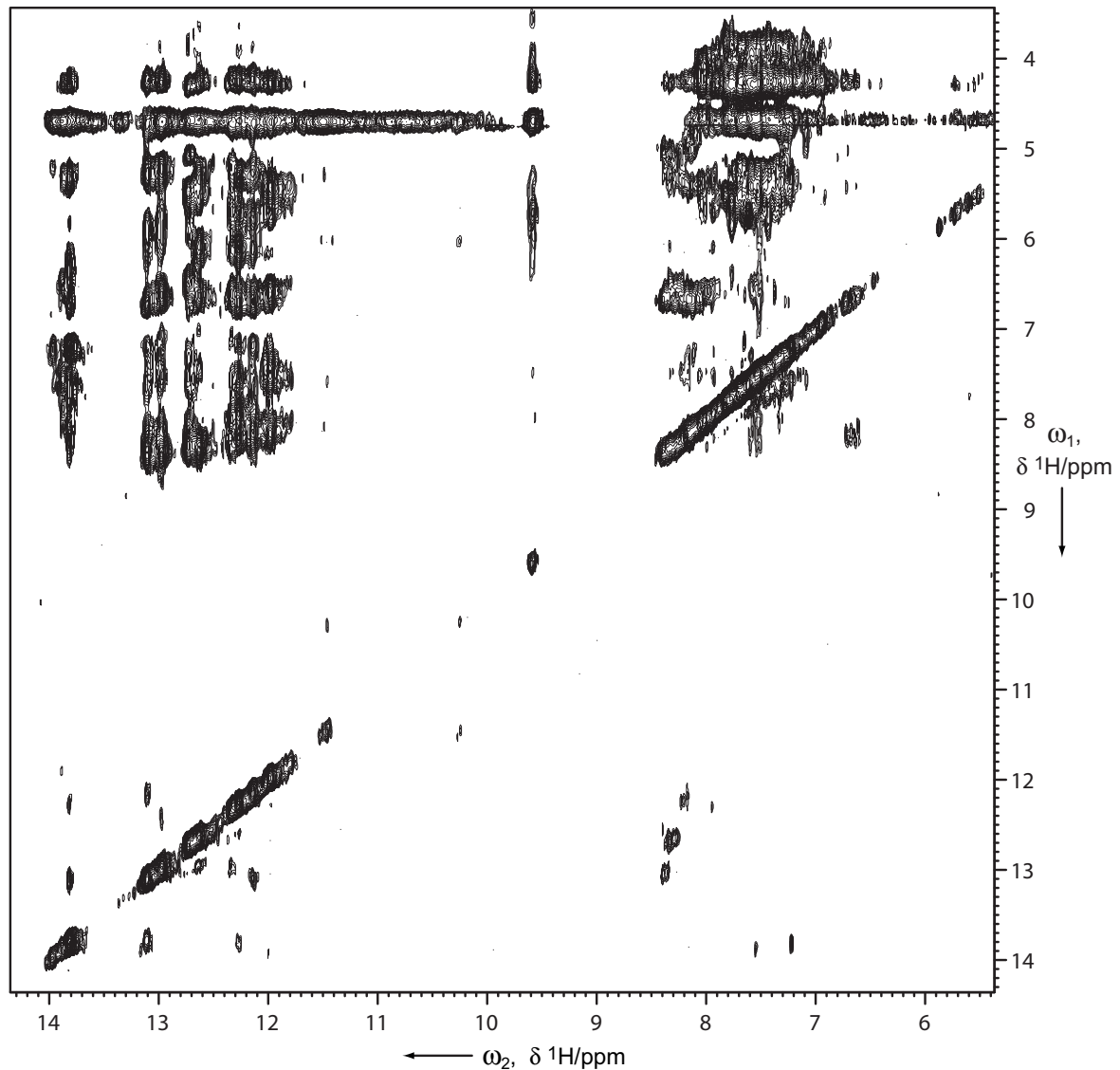


Abbildung 2.81: Ausschnitt aus dem 2D-J&R-NOESY-Spektrum von *u4u6a42chem-RNA* ($T=290\text{ K}$, $\tau_m=300\text{ ms}$, 600 MHz).

Für die NMR-Spektroskopie von *u4u6a42chem* wurden $250\ \mu\text{l}$ einer 1 mM -Lösung in Wasser unter Zusatz von $10\ \%$ D_2O verwendet. Der pH-Wert dieser Lösung lag bei 7.6 . Die Messungen der Jump & Return-Echo Spektren wurden bei 290 K vorgenommen.

Besonders auffällig bei dem J&R-Echo-Protonenspektrum des Iminobereichs der *u4u6a42chem-RNA* ist das große Integral über alle Iminoprotonen (Abb. 2.80 auf der vorherigen Seite). Die Summe der Signale beträgt 38 , wenn wie üblich die Signale der Gs aus der UUCG-Schleife auf zwei normiert werden. Legt man die vermutete Sekun-

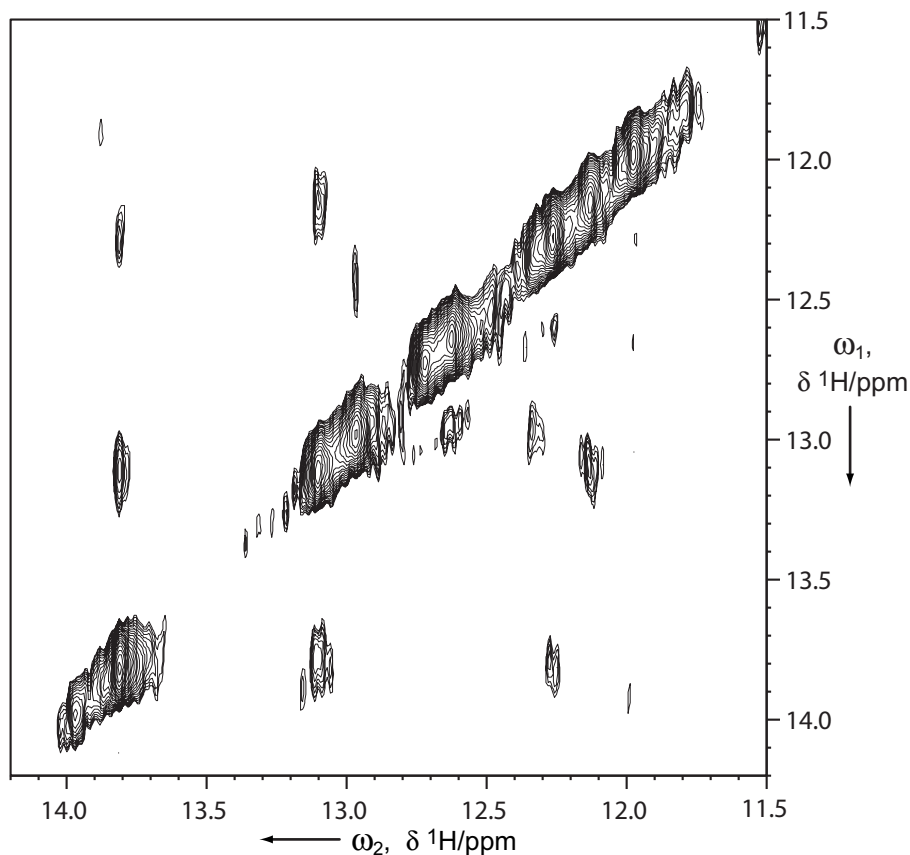


Abbildung 2.82: Iminoregion des 2D-J&R-NOESY-Spektrums von *u4u6a42chem-RNA* ($T=290 \text{ K}$, $\tau_m=300 \text{ ms}$, 600 MHz).

därstruktur der RNA zu Grunde, werden nur 19 Signale erwartet. D.h. die RNA zeigt mehrere Signalsätze, die eventuell von mehreren Konformationen der RNA stammen. Das denaturierende Gel dieser NMR-Probe zeigte zwei gleich intensive Banden von N- und N-1-RNAs, die das Vorliegen eines Gemisches von RNAs bestätigt.

Für die durchgeführte Synthese bzw. Aufreinigung bedeutet dies, daß die Verunreinigungen nicht erfolgreich abgetrennt werden konnten. Weiterhin sind die breiten Linien der Signale auffällig. Auch die zweidimensionalen J&R-Spektren zeichnen sich durch relativ breite Signale aus, die eventuell auf paramagnetische Verunreinigungen von der HPLC zurückzuführen sind.

Wie bei den anderen bisher gemessenen Spektren auch sind diverse Kreuzsignale im Iminobereich (Abb. 2.82) zu verzeichnen. Das spricht für das Vorliegen gefalteter Konformere, auch wenn diese als Gemisch vorliegen.

2.9 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden insgesamt vier verschiedene RNAs, die den Kern der Y-förmigen Wechselwirkung der spleißosomalen RNAs U4 und U6 abbilden, in präparativem Maßstab mit verschiedenen Methoden hergestellt und mit Hilfe der NMR-Spektroskopie charakterisiert. Drei RNA-Varianten wurden durch Transkription von einer Templat-DNA (u4u6a42, u4u6a44hh7 und u4u6a46phh2) und eine durch chemische Festphasensynthese (u4u6a42chem) hergestellt.

Auf dem Weg zur Herstellung dieser RNAs wurden verschiedene Konzepte zu Herstellung einer in der Länge homogenen RNA mit definierten 3'- und 5'-Ende verfolgt. Die Transkription von doppelsträngiger Templat-DNA, wie im Falle von u4u6a42 (Abschnitt 2.7.1 auf Seite 39), führte zu einer Mischung aus N und N+1-RNAs, deren Trennung mit gängigen Methoden wie der Gelelektrophorese oder HPLC nur schwer möglich ist. Diese Synthese lieferte die besten Ausbeute.

Versuche, eine homogene RNA durch Schneiden mit einem passenden HH-Ribozym am 3'-Ende herzustellen, führten wie an den Beispielen von u4u6a46hh1 bis u4u6a46hh4 (Abschnitte 2.7.3 auf Seite 54 und 2.7.4 auf Seite 64) gezeigt werden konnte, zu keiner in der Länge einheitlichen RNA.

Anhand der Verwendung von am 5'-Ende radioaktiv markierter RNA konnte nachgewiesen werden, dass die Inhomogenität nach dem Schneiden am 3'-Ende am 5'-Ende lokalisiert ist. Dies war nach den Literaturbeschreibungen nicht zu erwarten [169,170], da auch die Konstrukte mit nur einem G am Anfang der RNA am 5'-Ende inhomogen waren. Umso erstaunlicher war das Ergebnis des Schneidens von u4u6a46hh55_vs-RNA (Abschnitt 2.7.5 auf Seite 69) mit einem Ribozym am 3'-Ende. Hier wurde eine homogene RNA erhalten, obwohl auch diese RNA mit einem G beginnt. Offenbar spielt die Sekundärstruktur der RNA für die Entstehung der 5'-Inhomogenität eine wichtige Rolle bei der Transkription.

Im Falle von u4u6a46hh5_vs beginnt die gewünschte RNA-Sequenz erst 8 Basen nach dem führenden G. In den anderen Fällen war das führende G der RNA auch in die vermutete Sekundärstruktur der zu synthetisierenden RNA eingebunden.

Durch Verwendung des ϕ -Promotors im Falle von u4u6a46phh2 (Abschnitt 2.7.7 auf Seite 86) bzw. einer leicht anderen, trotzdem mit G beginnenden Sequenz für u4u6a44hh7

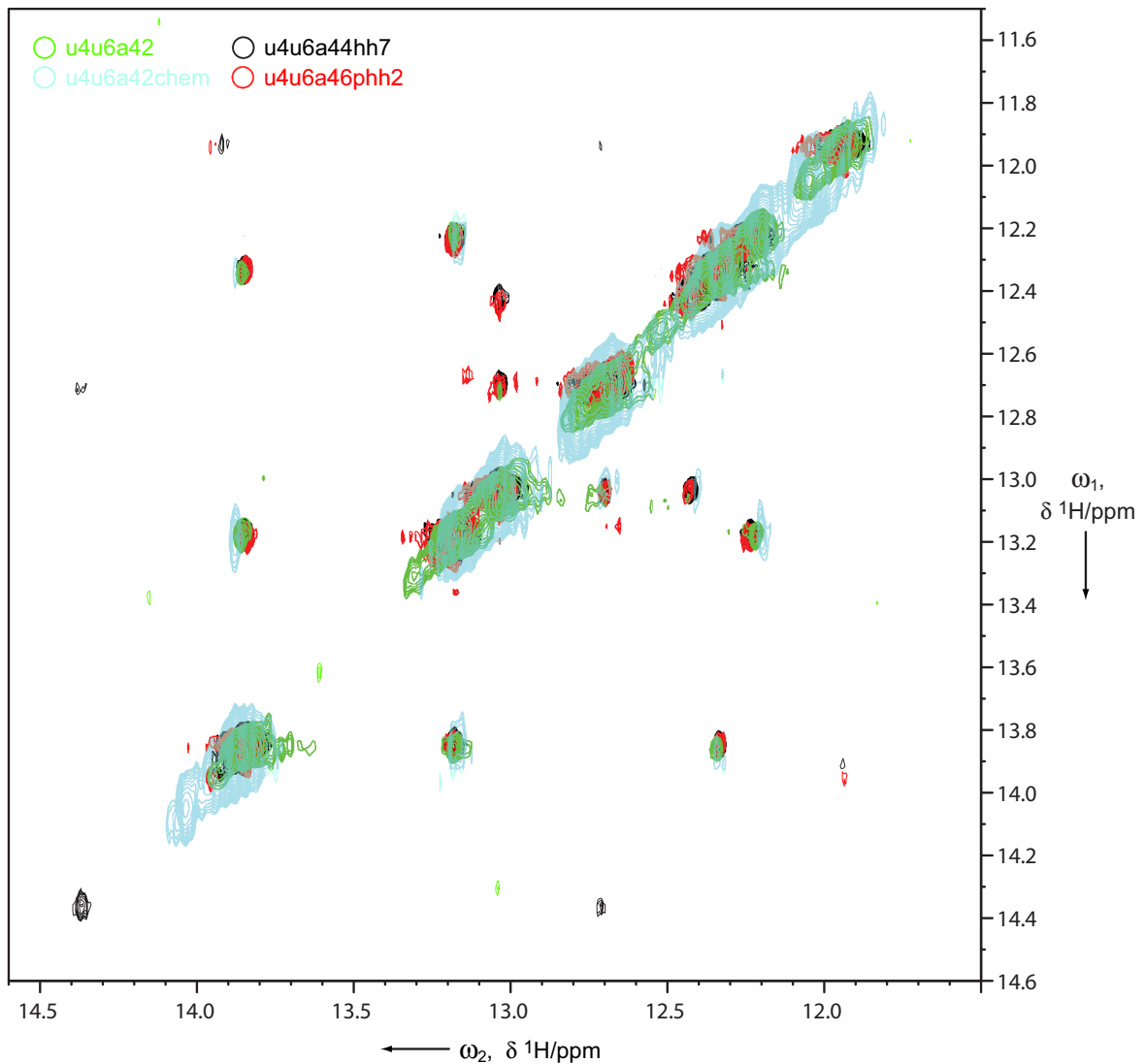


Abbildung 2.83: Überlagerung der Iminoregion der 2D-J&R-NOESY-Spektren von u4u6a44hh7 (schwarz), u4u6a42 (grün), u4u6a42chem (blau) und u4u6a46phh2 (rot) ($T=290$ K, $\tau_m=300$ ms, 600 MHz). Für alle RNAs erkennt man deutlich die gleichen Muster für die Kreuzsignale.

(Abschnitt 2.7.6 auf Seite 77) konnten die Probleme bezüglich der 5'-Inhomogenität gelöst werden und so in der Länge einheitliche RNAs durch Schneiden am 3'-Ende mit den passenden Ribozymen synthetisiert werden.

Wie die Integrale der Iminoprotonen aus den eindimensionalen Jump & Return-Protonenspektren zeigen, liefern nicht alle RNAs einen einzigen Signalsatz. Im Falle der chemisch synthetisierten RNA (Abschnitt 2.8 auf Seite 95) sprechen die NMR-Spektren

für das Vorliegen von zwei Konformationen. u4u6a42 und u4u6a46phh2 zeigen in dieser Hinsicht die eindeutigsten Hinweise auf das Vorliegen nur einer einzigen Konformation. u4u6a44hh7 scheint in einer nicht eindeutig definierbaren Mischung vorzuliegen.

Die zweidimensionalen J&R-Spektren zeigen für den Bereich der basengepaarten Iminoprotonen eine gute Übereinstimmung für alle vier synthetisierten RNAs (Abb. 2.83 auf der vorherigen Seite). Sie deuten darauf hin, daß die vier Spezies höchstwahrscheinlich das Kerngerüst der U4/U6-A-RNA enthalten und somit auch eine ähnliche Sekundärstruktur aufweisen.

Aufgrund der vorliegenden Daten kann u4u6a46phh2-RNA als Konstrukt für die Synthese von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -gelabelter RNA dienen, da die Schneidreaktion und die daraus resultierende RNA definiert ist und die vom Integral her besten Spektren liefert.

3 Strukturaufklärung von Minigramicidin

3.1 Einführung

Kanäle, die die Zellmembran durchspannen, spielen eine zentrale Rolle in der Kommunikation und Regulation in Organismen. Transmembranständige Proteine bilden dabei eine Vielfalt von verschiedenen Strukturen aus, die den jeweiligen Transportaufgaben optimal angepaßt sind. Der Transport der neutralen oder geladenen Teilchen erfolgt dabei innerhalb der Zelle oder zwischen verschiedenen Zellen, wie es z.B. bei der Nervenleitung der Fall ist.

Ionenkanäle sind die Grundlage der Nervenleitung (Na^+ , K^+) und Signalübertragung (Ca^{2+}) und auch am Sehvorgang sowie in der Muskelkontraktion und im physiologischen Stoffwechsel beteiligt. Inhibitoren der Kanalfunktion sind oft sehr starke Giftstoffe [223].

Die Verleihung des Nobelpreises für Chemie 2003 an Roderick MacKinnon und Peter Agre zeigt [2, 3], daß die Erforschung der Kanäle ein aktuelles Forschungsgebiet ist. Der Nobelpreis wurde für die Entdeckung von Kanälen in Zellmembranen vergeben. Im einzelnen wurde die Entdeckung von Wasserkanälen, sogenannter Aquaporine und die Durchführung mechanistischer und struktureller Untersuchungen an Ionenkanälen, insbesondere des K^+ -Kanals geehrt. Von den Aquaporinen sind bisher mehr als 150 verschiedene Arten bekannt, die die unterschiedlichsten kleinen Neutralteilchen wie Wasser [224] oder Glycerin [225] transportieren.

Die Strukturaufklärung des ionenselektiven Kaliumkanals KcsA aus dem Organismus *Streptomyces lividans* erfolgte 1998 durch die Gruppe um Roderick MacKinnon [226, 227]. Der KcsA-Kanal ist ein C_4 -symmetrisches Homotetramer, wobei die Untereinheit aus zwei Transmembranhelices, einer dritten kurzen α -Helix sowie einer Schleifen-Region besteht. Diese Region ist unter allen K^+ -Kanälen mit der Sequenz Thr-Xxx-Thr-Thr-Xxx-Gly-Tyr-Gly hochkonserviert und stellt den Selektivitätsfilter für die K^+ -Ionen dar. Durch die Assoziation der Untereinheiten entsteht eine kegelförmige Struktur, die den Selektivitätsfilter an der Außenseite der Membran plaziert. Im Zentrum befindet sich ein ca. 10 Å großer Hohlraum, der einem solvatisierten K^+ -Ion Platz bietet. Der Selektivitätsfilter bildet über die Sauerstoffatome der Rückgratcarbonyle der Aminosäuren Thr75 bis Gly79 und die OH-Seitengruppen von Thr79 die Bindungsstelle für das K^+ -Ion.

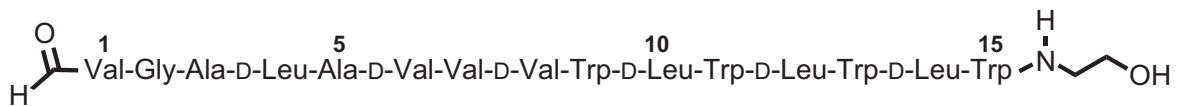
Unter den 20 proteinogenen Aminosäuren nehmen die Glycine durch die fehlende Seitenkette eine besondere Stellung ein. Sie können sowohl als L- als auch als D-Aminosäure aufgefaßt werden. Dementsprechend kann man die Glycine im Selektivitätsfilter auch als D-Aminosäuren interpretieren, so daß man eine L-D-Abfolge findet [228].

Eine L-D-Abfolge der Konfiguration der Aminosäuren findet man auch in der hydrophoben Peptidsequenz des Gramicidin A (gA). Die Komplexierung der einwertigen Ionen in gA ist prinzipiell vergleichbar mit derjenigen in KcsA-Kanälen [229]. Somit kann dieser relativ einfach aufgebaute und leicht zugängliche Porenbildner als Modellsystem zur Untersuchung der Mechanismen zur Ionenkanalbildung und der Ionenselektivität dienen. Zudem ist es relativ einfach, durch synthetische Modifikationen die Kanaleigenschaften zu variieren und so zu einem besseren Verständnis der Ionenkanäle zu gelangen.

3.2 Gramicidin A (gA)

3.2.1 Allgemeines

Im Jahre 1939 isolierte René Dubos vom Rockefeller Institute for Medical Research aus Bodenproben einen sporenbildenden Bazillus mit lytischen Eigenschaften gegen grampositive Bakterien. Ein Jahr später wurde die aktive Komponente des Bazillus, das Gramicidin, isoliert. 1941 konnte schließlich der Organismus *bacillus brevis* identifiziert werden [230]. Sarges und Witkop konnten schließlich die Aminosäuresequenz mit der charakteristischen Abfolge von L- und D-Aminosäuren entschlüsseln [231].



Gramicidin A (gA)

Abbildung 3.1: Aminosäuresequenz von Gramicidin A. Man findet eine L,D-Reihenfolge der Aminosäuren, die in allen Gramicidinen enthalten wird. Der N-Terminus wird durch ein Formamid, der C-Terminus durch einen Ethanolamin-Rest gebildet.

Gramicidin ist eine Mischung aus den Gramicidinen A, B und C, die sich in der Zusammensetzung der Aminosäure an der Position 11 unterscheiden. Daneben enthält jede Art noch an Position 1 80% Valin bzw. 20 % Isoleucin [232]. Für die meisten Untersuchungen wurde Gramicidin A (gA) verwendet (Abb. 3.1 auf der vorherigen Seite).

Die biologische Funktion von gA ist noch nicht vollständig erforscht, man findet z.B. eine Inhibition der RNA-Synthese bei Bakterien durch Wechselwirkung mit der σ -Untereinheit der RNA-Polymerase [233, 234]. Außerdem sind HIV-inhibitorische Eigenschaften [235] bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit interessiert die Wirkung von gA als Ionenkanal, der die lytische Wirkung auf gram-positive Bakterien hervorruft. Die Leitfähigkeit für einwertige Ionen nimmt in der Reihe H^+ , Rb^+ , Cs^+ , NH_4^+ , K^+ , Na^+ ab und bildet eine Eisenmann I-Reihe [236].

Gramicidin A wurde mit vielen Methoden untersucht um den Prozeß der Kanalbildung und die Ionen-Selektivität zu verstehen [229, 237–242]. Im folgenden wird eine Übersicht über die gefundenen Erkenntnisse bezüglich der Strukturen von gA in den verschiedensten Umgebungen gegeben.

Basierend auf der L,D-Abfolge der Aminosäuren (Glycin wird dabei als D-Aminosäure gezählt) als der repetitiven Einheit kann man verschiedene Sekundärstrukturen für diese Art der Peptide vorhersagen. Als mögliche Strukturen wurden LD-Bänder und LD-Helices vorgeschlagen [243]. 1971 wurde von Urry die sogenannte π -Helix vorgeschlagen [244]. Sie entspricht einem parallelem aufgerolltem β -Faltblatt. Charakteristisch für diese Art von Helix ist das Muster von Wasserstoffbrückenbindungen, welche die Carbonylgruppen innerhalb der Helix fixieren und so einen Kanal bilden und die Seitenketten nach außen orientieren. Für einfache Modellverbindungen mit poly-D,L-Einheiten wurden verschiedene Arten von rechtsgängigen β -Helices gefunden [245–247]. Urry hat basierend auf theoretischen Überlegungen für die ionenkanalaktive Form von gA ein Kopf-an-Kopf assoziiertes, linksgängiges Dimer vorgeschlagen [248]. Die verschiedenen Konformationen von Gramicidin A in Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen (Lösemittel, Membranumgebung) werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

3.2.2 gA in organischen Lösemitteln

CD-Spektren von gA in verschiedenen organischen Lösemitteln zeigen sehr unterschiedlich aggregierte Spezies von gA-Konformeren [249–251], darunter links- und rechtsgängige parallele und antiparallele Dimerhelices. Zur Unterscheidung wurde eine Nomenklatur eingeführt, hierbei bezeichnet z.B. $\uparrow\downarrow\pi\pi_{LD}^{5.6}$ eine antiparallele π -Doppelhelix mit 5.6 Resten pro Windung. $\overrightarrow{\pi}\overleftarrow{\pi}_{LD}^{6.3}$ hingegen ein Kopf-an-Kopf assoziiertes Dimer mit 6.3 Resten pro Windung.

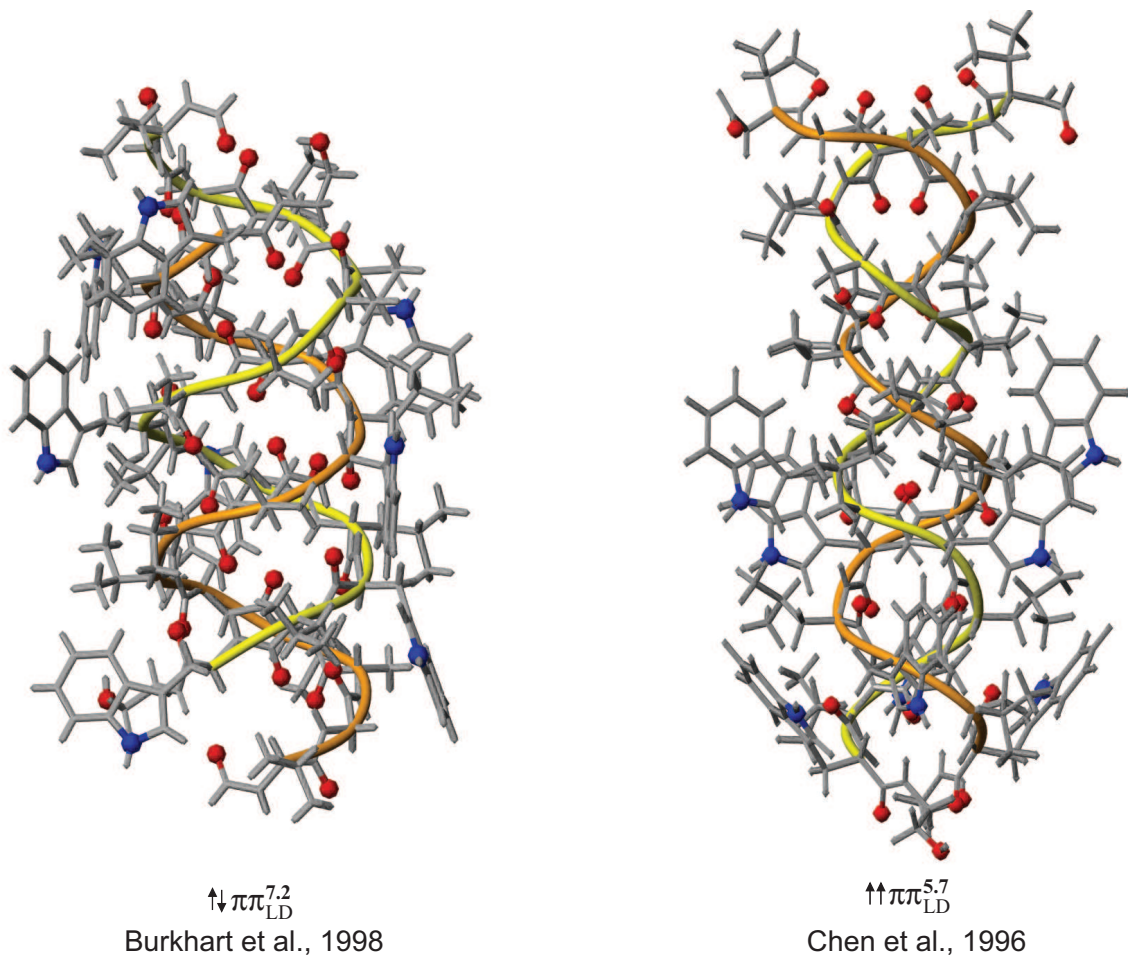


Abbildung 3.2: Zwei Strukturen von gA in organischen Lösemitteln. Die linke Struktur wurde aus Kristallen von Gramicidin D aus methanolischer Cäsiumchloridlösung [252] und die rechte Struktur aus NMR-Daten von gA in methanolischer Calciumchloridlösung bestimmt [253]. Das gelbe bzw. orange Band zeigt das Rückgrat der einzelnen Helices an. Mit rot sind die Sauerstoffatome und in blau die Stickstoffatome der Tryptophanseitenketten markiert.

Die Konformere sind zum Teil so stabil, daß selbst in membranähnlichen Umgebungen die Konformation, die in organischen Lösemitteln zur Probenvorbereitung eingenommen wurden, konserviert werden konnte [254].

Für die Strukturermittlung ist es sehr wichtig, die richtige Kombination aus Lösemittel und Kationen zu finden, um nur eine Konformation strukturell bestimmen zu können. Abbildung 3.2 auf der vorherigen Seite zeigt zwei der in organischen Lösemitteln bestimmten Strukturen. Als Methoden zur Strukturaufklärung haben sich hierbei die NMR-Spektroskopie und die Röntgenbeugung an aus organischen Lösemitteln gewonnenen Kristallen bewährt.

Eine Vielzahl von NMR-Strukturen von gA in verschiedenen organischen Lösemitteln wurde von der Arbeitsgruppe um Arseniev publiziert [255–258].

Neben den unterschiedlichen Kombinationen von ineinander verwundenen Helices in paralleler und antiparalleler Orientierung [253, 259–261] tritt gA in DMSO unstrukturiert auf [262–265]. Zugabe von einwertigen Kationen zu Gramacidin in organischen Lösemitteln, insbesondere von Cäsium führt zu einer Aufweitung und Einlagerung der Kationen in das Innere der Helix [252, 256, 258, 266].

In der folgenden Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse der Strukturermittlungen in organischen Lösemitteln zusammengefaßt.

Lösemittel	Orientierung	Symbol	Literatur
MeOH/CDCl ₃ , Cs ⁺ /MeOH	rechtshändig	$\uparrow\downarrow \pi\pi_{LD}^{7.2}$	Burkhart et al., 1998 [252, 256, 258]
CsCl/MeOH-Kristall	linkshändig	$\uparrow\downarrow \pi\pi_{LD}^{6.4}$	Wallace et al., 1988 [267]
EtOH/Benzol-Kristall, Dioxan	linkshändig	$\uparrow\downarrow \pi\pi_{LD}^{5.6}$	Arseniev et al., 1984 [255, 259]
Ethanol	links-/rechtsh.	$\uparrow\uparrow \pi\pi_{LD}^{5.6}$	Bystrov et al., 1988 [257]
Dioxan, CaCl ₂ /MeOH	rechtshändig	$\uparrow\uparrow \pi\pi_{LD}^{5.7}$	Chen et al., 1996 [253, 259]
DMSO/Aceton	ungeordnet	-	Roux et al., 1990 [265]

Tabelle 3.1: Übersicht über die in organischen Lösemitteln gefundenen Strukturen von gA.

3.2.3 gA in Micellen und Membranen

Entscheidend für das Verständnis der Funktion von gA als Ionenkanal ist die Struktur in membranähnlicher Umgebung. Die CD-Messungen in Phospholipidvesikeln und SDS-Micellen ergaben dabei Hinweise auf eine rechtsgängige Spezies zweier Gramicidin A Moleküle, die Kopf-an-Kopf zueinander orientiert sind [268–270]. Im Gegensatz zu gA in organischen Lösemitteln ändert sich bei Zugabe von Kationen ihre Konformation nicht wesentlich [271].

Membranmimetikum	Orientierung	Symbol	Literatur
SDS-Micellen	rechtshändig	$\overrightarrow{\pi\pi} \overset{6.3}{LD}$	Arseniev et al., 1985 [272, 273]
DMPC-Doppelschicht	rechtshändig	$\overrightarrow{\pi\pi} \overset{6.5}{LD}$	Ketchum et al., 1997 [274]

Tabelle 3.2: Übersicht über die in membranähnlichen Umgebungen gefundenen Strukturen von gA.

NMR-Messungen an gA in SDS-Micellen [272, 273, 275, 276] und in Phospholipiddoppelschichten bestätigten die Vermutungen (Tabelle 3.2, Abb. 3.3 auf der nächsten Seite) [274, 277–280]. Die beiden Strukturen unterscheiden sich nur wenig in der Anzahl der Aminosäuren pro Windung (6.5 zu 6.3). Beide bilden ein Kopf-an-Kopf assoziiertes, rechtsgängiges Dimer aus zwei gA-Einheiten. Der Durchmesser beträgt ca. 4 Å, ausreichend, um die Durchleitung von Cäsiumkationen zu ermöglichen. Im Innern des Kanals bilden die Sauerstoffe der Rückgratcarbonylgruppen mögliche Koordinationspartner für Kationen. Auch die anderen Gramicidine B und C nehmen in SDS-Micellen die gleiche Konformation wie gA ein [281].

Ob diese gefundenen Strukturen wirklich den aktiven Ionenkanal beschreiben, wurde kontrovers diskutiert, da auch eine aus organischen Lösemitteln kristallisierte Struktur potentiell die gleichen Abmessungen wie die Strukturen in membranähnlichen Umgebung aufwies [252, 282–287]. Weitere Festkörper-NMR spektroskopische Untersuchungen konnten jedoch die Annahme der ionenkanalaktiven Konformation für das Kopf-an-Kopf assoziierte Dimer bestätigen [288–290].

3.2.4 Modifizierte gA-Ionenkanäle

Zur weiteren Untersuchung und Steuerung der Ionenkanaleigenschaften wurde das Gramicidin auf vielfältige Weise modifiziert [239, 291, 292]. Insbesondere die Verlän-

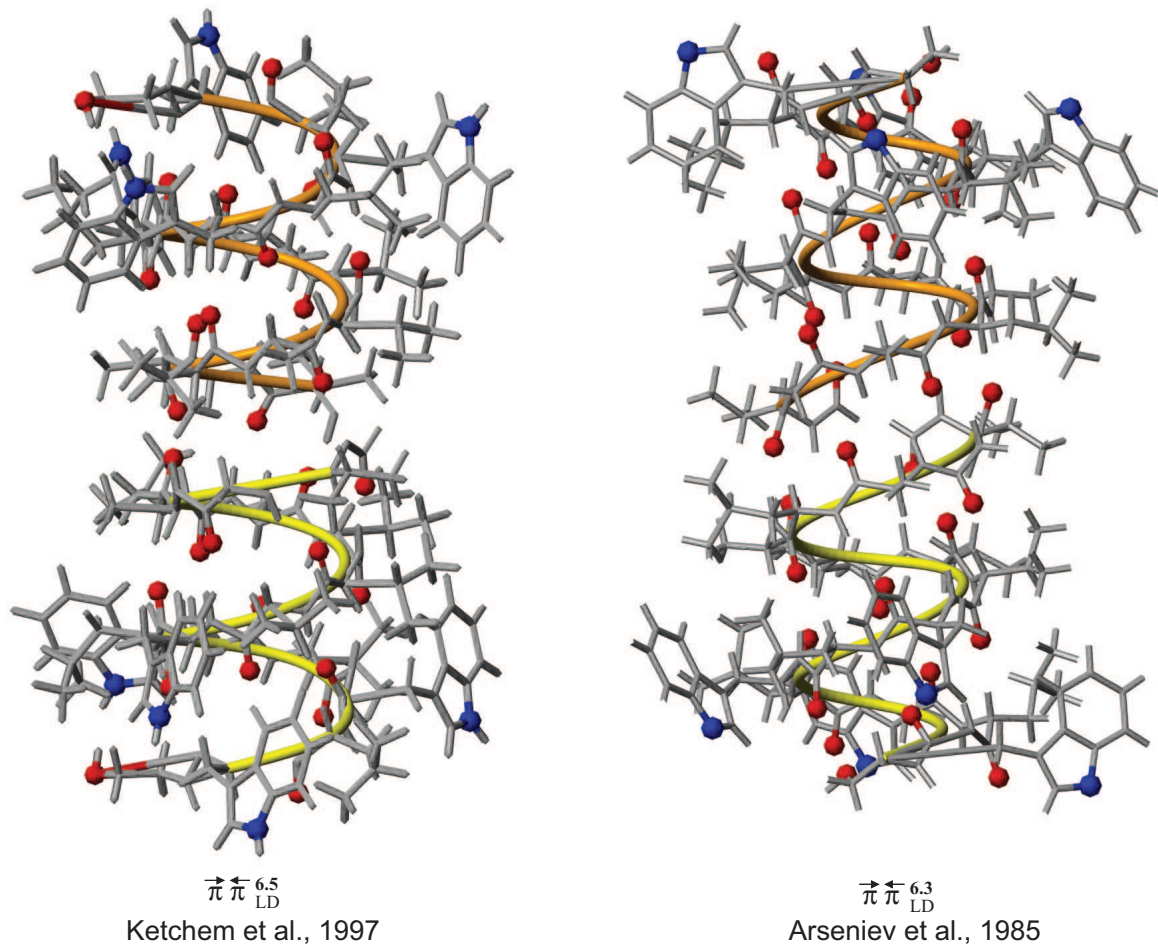


Abbildung 3.3: Die Strukturen von gA in membranähnlicher Umgebung. Die rechte Struktur wurde mit Festkörper-NMR in DMPC-Doppelschichten [277] und die linke Struktur in SDS-Micellen bestimmt [272]. Die beiden Strukturen unterscheiden sich nur wenig in der Anzahl der Aminosäuren pro Windung (6.5 zu 6.3). Das gelbe bzw. orange Band zeigt das Rückgrat der einzelnen Helices an. Mit rot sind die Sauerstoffatome und in blau die Stickstoffatome der Tryptophanseitenketten markiert.

gerung der Offenzeiten des Kanals durch die Dimerisierung von gA mit verschiedenen Linkern wurde getestet [293–296].

Die Verwendung von Weinsäure als Linker zwischen zwei gA-Einheiten lieferte Einblicke in die nötige Orientierung der gA-Peptidketten, um einen funktionalen Ionenkanal aufzubauen [297,298]. Dabei wurde die Kopf-an-Kopf Anordnung als Voraussetzung für einen funktionalen Ionenkanal wie sie in den Strukturen von gA in membranähnlicher Umgebung gefunden wurden, bestätigt.

Von mit Bernsteinsäure gelinktem Gramicidin A konnte mit NMR-Methoden die Struktur in SDS-Micellen bestimmt werden [299]. Man findet fast die gleiche Struktur wie für normales gA in SDS-Micellen, allerdings weist das gelinkte Dimer eine leichte Krümmung, verursacht durch die Micelle auf.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurden schaltbare Ionenkanäle auf Basis von Gramicidin A entworfen [300–302].

3.3 Minigramicidin

Für den Entwurf von künstlichen Ionenkanälen ist eine Korrelation der Struktur mit der Funktion nötig, um die Eigenschaften zielgerichtet zu verändern. Hierbei sind als mögliche Ziele die Steuerung der Ionenselektivität, der Membranadaptation (Insertion in Abhängigkeit von der Dicke oder Art der Membran) und die Regulierbarkeit der Aktivität in Abhängigkeit von äußeren Ereignissen zu nennen.

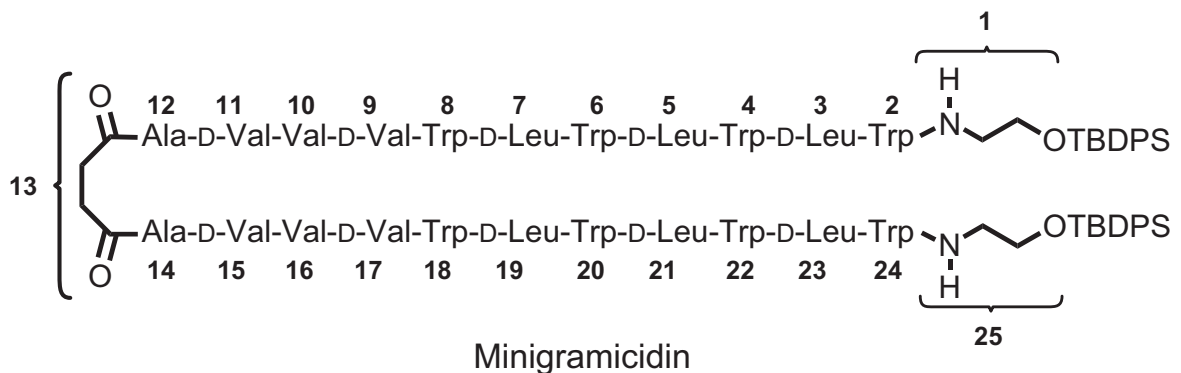


Abbildung 3.4: Aminosäuresequenz von Minigramicidin. Das Molekül besteht aus zwei um vier Aminosäuren verkürzten gA-Einheiten, deren N-Termini über einen Bernsteinsäurelinker (13) miteinander verbunden sind. Die gezeigte Numerierung entspricht dabei der in der Strukturermittlung verwendeten. Für die Strukturrechnung wurde die Sequenz wie folgt benannt: ETA-TRP-DLE-TRP-DLE-TRP-DLE-TRP-DVA-VAL-DVA-ALA-SIN (ETA, Ethanolamin, DLE D-Leucin, DVA D-Valin, SUC Succinat). Das Molekül ist C_2 -symmetrisch.

Modifizierte Ionenkanäle auf Basis von Gramicidin wurden aufgrund des einfachen Aufbaus von der Arbeitsgruppe von Prof. Koert an der Humboldt-Universität zu Berlin bzw. Philipps-Universität Marburg als Basis für das Design von künstlichen Ionenkanälen ausgewählt. Die Arbeitsgruppe hat dabei verschiedene Ansätze verfolgt:

Beeinflussung der Ionenselektivität durch Einbau von THF-Bausteinen [303] sowie die Anpassung an verschiedene Membrandicken durch Herstellung von gelinkten gA-Dimeren [304–308].

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Koert wurde in dieser Arbeit die Struktur des sogenannten Minigramicidins (Abb. 3.4 auf der vorherigen Seite) in organischen Lösemitteln mit und ohne Zusatz von Cäsiumchlorid untersucht.

3.3.1 Synthese

Das untersuchte Minigramicidin wurde von Dr. Hans-Dieter Arndt im Arbeitskreis von Prof. Koert an der Humboldt-Universität zu Berlin nach folgendem Schema synthetisiert (Abb. 3.5 auf der nächsten Seite) [304–308].

Das Minigramicidin wurde anschließend mittels HPLC gereinigt und mit Massenspektrometrie charakterisiert [308].

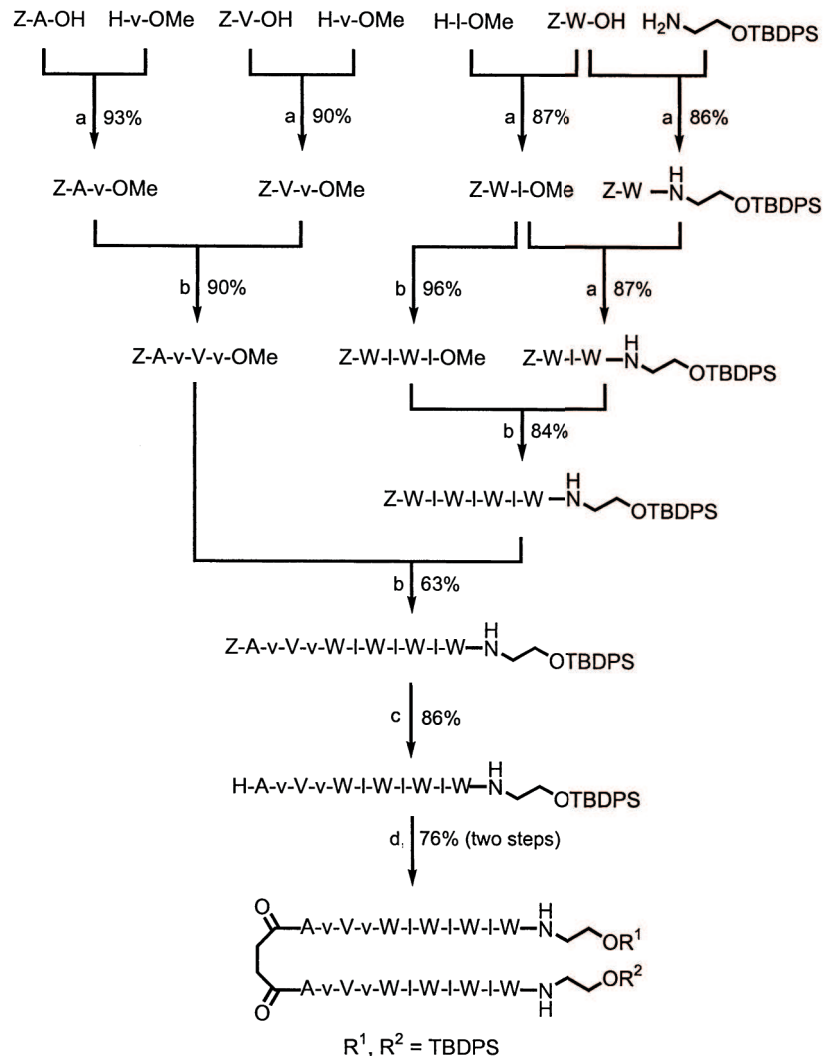


Abbildung 3.5: Syntheschema zur Herstellung von Minigramicidin [306]. Die Kleinbuchstaben v und l bezeichnen D-Valin bzw. D-Leucin. a) HOBt (1.5 eq.), NEt_3 (1.5 eq.), EDC (1.25 eq.), CH_2Cl_2 ; b) Entschützung des Methylesters: 2.5 eq. LiOH, THF/ H_2O 3:1, 0 °C; Abspaltung der Z-Schutzgruppe: 0.02 M, 15 wt% Pd/C (5 %), H_2 (1 bar); Kopplung: HOBt (2.5 eq.), DIEA (2.5 eq.), HBTU (1.5 eq.), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ 10:1, 0-20 °C. c) 25 wt% Pd/C (5%), H_2 (1 bar), MeOH/DMF 10:1, 40 °C; d) (i) Bernsteinsäureanhydrid (10 eq.), Pyridin, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ 3:1, (ii) Entschütztes Monomer (1 eq.), HOAt (4 eq.), DIEA (3 eq.), HATU (2.5 eq.), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ 3:1, 0-20 °C. Modifiziert aus [306].

3.3.2 Funktionale Eigenschaften

Die Ionenleitfähigkeit von Minigramicidin wurde mittels der Patch-Clamp-Technik [309] ermittelt. Es wurde in unterschiedlichen Lipiddoppelschichten aus den C-9 Z-ungesättigten Phospholipiden DOPC (18:1), DPPC (16:1) und DMPC (14:1) unter Zusatz von 10 % Cholesterin gemessen, deren Membrandicken sich auf 29, 26 bzw. 24 Å abschätzen lassen [310, 311]. In Klammern ist die Länge und die Anzahl der Doppelbindungen der Fettsäure angegeben. Dabei wurde eine Abhängigkeit der Anzahl der Einzelkanalereignisse und ihrer Dauer in Abhängigkeit von der Dicke der Lipiddoppelschicht festgestellt (Abb. 3.6). Mit abnehmender Dicke der Doppelschicht bleibt der Kanal länger offen. Da Minigramicidin kürzer als gA ist, liegt hier ein „hydrophobic match“ [310, 312–319] für Minigramicidin in Verbindung mit DMPC (14:1)-Doppelschichten vor.

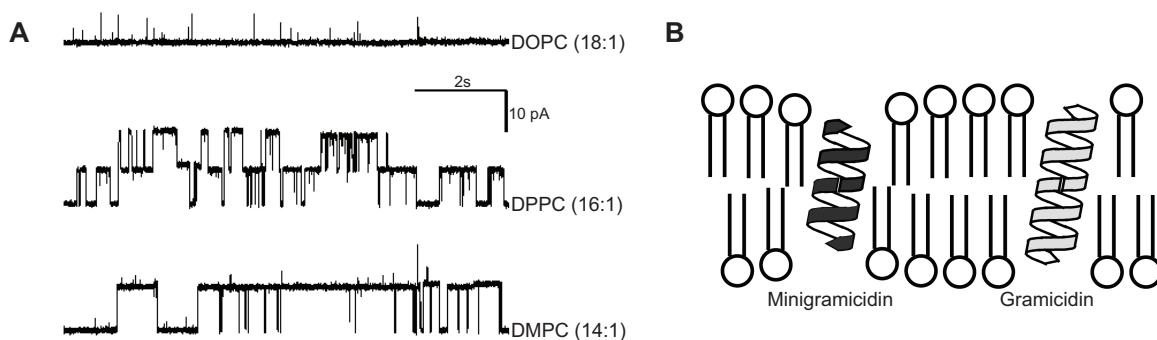


Abbildung 3.6: **A** Abhängigkeit der Einzelkanalereignisse von Minigramicidin in Abhängigkeit von der Art (Dicke) der Phospholipiddoppelschicht. In Klammern wird die Anzahl der C-Atome und der Doppelbindungen in der Fettsäure angegeben. **B** Modell für den „hydrophobic match“ von Minigramicidin bzw. Gramicidin **A:** In dicken Schichten ist Minigramicidin zu kurz, der Kanal bleibt nur kurz offen. Übernommen aus [304]

3.3.3 CD-Spektren

CD-Messungen von Minigramicidin in membranähnlicher Umgebung zeigen ähnliche Kurven wie für gA (Abb. 3.7 auf der nächsten Seite, **A**). In organischen Lösemitteln findet man bei Zusatz von einfach geladenen Cäsiumkationen zur Lösung eine große Änderung in der Kurve. Man erhält statt zweier Minima mit negativer Elliptizität (Abb. 3.7 auf der nächsten Seite, **B**, (C,D)) eine Kurve mit nur einem Maximum mit positiver Elliptizität (Abb. 3.7 auf der nächsten Seite, **B**, (A,B)). Bei Zusatz von

Cäsiumkationen findet also eine erhebliche konformationelle Umwandlung der Struktur von Minigramicidin statt.

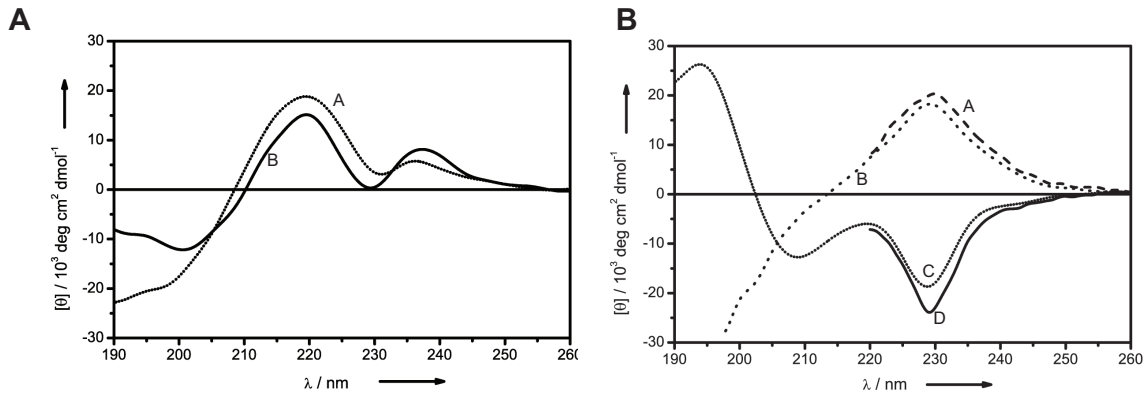


Abbildung 3.7: **A** CD-Spektren von gA (A) und Minigramicidin (B) in DMPC-Vesikeln [319]. **B** CD-Spektren von Minigramicidin in verschiedenen organischen Lösemitteln: $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_3/\text{MeOH}$ (1:1, v/v), gesättigt mit CsCl (A); MeOH mit 50 mM CsCl (B); Acetonitril (C) und $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1, v/v) (D). Übernommen aus [307]

3.3.4 Aufgabenstellung

Basierend auf der von Dr. Hans-Dieter Arndt vom Arbeitskreis von Prof. Koert geleiteten Vorarbeiten sollte die Struktur von Minigramicidin in organischen Lösemitteln mit und ohne Zusatz von Cäsiumkationen aufgeklärt werden. Hierzu wurden in Berlin NMR-Spektren von Minigramicidin in Benzol/Aceton (10:1, v/v) ohne Metallionen und in Chloroform/Methanol (3:1, v/v) mit Zusatz von Cäsiumkationen gemessen.

In den folgenden Abschnitten werden die Zuordnung der Signale und die anschließenden Strukturrechnungen der beiden Spezies beschrieben.

3.4 NMR-spektroskopische Untersuchung von Minigramicidin in Benzol- d_6 /Aceton- d_6 (10:1, v/v)

3.4.1 NMR-Spektroskopie

Die ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren wurden an einer ca. 4 mM Lösung von Minigramicidin in dem Lösemittelgemisch Benzol- d_6 /Aceton- d_6 im Verhältnis 10:1, (v/v) bei einer Temperatur von 300 K durchgeführt. Dieses Gemisch hatte in den Vorversuchen die am besten aufgelösten Spektren gezeigt.

An einem Bruker AMX600 Spektrometer an der Humboldt-Universität zu Berlin wurden folgende Spektren aufgenommen: DQF-COSY [320], TOCSY- [321] mit 100 ms Mischzeit und NOESY-Spektren [322] mit 40, 80 und 150 ms Mischzeit. Die Aufnahme erfolgte mit der States-TPPI-Methode [323, 324] zur phasenempfindlichen Detektion. Die chemischen Verschiebungen wurden relativ zu dem Benzolsignal bei 7.15 ppm gemessen. Die Spektren wurden mit dem Programm XWINNMR, Version 3.1 der Firma Bruker (Rheinstetten) unter Verwendung von Exponential- und quadratischen Sinus-Funktionen als Window-Funktionen in der indirekten Dimension prozessiert und basislinienkorrigiert.

3.4.2 Zuordnung der ^1H -chemischen Verschiebung

Die ^1H -chemischen Verschiebungen der Aminosäuren und Reste in Minigramicidin wurden anhand der DQF-COSY- und TOCSY-Spektren nach etablierten Verfahren [325, 326] mit dem Programm Felix, Version 2000 (Accelrys Incl., San Diego, CA) ermittelt. Es konnten mit einem reduzierten Signalsatz 12 H_α - H^N -Kreuzsignale die für ein symmetrisches Minigramicidin erwartete halbierte Anzahl von Signalen im DQF-COSY-Spektrum zugeordnet werden (Abb. 3.8 auf der nächsten Seite). Auch für die anderen Resonanzen wurde ein halbierter Signalsatz für Minigramicidin gefunden (11 Aminosäuren, Ethanolaminterminus, 1 x TBDPS und zwei Protonen für den Bernsteinsäurelinker).

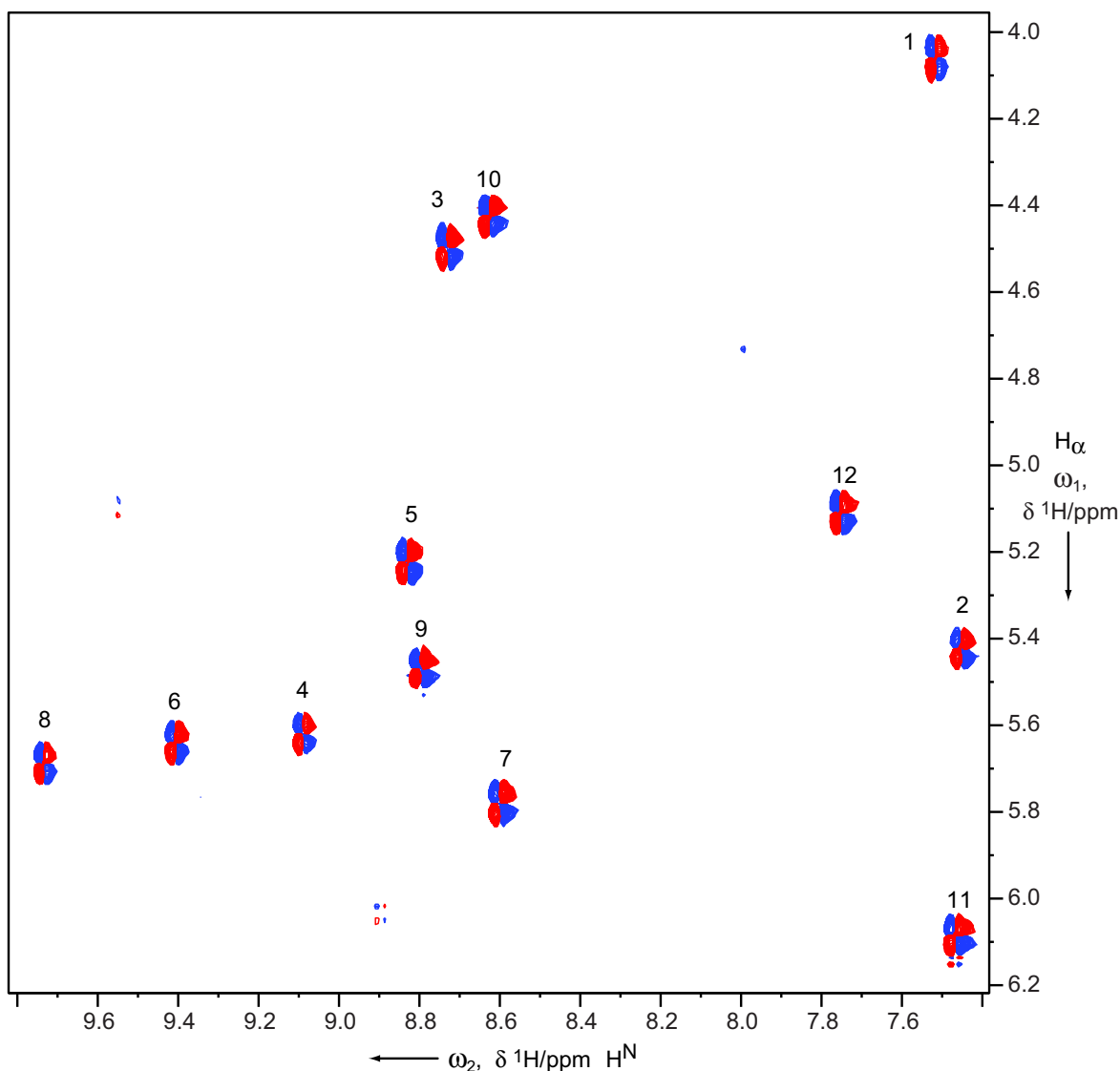


Abbildung 3.8: H_α , H^N -Bereich aus dem DQF-COSY-Spektrum von Minigramicidin in Benzol- d_6 /Aceton- d_6 (10:1, v/v). Es konnten 12 Kreuzsignale eindeutig zugeordnet werden. Dies entspricht der erwarteten Anzahl für ein symmetrisches Minigramicidin, welchen nur einen halbierten Signalsatz zeigen sollte.

Mit Hilfe der NOESY-Spektren (Abb. 3.9 auf der nächsten Seite) konnten die Verknüpfung der Spinsysteme über sequentielle Zuordnungen der H_α - $H^N(i,i-1)$ -Kreuzsignale bestimmt werden. Innerhalb der Spinsysteme war die Zuordnung der Seitenketten der Tryptophane aufgrund von Überlagerungen mit anderen Trp-Resonanzen und den Signalen der TBDPS-Schutzgruppen nicht immer eindeutig möglich. Die TBDPS-

Schutzgruppen konnten aufgrund der starken Überlagerung im Aromatenbereich nicht zugeordnet werden.

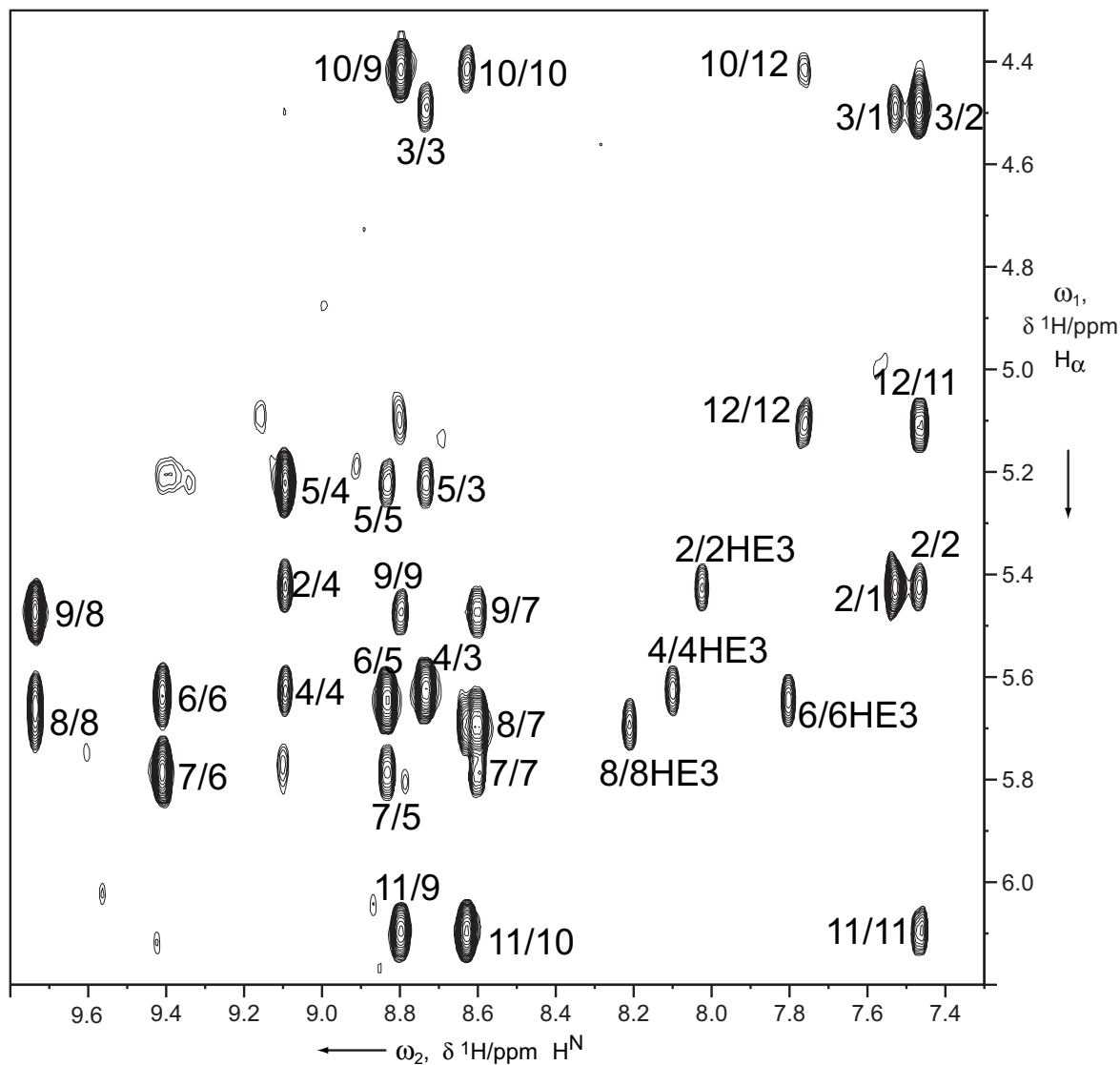


Abbildung 3.9: H_α , H^N -Bereich aus dem NOESY-Spektrum von Minigramicidin in Benzol- d_6 /Aceton- d_6 (10:1, v/v). Die H_α - H^N ($i, i-1$) und H_α - H^N ($i, i\pm 2$)-Kreuzsignale und einige intra-residuale Kreuzsignale zu aromatischen Tryptophanresonanzen sind gezeigt. Die erste Zahl entspricht der H_α -Resonanz in ω_1 , die zweite der H^N -Resonanz in ω_2 .

Die Zuordnung von Minigramicidin in Benzol- d_6 /Aceton- d_6 (10:1, v/v) ist in Tabelle 3.3 auf der nächsten Seite aufgeführt. Die Zuordnung der diastereotopen H_β -Protonen erfolgte aus der Analyse der sechzehn berechneten Strukturen.

Aminosäure	H ^N	H _α	H _β	Andere
ETA 1	7.53	–	–	H11 3.71 (<i>pro-R</i>), H12 3.65 (<i>pro-S</i>), H21 4.07 (<i>pro-S</i>), H22 3.35 (<i>pro-R</i>)
TRP 2	7.46	5.42	3.37 (<i>pro-S</i>), 3.30 (<i>pro-R</i>)	H _{δ1} 7.08, H _{ε1} 8.22, H _{ε2} 7.09, H _{ζ3} 7.21, H _{ε3} 8.03
DLE 3	8.74	4.49	1.43 (<i>pro-S</i>), 1.28 (<i>pro-R</i>)	H _γ 1.06, H _δ 0.60, 0.76
TRP 4	9.10	5.62	3.54 (<i>pro-S</i>), 3.41 (<i>pro-R</i>)	H _{δ1} 7.02, H _{ε1} 8.39, H _{ζ2} 7.65, H _{ζ3} 7.21, H _{ε3} 8.11
DLE 5	8.84	5.22	1.82 (<i>pro-S</i>), 1.52 (<i>pro-R</i>)	H _γ 0.96, H _δ 0.45, 0.86
TRP 6	9.42	5.67	3.36	H _{δ1} 7.04, H _{ε1} 8.65, H _{ζ3} 7.21, H _{ε3} 7.81
DLE 7	8.61	5.80	1.79 (<i>pro-S</i>), 1.69 (<i>pro-R</i>)	H _γ 1.00, H _δ 0.70, 0.86
TRP 8	9.74	5.71	3.86 (<i>pro-S</i>), 3.71 (<i>pro-R</i>)	H _{δ1} 7.06, H _{ε1} 8.63, H _{ζ3} 7.27, H _{ε3} 8.22
DVA 9	8.80	5.47	2.47	H _γ 1.27, 1.33
VAL 10	8.63	4.42	2.15	H _γ 0.98, 1.20
DVA 11	7.48	6.09	2.58	H _γ 1.21, 1.35
ALA 12	7.76	5.10	1.60	–
SUC 13	–	–	–	H21 2.91 (<i>pro-R</i>), H22 2.76 (<i>pro-S</i>)

Tabelle 3.3: ^1H -chemische Verschiebungen von Minigramicidin in Benzol- d_6 /Aceton- d_6 (10:1, v/v).

Für alle Aminosäurereste in Minigramicidin konnten die $^3\text{J}_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}_\alpha}$ -Kopplungskonstanten durch Auswertung der entsprechenden Kreuzsignale aus dem hochaufgelösten DQF-COSY-Spektrum bestimmt werden (Tab. 3.4).

Aminosäure	TRP2	DLE3	TRP4	DLE5	TRP6	DLE7	TRP8
Kopplung	7.54 Hz	9.02 Hz	6.39 Hz	9.26 Hz	7.10 Hz	9.65 Hz	6.27 Hz
Forts.	DVA9	VAL10	DVA11	ALA12			
	8.94 Hz	8.50 Hz	9.81 Hz	9.24 Hz			

Tabelle 3.4: Aus einem hochaufgelösten DQF-COSY-Spektrum gewonnene $^3\text{J}_{\text{H}^{\text{N}}\text{H}_\alpha}$ -Kopplungskonstanten für Minigramicidin-Dimer in Benzol- d_6 /Aceton- d_6 (10:1, v/v).

Die Werte liegen mit Bereich von 6.2 bis 9.8 Hz und deuten zusammen mit den charakteristischen starken $\text{H}_\alpha\text{-H}^{\text{N}}$ (i,i-1)-Kreuzsignalen [325] auf ein β -Faltblatt als Se-

kundärstrukturmotiv des Minigramicidins hin, was mit der bekannten Struktur von Gramicidin A im Einklang steht.

Die weitere Auswertung der NOESY-Spektren mit 40, 80 und 150 ms ergab eine Vielzahl von strukturgebenden Kreuzsignalen. Insgesamt konnten aus dem 150 ms NOESY-Spektrum 626 NOEs für einen Minigramicidinstrang zugeordnet werden. Diese verteilen sich auf 273 intraresiduale, 162 sequentielle und 181 interresiduale NOEs. Ein Überblick über die wichtigsten strukturgebenden NOE-Kontakte ist in Abbildung 3.10 gezeigt.

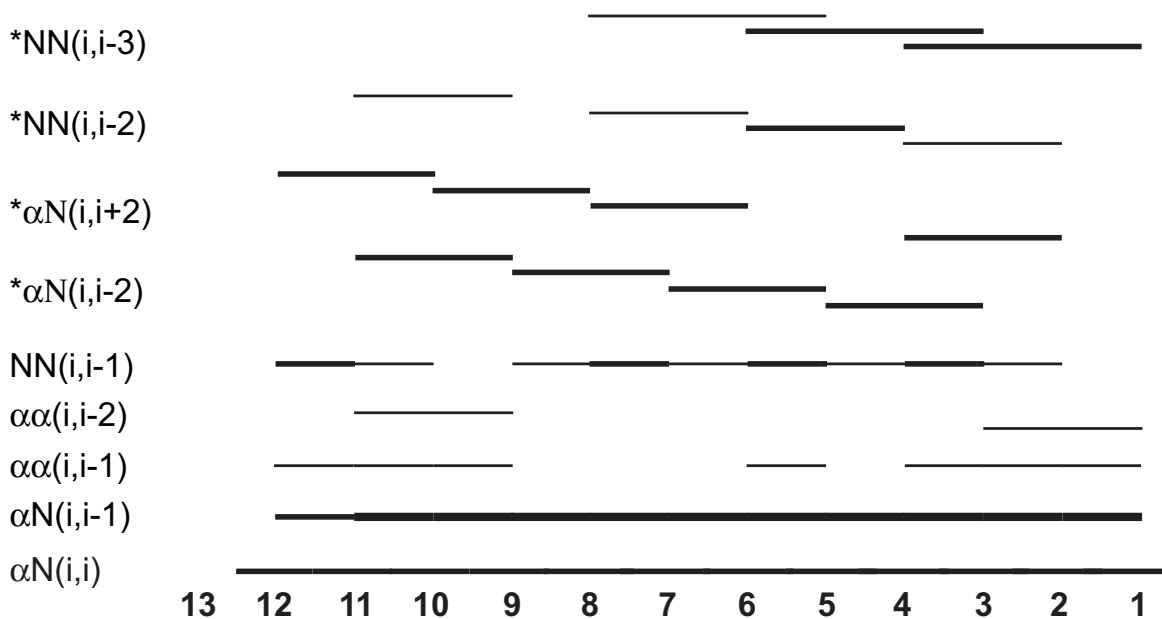


Abbildung 3.10: Experimentelle NOE-Kontakte aus dem 600 MHz NOESY-Spektrum mit einer Mischzeit von 150 ms von Minigramicidin in Benzol- d_6 /Aceton- d_6 (10:1, v/v). Die Stärke der Balken ist proportional zur Intensität der gemessenen NOE-Kreuzsignale. Auffällig sind die interresidualen NOE-Kontakte zwischen den beiden Strängen, die mit einem Stern gekennzeichnet sind (*).

Die einzelnen strukturtypischen NOEs werden durch Balken symbolisiert, deren Stärke der Intensität des NOE-Kreuzsignals proportional ist.

Das gefundene NOE-Muster mit charakteristischen H_α - $H^N(i,i\pm 2)$ -Kreuzsignalen ist charakteristisch für eine linksgängige π -Helix. Allerdings lässt sich eine derartige monomere Helix mit zwei Aminosäuren pro Windung nicht spannungsfrei aufbauen. Wahrscheinlich bildet Minigramicidin daher ein doppelt-helikales paralleles linksgängiges

Dimer, wie es schon von Chen et al. für Gramicidin A in Methanol/CaCl₂ [253] gefunden wurde. Dementsprechend wurde diese Struktur für die Zuordnung der NOE-Signale zwischen den einzelnen Strängen verwendet.

Es ergaben sich im Mittel 24.1 NOE-Kontakte pro Aminosäure (Abb. 3.11) für einen Strang von Minigramicidin. Es wurden für Minigramicidin in diesem Lösemittelgemisch keine langreichweitigen (*long range*) NOE-Kontakte ($i > i+4$) beobachtet.

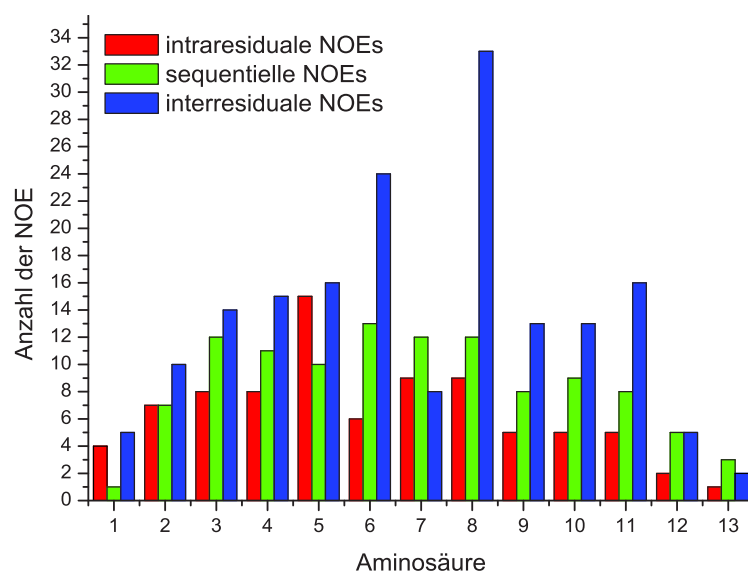


Abbildung 3.11: Statistik der NOEs pro Rest für Minigramicidin. Rot gekennzeichnet sind die intraresidualen NOEs, grün die sequentiellen und blau die interresidualen. Sequentielle und interresiduale Kreuzsignale wurde jeweils als ein NOE für die Partner gezählt.

Die Abstands-*restraints* wurden nach der Kalibrierung der geminalen H_β-Protonen von TRP8 auf 1.78 Å berechnet und in Abhängigkeit von der Intensität des Kreuzsignals in *strong* (1.5–2.5 Å), *medium* (2.5–3.5 Å) und *weak* (3.5–5.2 Å) eingeteilt. Für die Pseudoatome von Methyl- und Methylengruppen sowie die aromatischen Protonen wurde eine Korrektur von 0.5 Å pro Proton zu dem Abstand-*restraint* addiert [327].

Zusätzliche Wasserstoffbrücken-*restraints* wurden durch die Analyse der aufgenommenen Temperaturreihe von eindimensionalen ¹H-Spektren durch Dr. Hans-Dieter Arndt vom Arbeitskreis Koert gewonnen (Abb. 3.12 auf der nächsten Seite). Durch Vergleich mit der von Chen et al. gelösten Struktur [253] konnten diese intermolekularen Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Minigramicidinsträngen zugeordnet werden.

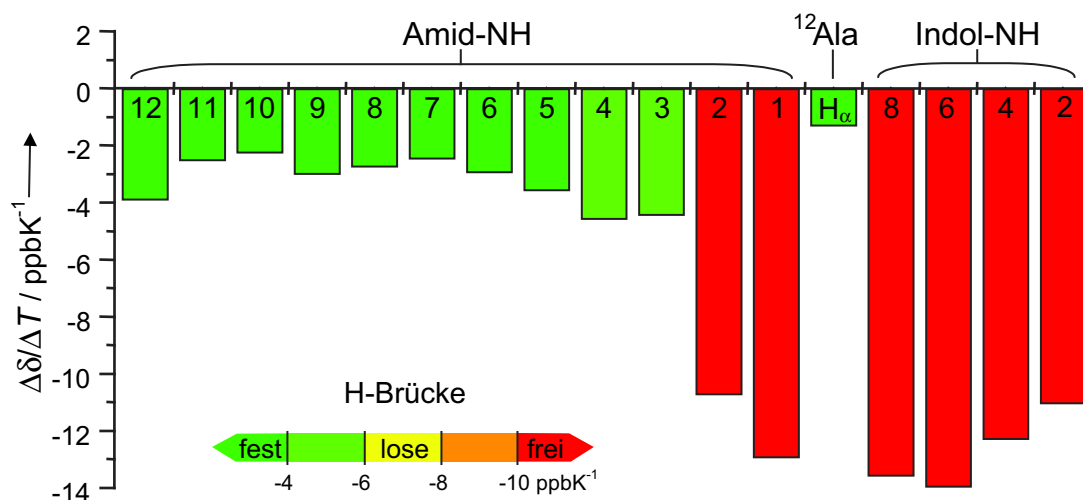


Abbildung 3.12: Temperaturabhängigkeit austauschbaren Protonensignale von Minigramicidin im Bereich von 5–45 °C, bestimmt aus ^1H -Spektren. Alle Signale wiesen ein lineares Verhalten auf, die nicht-aciden Protonen blieben nahezu unverändert. Als Referenzsignal wurde das H_α -Proton von Alanin 12 herangezogen. Übernommen aus [308].

3.4.3 Strukturrechnung

Für die Strukturrechnung wurden 273 intraresiduale, 162 sequentielle und 181 interresiduale NOEs und 20 $^3\text{J}_{H^N H_\alpha}$ -Kopplungskonstanten pro Minigramicidin-Strang mit dem Programm X-PLOR [328], Version 98.1, herangezogen. Die TBDPS-Schutzgruppen wurden aufgrund der Zuordnungsprobleme nicht in der Rechnung berücksichtigt. Aufgrund der schon bekannten sehr ähnlichen Struktur von gA in Methanol/ CaCl_2 mit fast identischen NOE-Mustern [253] wurde die Rechnung mit zwei Strängen, aufgeteilt auf die Segmente A und B durchgeführt. Die Molekulardynamik-Rechnungen wurden in Anlehnung an den physikalischen Prozeß einer sich langsam abkühlenden Schmelze mit einem *simulated annealing* (SA)-Protokoll durchgeführt [329–332]. Das verwendete SA-Protokoll ist schematisch in Abbildung 3.13 auf der nächsten Seite gezeigt.

Das *simulated annealing*-Protokoll beginnt mit einer ersten Energieminimierung mit 50 Optimierungsschritten nach der Methode der konjugierten Gradienten [333, 334]. Es schließt sich eine Hochtemperaturphase (2000 K, 32.5 ps, 6500 Schritte, $k_{\text{NOE}} = 0\text{--}50 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$) an, bei der bereits alle Abstandsinformationen wirksam sind. Nach den beiden Kühlphasen (2000–1000 K, 25 ps, 5000 Schritte und 1000–100 K, 10 ps, 2000 Schritte) werden die Kopplungskonstanten-*restraints* eingeschaltet. Abschließend



Abbildung 3.13: Ablauf des *simulated annealing*-Protokolls für die Strukturrechnung von Minigramicidin.

wird eine Energieminimierung mit 200 Optimierungsschritten nach der Methode der konjugierten Gradienten durchgeführt.

Bei den nicht stereospezifisch zugeordneten Protonen der Methylenprotonen und den diastereotopen Methylgruppen von Valin und Leucin wurde die *floating chirality* Prozedur von X-PLOR angewendet. Hierbei werden die Protonen bzw. Methylgruppen in den prochiralen Zentren ausgetauscht und dann überprüft, ob die Abstandsinformationen so besser erfüllt werden [335, 336].

3.4.4 Die Struktur von Minigramicidin in Benzol- d_6 /Aceton- d_6 (10:1, v/v)

Es wurden insgesamt 200 Strukturen mit dem oben beschriebenen *simulated annealing*-Protokoll gerechnet, von denen die sechzehn energetisch niedrigsten Strukturen weiter analysiert wurden.

Die Struktur des Minigramicidins besteht aus zwei parallel zueinander orientierten, ineinander verwundenen, rechtsgängigen π -Helices der Minigramicidine mit 5.7 Resten pro Windung ($\uparrow\uparrow \pi\pi_{LD}^{5.7}$).

Die sechzehn berechneten Strukturen stehen im Einklang mit den experimentellen Daten. Es treten keine Verletzungen der NOE-Abstände $>0.3 \text{ \AA}$ auf und die Dihedralwinkel sind im Bereich $\pm 5^\circ$ nicht verletzt. Die Energien der Strukturen liegen im normalen Bereich für die Molekülgröße (Tabelle 3.5).

Energie	Mittelwert [kcal/mol]
E_{gesamt}	364.0 ± 4.4
$E_{Bindungen}$	37.3 ± 0.9
E_{Winkel}	148.3 ± 2.2
$E_{Improper}$	24.3 ± 0.8
E_{vdW}	61.4 ± 1.0
E_{NOE}	85.8 ± 2.1

Tabelle 3.5: Gesamtenergie und Einzelbeiträge in kcal/mol für die sechzehn energetisch günstigsten Strukturen von Minigramicidin in Benzol- d_6 /Aceton- d_6 (10:1, v/v).

Der *rmsd*-Wert (*root mean square deviation*) ist ein Maß für die Qualität der berechneten Strukturen und beschreibt die Standardabweichung der Strukturen in einem Ensemble untereinander. Die Werte wurden mit dem Programm MOLMOL [337] in Bezug auf eine aus den 16 energetisch günstigsten Strukturen gebildete mittlere Struktur bestimmt. Der *rmsd*-Wert der Rückgratatome liegt bei $0.61 \pm 0.18 \text{ \AA}$ und für die Schweratome bei $0.86 \pm 0.24 \text{ \AA}$. Bei der Überlagerung der sechzehn energetisch günstigsten Strukturen erkennt man eine gute Übereinstimmung des Ensembles.

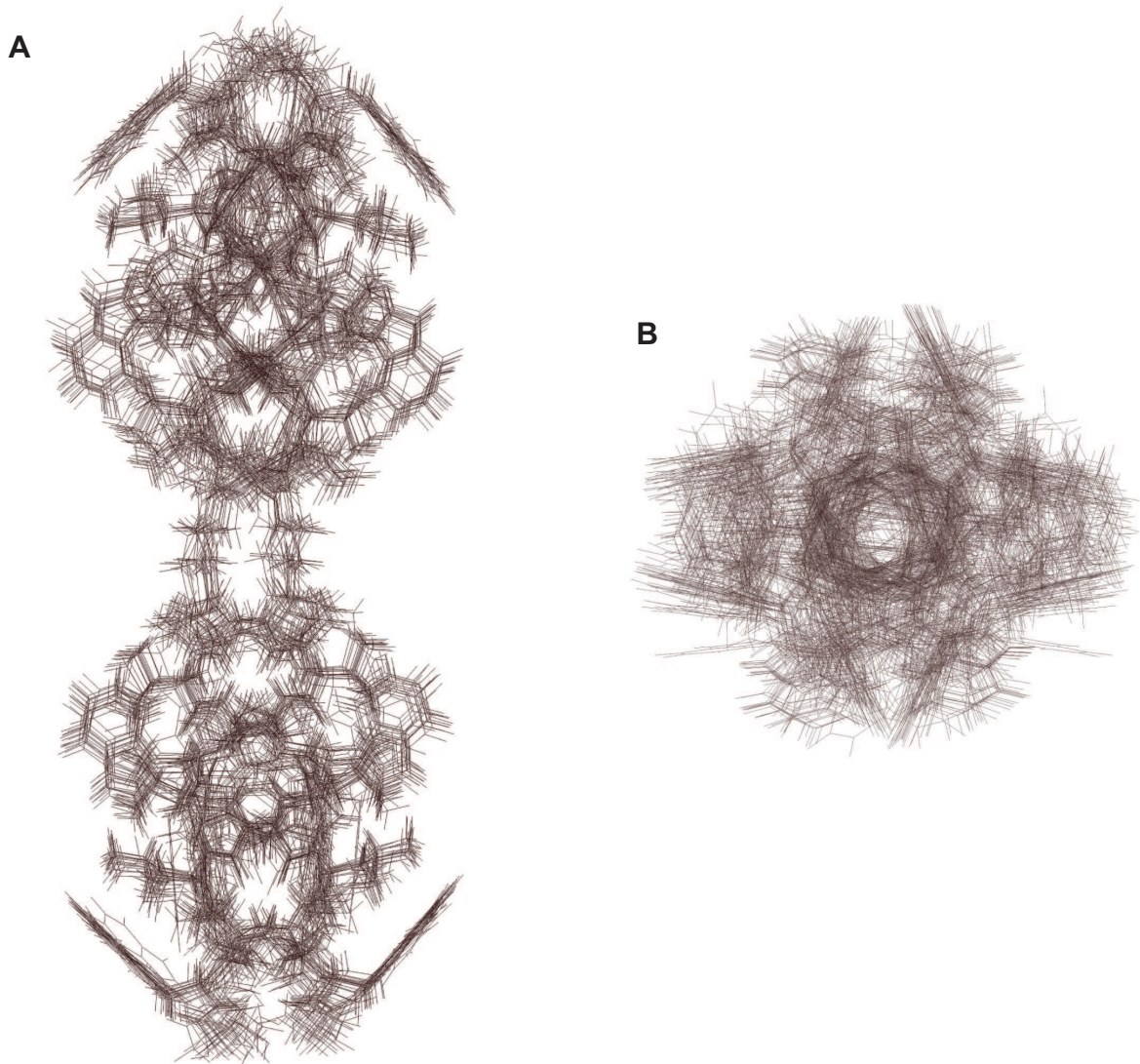


Abbildung 3.14: Überlagerung der sechzehn energetisch günstigsten Strukturen von Minigramicidin in Benzol- d_6 /Aceton- d_6 (10:1, v/v). **A** Seitenansicht, **B** Draufsicht.

Im Ramachandran-Plot (Abb. 3.15 auf der nächsten Seite), der eine Korrelation zwischen den Proteinrückgratwinkeln ϕ und ψ darstellt, erkennt man, daß alle Aminosäurereste in den erlaubten Bereichen (rote und orange Ränder) [338] liegen. Die Werte der Winkel der D-Aminosäuren wurden hierbei einer Punktspiegelung im Koordinatenursprung unterzogen. Die Werte liegen in Regionen für β -Helices, wie schon durch die Werte der Kopplungskonstanten angedeutet wurde.

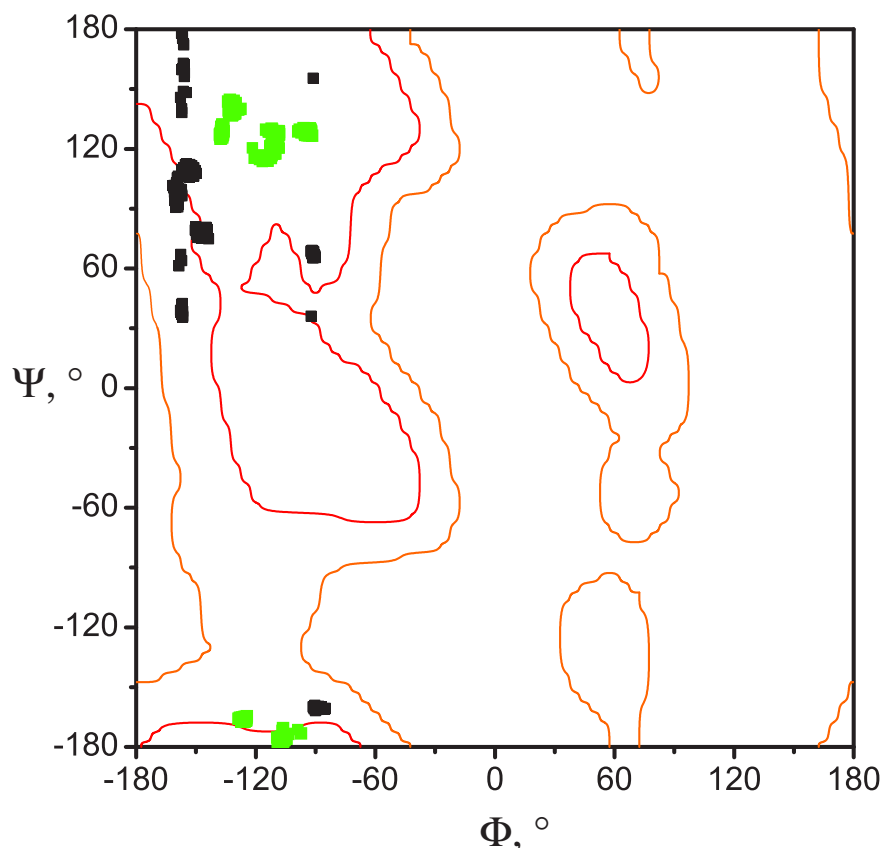


Abbildung 3.15: Ramachandran-Plot der Aminosäurereste von Minigramicidin in Benzol- d_6 /Aceton- d_6 (10:1, v/v). Die Koordinaten der Winkel der D-Aminosäuren wurden einer Punktspiegelung im Koordinatenursprung unterzogen und sind in grün dargestellt.

Die Grafiken und folgenden Statistiken wurden mit den Programmen AQUA und PROCHECK-NMR von Laskowski et al. [339] und durch Auslesen der Rückgratwinkel mit Hilfe des Programmes Insight, Version 2000 (Accelrys Incl., San Diego, CA) und auftragen der erhaltenen Werte mit dem Programm ORIGIN, Version 6.1 erstellt.

Wie aus den Abbildungen für die einzelnen Aminosäuren ersichtlich (Abb. 3.16 auf der nächsten Seite, 3.17 auf Seite 126), variieren die Winkel innerhalb des Ensembles nicht sehr stark. Dies erklärt sich durch die Verwendung der identischen *restraints* für die Aminosäure in den symmetrischen Hälften des Minigramicidins und der beiden gleich aufgebauten Stränge A und B.

In Abbildung 3.18 auf Seite 127 ist die Verteilung des Seitenkettenwinkel χ_1 der sechzehn energetisch günstigsten Strukturen von Minigramicidin in Benzol- d_6 /Aceton- d_6 (10:1, v/v) gezeigt.

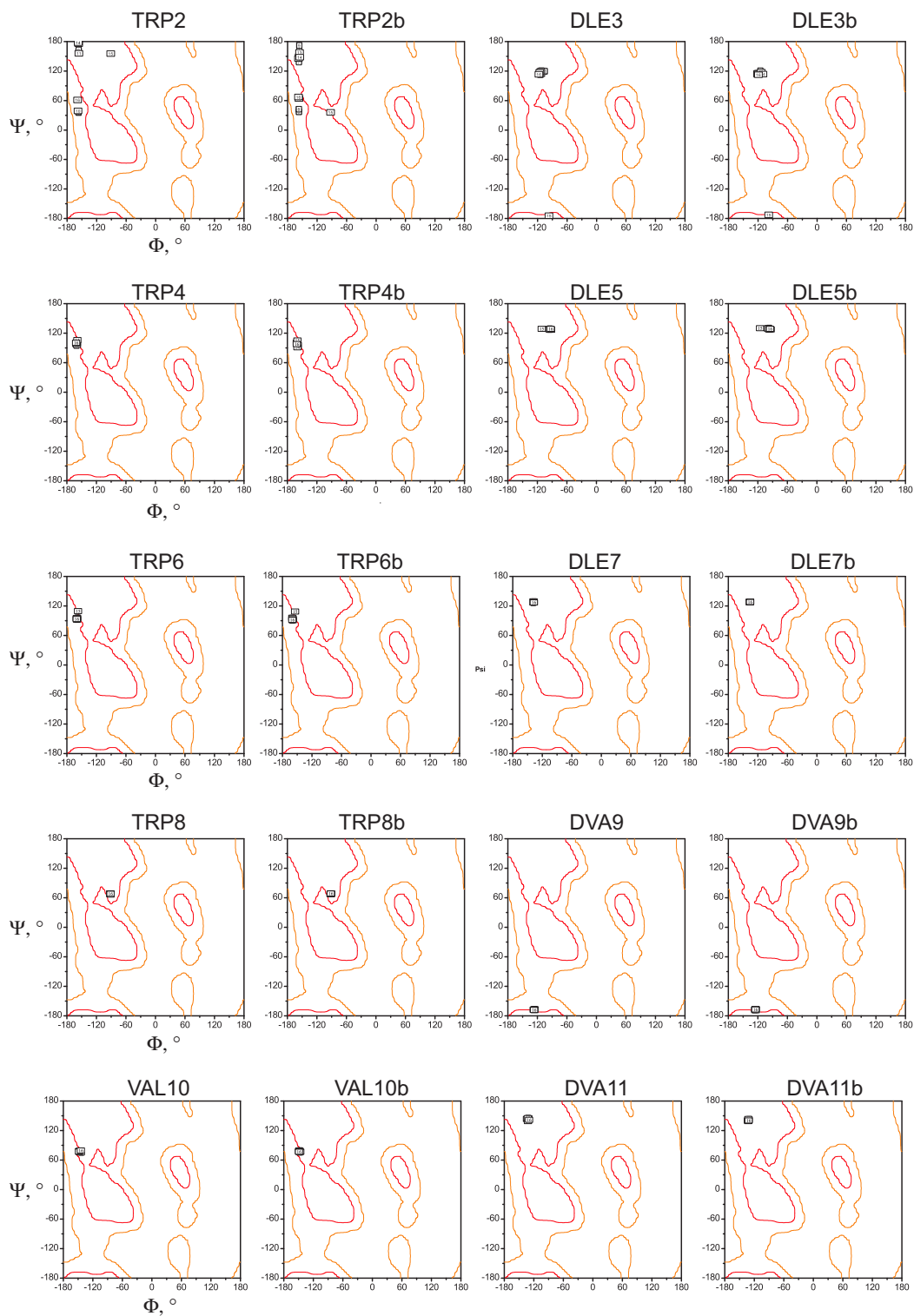


Abbildung 3.16: Ramachandran-Plots nach einzelnen Aminosäure aufgeschlüsselt. Es sind immer nebeneinander die Aminosäuren aus den beiden Strängen von Minigramicidin in Benzol- d_6 /Aceton- d_6 (10:1, v/v) dargestellt. Die Koordinaten der Winkel der D-Aminosäuren wurden einer Punktspiegelung im Koordinatenursprung unterzogen. Die wirklichen Werte erhält man, indem man das Vorzeichen wechselt.

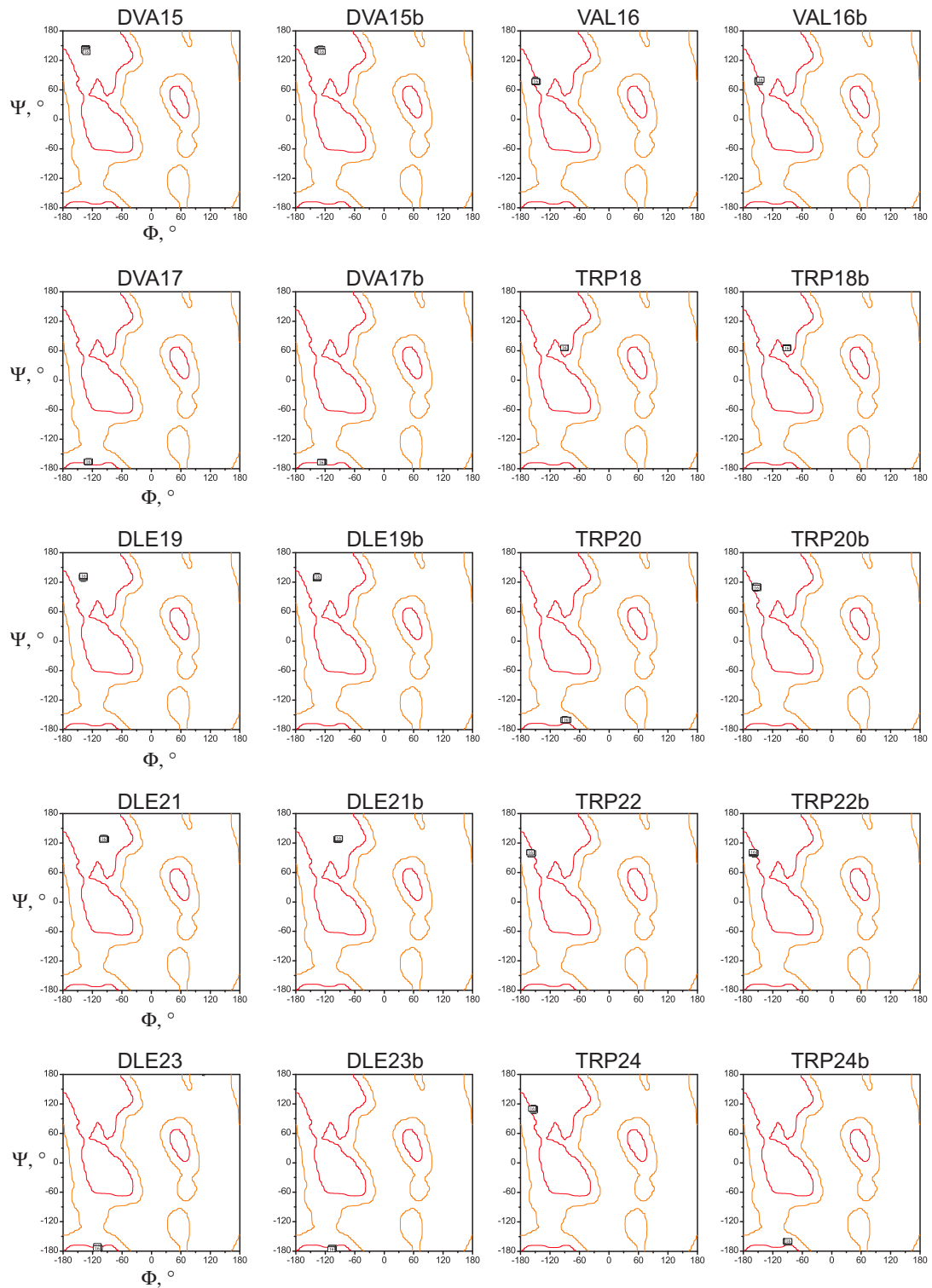


Abbildung 3.17: Ramachandran-Plots nach einzelnen Aminosäure aufgeschlüsselt. Es sind immer nebeneinander die Aminosäuren aus den beiden Strängen von Minigramicidin in Benzol- d_6 /Aceton- d_6 (10:1, v/v) dargestellt. Die Koordinaten der Winkel der D-Aminosäuren wurden einer Punktspiegelung im Koordinatenursprung unterzogen. Die wirklichen Werte erhält man, indem man das Vorzeichen wechselt.

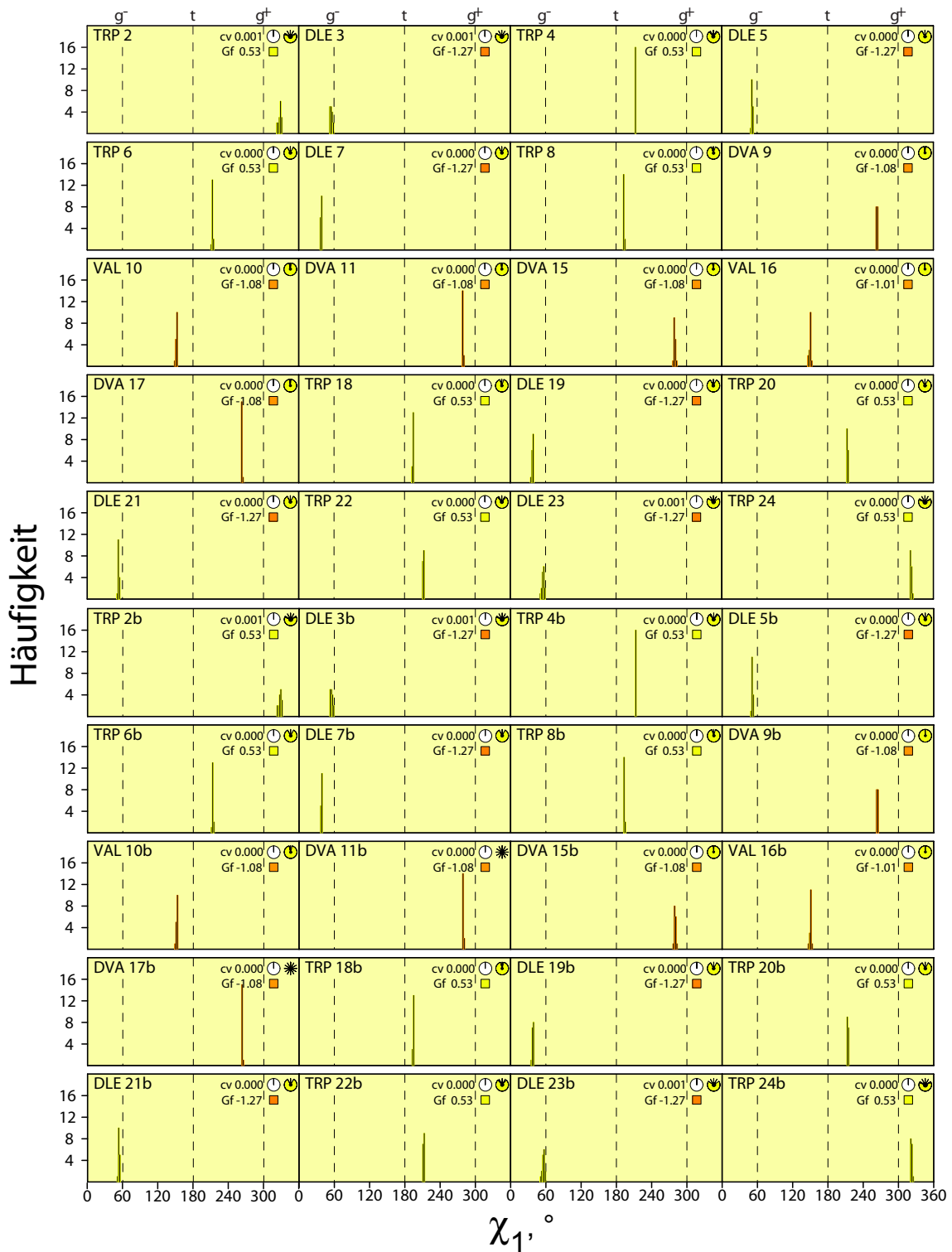


Abbildung 3.18: Verteilung des Seitenkettenwinkel χ_1 der sechzehn energetisch günstigsten Strukturen von Minigramicidin in Benzol- d_6 /Aceton- d_6 (10:1, v/v).

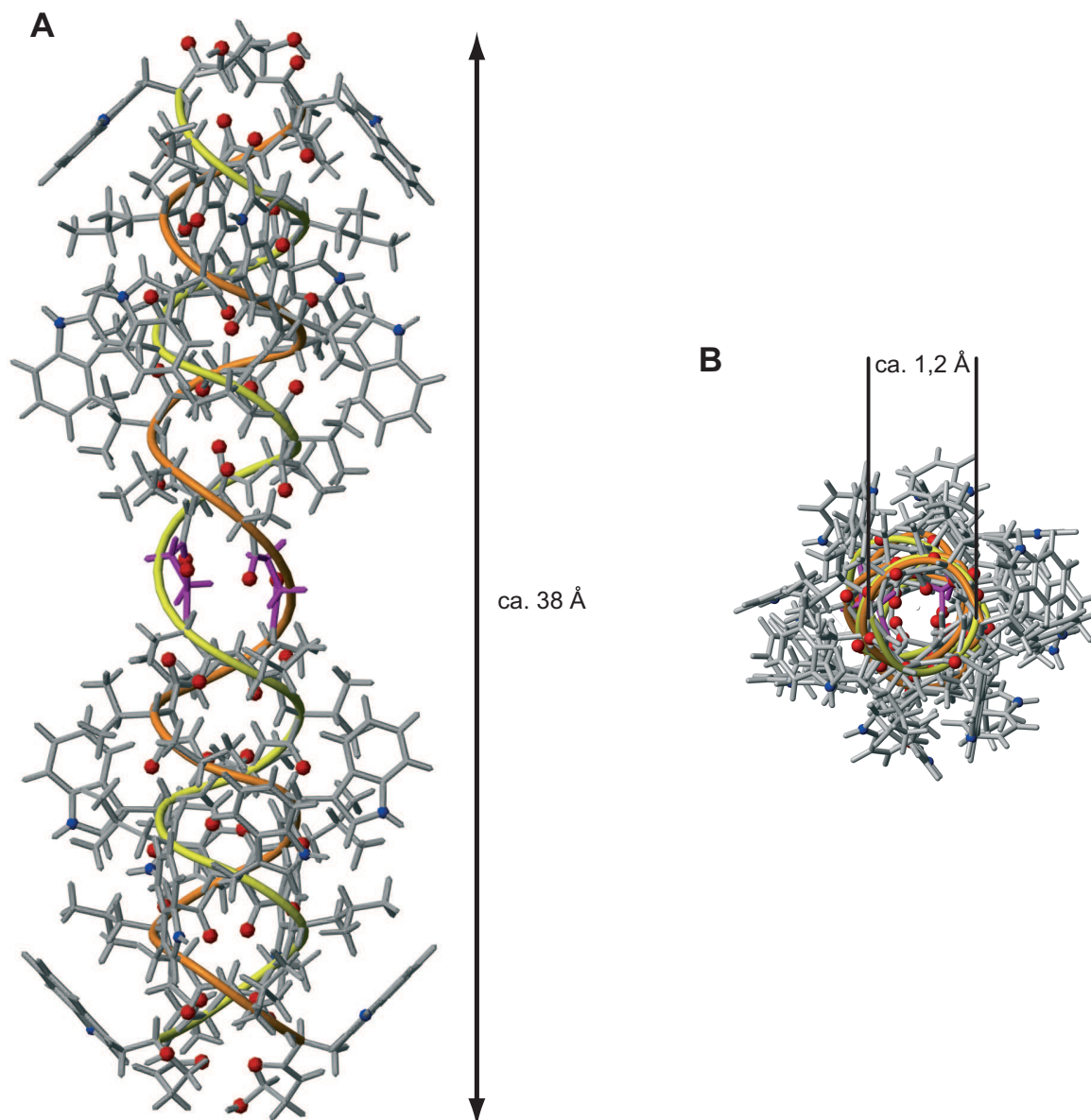


Abbildung 3.19: Gemittelte Struktur des Minigramicidin-Dimers in Benzol- d_6 /Aceton- d_6 (10:1, v/v). **A** Seitenansicht mit Angabe der Länge von ca. 38 Å, **B** Draufsicht mit Angabe des Durchmessers von ca. 1,2 Å.

Die aus den experimentellen Daten bestimmte Struktur von Minigramicidin in dem Lösemittelgemisch Benzol- d_6 /Aceton- d_6 (10:1, v/v) ohne Zusatz von Kationen entspricht im wesentlichen der Struktur, die Gramicidin A in Methanol/ CaCl_2 einnimmt [253]. Die Struktur von Minigramicidin ist aufgrund der kovalenten Verknüpfung der verkürzten gA-Einheiten länger als die der vergleichbaren gA-Struktur. So findet man

ein ungefähre Länge für die beiden parallel orientierten Minigramicidinstränge von ca. 38 Å (ohne die TBDPS-Schutzgruppen) und einen Durchmesser für die gemittelte Struktur von ca. 1.2 Å (Abb. 3.19 auf der vorherigen Seite). Die Succinat-Linker nehmen eine anticlinale Stellung mit Werten für den Dihedralwinkel von $144.7 \pm 9.7^\circ$ (Strang A) bzw. $148.6 \pm 8.1^\circ$ (Strang B) ein, die nahe der antiperiplanaren Stellung sind. Für die gemittelte Struktur findet man eine antiperiplanare Stellung für den Succinat-Linker.

Ebenso wie beim Gramicidin A findet man 5.7 Reste pro Helixwindung und eine links-
händige Orientierung der Stränge. Die gefundene Struktur schließt einen funktions-
fähigen Ionenkanal in diesem Medium aufgrund des sehr kleinen Durchmessers aus.
Die Länge (38 Å) übersteigt auch die Dicke einer normalen Zellmembran (ca. 30 Å).
Ohne Zusatz von Kationen findet man auch für das Minigramicidin keine kanalfähige
Konformation, obwohl die Gramicidineinheiten schon aufgrund der kovalenten Ver-
knüpfung richtig zu einander orientiert sind, um Kanäle zu bilden. Stattdessen findet
im organischen Lösemittel eine Aggregatbildung wie bei gA statt.

3.5 NMR-spektroskopische Untersuchung von Minigramicidin in Chloroform/Methanol (3:1, v/v) mit Cs⁺

3.5.1 NMR-Spektroskopie

Die ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren wurden an einer ca. 1.5 mM Lösung von Minigramicidin in dem Lösemittelgemisch CDCl₃/MeOH-*d*₃ im Verhältnis 3:1, gesättigt mit Cäsiumchlorid, bei einer Temperatur von 293 K durchgeführt. Chloroform/Methanol wurde gewählt, da es die Membranumgebung bei amphiphilen Molekülen nachahmt [340].

Es wurden DQF-COSY- [320], TOCSY- [321] mit 80 ms Mischzeit und NOESY-Spektren [322] mit 70, 150 und 300 ms Mischzeit an einem Bruker AMX600 Spektrometer an der Humboldt-Universität zu Berlin mit der States-TPPI-Methode [323,324] mit phasenempfindlichen Detektion bei 293 K aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen wurden relativ zu dem Chloroformsignal bei 7.25 ppm gemessen. Bei allen Spektren wurde das verbleibende Signal der Hydroxylgruppe des Methanols durch Vorsättigung reduziert. Die Spektren wurden mit dem Programm XWINNMR, Version 3.1 der Firma Bruker (Rheinstetten) unter Verwendung von Exponential- und quadratischen Sinus-Funktionen als Window-Funktionen in der indirekten Dimension prozessiert und basislinienkorrigiert.

3.5.2 Zuordnung der ¹H-chemischen Verschiebung

Wie bei der Untersuchung des Dimers von Minigramicidin in Benzol/Aceton wurden die ¹H-chemischen Verschiebungen mit etablierten Methoden zugeordnet. Es konnten ebenfalls mit einem reduzierten Signalsatz von 12 H_α-H^N-Kreuzsignalen das Vorliegen einer symmetrischen Spezies von Minigramicidin nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der NOESY-Spektren konnten die Verknüpfung der Spinsysteme über sequentielle Zuordnungen der H_α-H^N(i,i-1)-Kreuzsignale bestimmt werden (Abb. 3.9 auf Seite 116). Innerhalb der Spinsysteme war die Zuordnung der Tryptophane aufgrund

von Überlagerungen mit anderen Trp-Resonanzen und den Signalen der OTBDPS-Schutzgruppen nicht immer eindeutig möglich. Die Schutzgruppen wurden aufgrund der massiven Überlagerung der Resonanzen im Aromatenbereich nicht zugeordnet und in der Strukturrechnung verwendet.

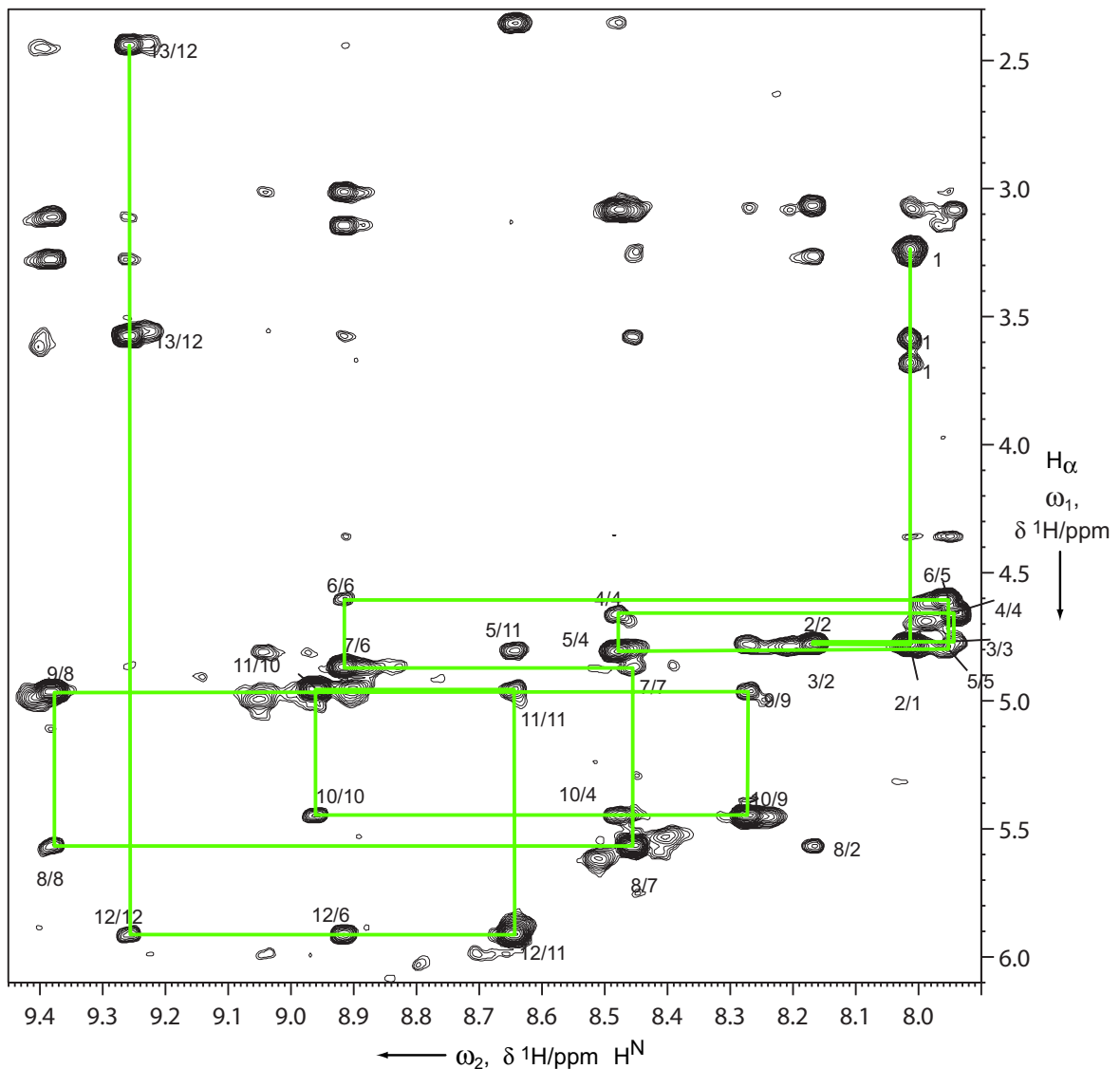


Abbildung 3.20: H_α , H^N -Bereich aus dem NOESY-Spektrum von Minigramicidin in $CDCl_3/MeOH-d_3$ (3:1, v/v), gesätt. Cs^+ . Die H_α - H^N ($i, i-1$) und H_α - H^N ($i, i\pm 6$)-Kreuzsignale sind gezeigt. Die erste Zahl entspricht der Resonanz in ω_1 , die zweite der Resonanz in ω_2 . Zusätzlich ist die Spur für die sequentielle Zuordnung der Resonanzen gezeigt (grüne Linie).

Die Zuordnung von Minigramicidin in gesättigter Cäsiumchlorid- $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_3$ (3:1, v/v)-Lösung ist in Tabelle 3.6 aufgeführt. Die Zuordnung der diastereotopen H_β -Protonen erfolgte aus der Analyse der zehn berechneten Strukturen.

Aminosäure	H^N	H_α	H_β	Andere
ETA 1	8.01	–	–	H1^* 3.65, H21 3.55 (<i>pro-S</i>), H22 3.21 (<i>pro-R</i>)
TRP 2	8.17	4.75	3.24 (<i>pro-S</i>), 3.04 (<i>pro-R</i>)	$\text{H}_{\delta 1}$ 6.98, $\text{H}_{\epsilon 1}$ 9.84, $\text{H}_{\zeta 2}$ 7.32
DLE 3	7.95	4.75	0.92 (<i>pro-S</i>), 0.34 (<i>pro-R</i>)	H_γ 1.06, H_δ 0.60, 0.76
TRP 4	8.48	4.63	3.05	$\text{H}_{\delta 1}$ 7.00, $\text{H}_{\epsilon 1}$ 9.90, $\text{H}_{\zeta 2}$ 7.30
DLE 5	7.96	4.78	0.66 (<i>pro-S</i>), 0.34 (<i>pro-R</i>)	H_δ 0.44, 0.55
TRP 6	8.915	4.57	3.12 (<i>pro-S</i>), 2.99 (<i>pro-R</i>)	$\text{H}_{\delta 1}$ 6.99, $\text{H}_{\epsilon 1}$ 9.86, $\text{H}_{\zeta 2}$ 7.30, $\text{H}_{\eta 2}$ 7.07, $\text{H}_{\zeta 3}$ 6.94, $\text{H}_{\epsilon 3}$ 7.44
DLE 7	8.46	4.84	0.88 (<i>pro-S</i>), 0.21 (<i>pro-R</i>)	H_γ 0.50, H_δ 0.41, 0.48
TRP 8	9.38	5.53	3.24 (<i>pro-S</i>), 3.08 (<i>pro-R</i>)	$\text{H}_{\delta 1}$ 6.89, $\text{H}_{\epsilon 1}$ 8.89, $\text{H}_{\zeta 2}$ 7.10, $\text{H}_{\eta 2}$ 6.97
DVA 9	8.27	4.93	–	H_γ 0.87, 1.07
VAL 10	8.96	5.42	2.05	H_γ 1.07, 1.15
DVA 11	8.64	4.93	2.33	H_γ 1.15
ALA 12	9.26	5.88	1.65	
SUC 13	–	–	–	H21 3.54 (<i>pro-S</i>), H22 2.41 (<i>pro-R</i>)

Tabelle 3.6: ^1H -chemische Verschiebungen von Minigramicidin in gesättigter Cäsiumchlorid- $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_3$ (3:1, v/v)-Lösung.

Für alle Aminosäurereste in Minigramicidin konnten die $^3\text{J}_{\text{H}^N\text{H}_\alpha}$ -Kopplungskonstanten durch Auswertung der entsprechenden Kreuzsignale aus dem DQF-COSY-Spektrum bestimmt werden (Tab. 3.7).

Aminosäure	TRP2	DLE3	TRP4	DLE5	TRP6	DLE7	TRP8
Kopplung	8.91 Hz	9.59 Hz	9.25 Hz	9.40 Hz	8.69 Hz	9.69 Hz	9.89 Hz
Forts.	DVA9	VAL10	DVA11	ALA12			
	9.42 Hz	9.56 Hz	9.38 Hz	9.69 Hz			

Tabelle 3.7: Aus dem DQF-COSY-Spektrum gewonnene $^3\text{J}_{\text{H}^N\text{H}_\alpha}$ -Kopplungskonstanten für Minigramicidin in gesättigter Cäsiumchlorid- $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_3$ (3:1, v/v)-Lösung.

Die Werte liegen mit Bereich von 8.7 bis 9.9 Hz und deuten auf ein β -Faltblatt als Sekundärstrukturmotiv des Minigramicidins hin, wie es auch schon im Falle des Minigramicidin-Dimers gefunden wurde.

Die weitere Auswertung der NOESY-Spektren mit 70, 150 und 300 ms ergab eine Vielzahl von strukturgebenden Kreuzsignalen. Insgesamt konnten aus dem 300 ms NOESY-Spektrum 215 NOEs für Minigramicidin zugeordnet werden. Diese verteilen sich auf 102 intraresiduale, 43 sequentielle und 70 interresiduale NOEs. Ein Überblick über die wichtigsten strukturgebenden NOE-Kontakte ist in Abbildung 3.21 gezeigt.

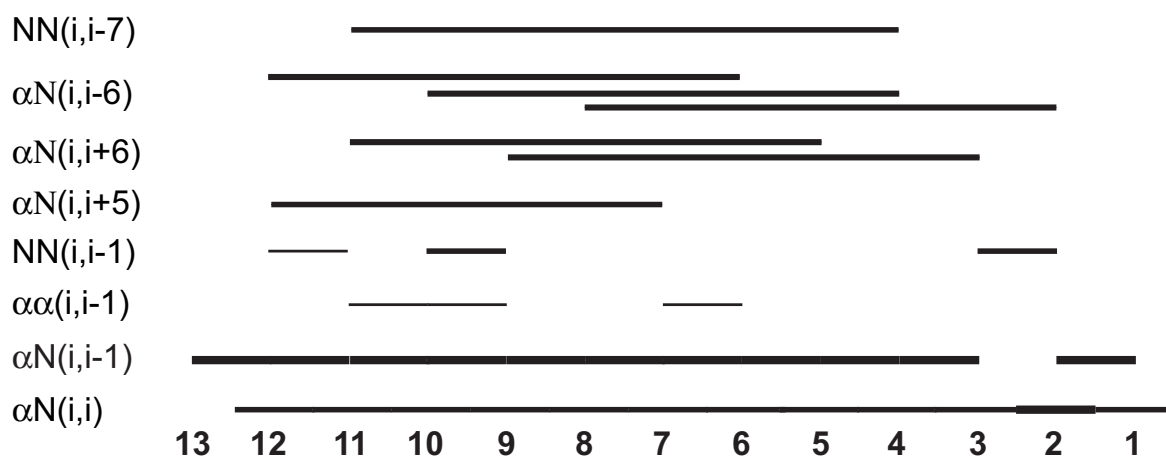


Abbildung 3.21: Experimentelle NOE-Kontakte aus dem 600 MHz NOESY-Spektrum mit einer Mischzeit von 300 ms von Minigramicidin in gesättigter Cäsiumchlorid- $\text{CDCl}_3/\text{MeOH}-d_3$ (3:1, v/v)-Lösung. Die Stärke der Balken ist proportional zur Intensität der gemessenen NOE-Kreuzsignale. Auffällig sind die interresidualen NOE-Kontakte mit großem Abstand ($i > 4$).

Das gefundene NOE-Muster ähnelt stark dem von Gramicidin A in membranähnlichen Umgebung, wie von Arseniev et al. in SDS-Micellen bestimmt [272, 273]. Auffällig waren die NOEs zwischen H_α und H^N -Protonen im Abstand von sechs Resten. Die Orientierung der $\alpha\text{N}(i, i \pm 6)$ Kontakte deutete auf eine rechtsgängige π -Helix. Zusammen mit der Ganghöhe von etwa sechs Aminosäuren pro Windung ergaben sich Hinweise auf eine kanalaktive Konformation des Minigramicidins. Es wurden nur wenige schwache NOE-Kontakte zwischen Iminoprotonen gefunden, so daß nach einem Vergleich mit bekannten Dimerkonformationen von gA im Komplex mit einwertigen Kationen [252, 256, 258, 267] ein doppelt helikales Dimer ausgeschlossen werden kann.

Mit im Mittel 16.5 NOE-Kontakten pro Aminosäure (Abb. 3.22) für Minigramicidin in gesättigter Cäsiumchlorid- $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_3$ (3:1, v/v)-Lösung ist die Struktur schlechter als das Dimer charakterisiert.

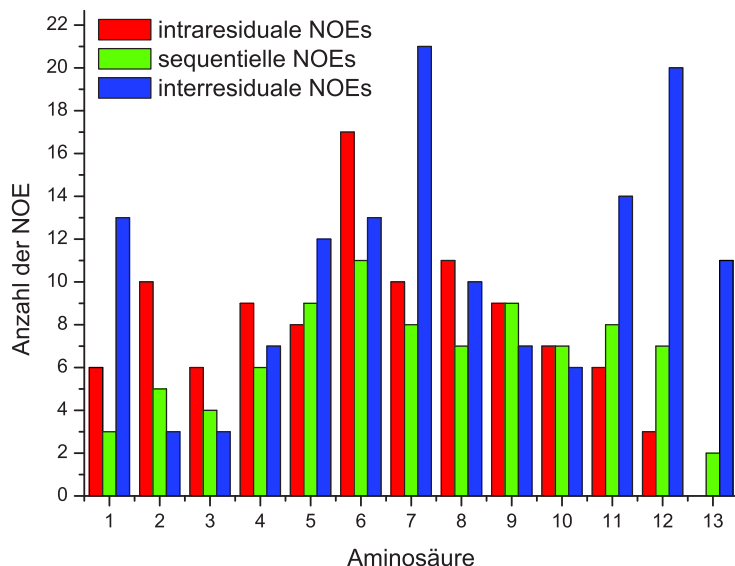


Abbildung 3.22: Statistik der NOEs pro Rest für Minigramicidin in gesättigter Cäsiumchlorid- $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_3$ (3:1, v/v)-Lösung. Rot gekennzeichnet sind die intraresidualen NOEs, grün die sequentiellen und blau die interresidualen. Sequentielle und interresiduale Kreuzsignale wurde jeweils als ein NOE für die Partner gezählt.

Die Abstands-*restraints* wurden nach der Kalibrierung der geminalen H_β -Protonen von TRP6 auf 1.8 Å berechnet und in Abhängigkeit von der Intensität des Kreuzsignals in *strong* (1.5–2.5 Å), *medium* (2.5–3.5 Å) und *weak* (3.5–5.2 Å) eingeteilt. Für die Pseudoatome von Methyl- und Methylgruppen sowie die aromatischen Protonen wurde eine Korrektur von 0.5 Å pro Proton zu dem Abstand-*restraint* addiert [327].

Die Messung der Temperaturabhängigkeit der aciden Protonen ergab ein sehr uneinheitliches Bild (Abb. 3.23 auf der nächsten Seite). Die Interpretation ist bei kleinen Peptiden schwierig [341, 342], daher wurden in der Strukturrechnung keine Wasserstoffbrücken-*restraints* für das Monomer verwendet. Die Ergebnisse aus den Strukturrechnungen zeigen, daß nur die Amidprotonen der Reste 2, 4, 7, 9 und 11 in Wasserstoffbrücken involviert sind. Dies korrespondiert gut mit dem oben gefundenen Muster der Temperaturabhängigkeit.

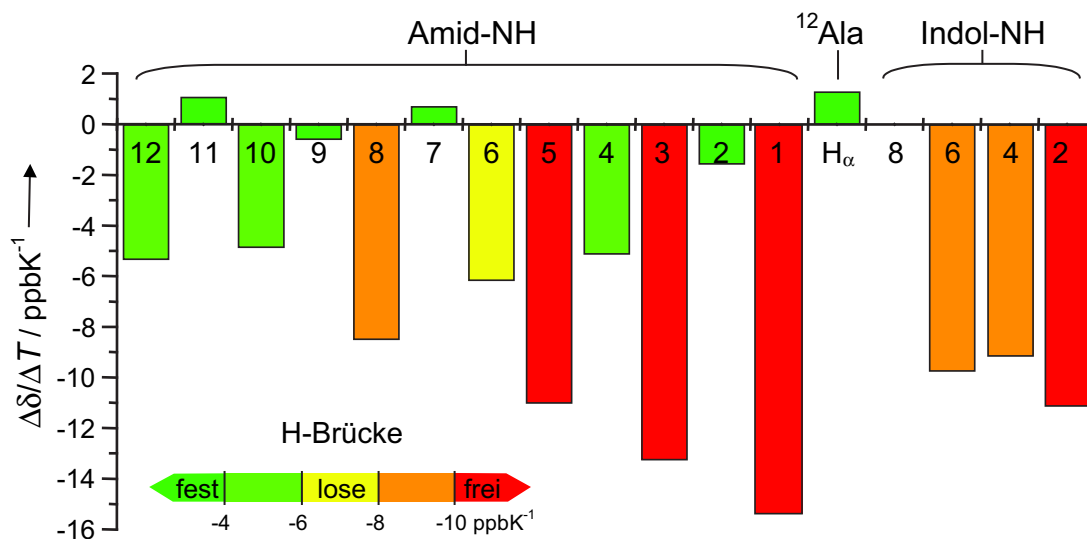


Abbildung 3.23: Temperaturabhängigkeit austauschbaren Iminosignale von Minigramicidin in gesättigter Cäsiumchlorid- $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_3$ (3:1, v/v)-Lösung im Bereich von 5-25 °C, bestimmt aus eindimensionalen ^1H -Spektren. Oberhalb von 30 °C traten Signalverbreiterungen auf. Übernommen aus [308].

3.5.3 Strukturrechnung

Für die Strukturrechnung wurde das gleiche *simulated annealing*-Protokoll wie im Falle des Dimers benutzt. Es wurden 215 NOEs (102 intraresiduale, 43 sequentielle und 70 interresiduale NOEs) und 20 $^3\text{J}_{\text{H}^N\text{H}_\alpha}$ -Kopplungskonstanten für Minigramicidin werden. Es wurde nur ein Minigramicidin gerechnet, da Dimere aufgrund des NOE-Musters ausgeschlossen werden konnten.

3.5.4 Die Struktur von Minigramicidin in gesättigter Cäsiumchlorid- $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_3$ (3:1, v/v)-Lösung

Es wurden insgesamt 100 Strukturen mit dem oben beschriebenen *simulated annealing*-Protokoll gerechnet, von denen die zehn energetisch niedrigsten Strukturen weiter analysiert wurden.

Die zehn berechneten Strukturen stehen im Einklang mit den experimentellen Daten. Es treten keine Verletzungen der NOE-Abstände $>0.5 \text{ \AA}$ auf und die Dihedralwinkel sind im Bereich $\pm 5^\circ$ nicht verletzt. Die Energien der Strukturen liegen im normalen

Energie	Mittelwert (kcal/mol)
E_{gesamt}	182.2 ± 17.8
$E_{Bindungen}$	10.9 ± 2.3
E_{Winkel}	55.2 ± 6.9
$E_{Improper}$	12.9 ± 2.1
E_{vdW}	19.0 ± 3.6
E_{NOE}	58.3 ± 12.5
E_{Koppl}	25.8 ± 4.4

Tabelle 3.8: Gesamtenergie und Einzelbeiträge in kcal/mol für die zehn energetisch günstigsten Strukturen von Minigramicidin in gesättigter Cäsiumchlorid- $CDCl_3/MeOH-d_3$ (3:1, v/v)-Lösung.

Bereich für die Molekülgröße (Tabelle 3.8). Allerdings ist die Variation in der Werten größer als für das Dimer, die Strukturen konvergieren nicht so gut, was aufgrund der geringeren NOE-Kontakte und der zum Teil schlechteren Definition einzelner Seitenketten im Monomer erklärbar ist. Die Überlagerung der zehn energetisch niedrigsten

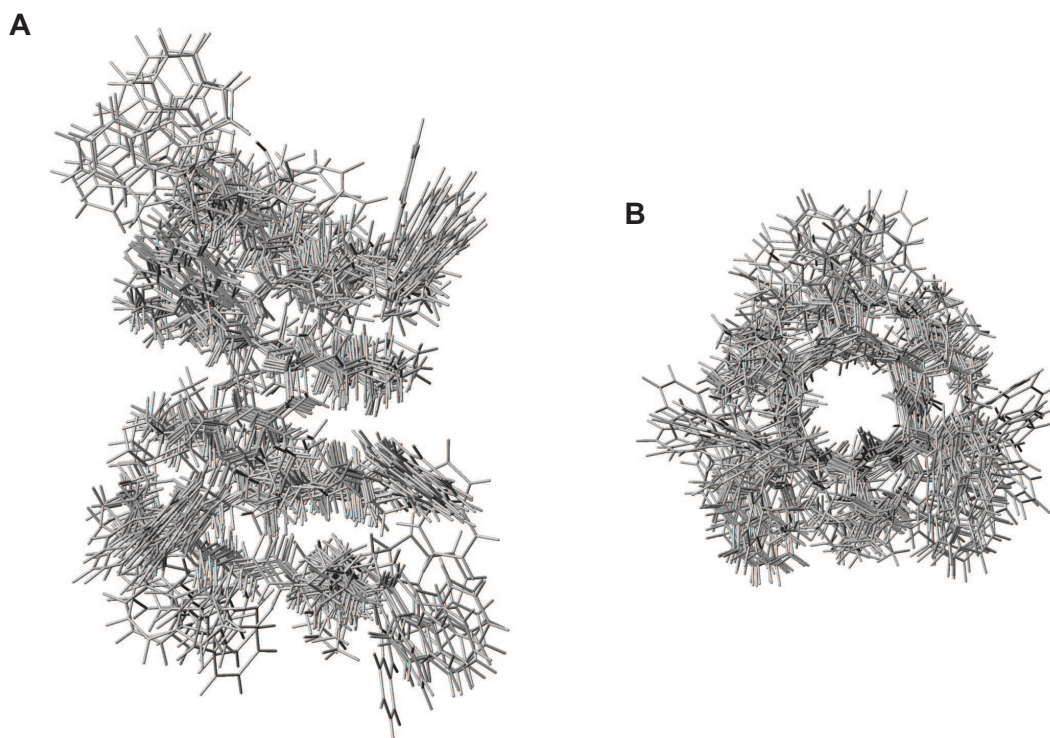


Abbildung 3.24: Überlagerung der zehn energetisch günstigsten Strukturen von Minigramicidin in gesättigter Cäsiumchlorid- $CDCl_3/MeOH-d_3$ (3:1, v/v)-Lösung. **A** Seitenansicht, **B** Draufsicht.

Strukturen der monomeren Struktur des Minigramicidins in gesättigter Cäsiumchlorid- $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_3$ (3:1, v/v)-Lösung zeigt für den Kanal eine sehr gute Übereinstimmung der Strukturen (Abb. 3.24 auf der vorherigen Seite, **B**).

Die Seitenketten, insbesondere die der Tryptophane 2/24 und 4/22, sind nicht so gut in allen Strukturen fixiert, so daß schließlich die *rmsd*-Werte für die zehn Strukturen zur gemittelten Struktur für die Rückgrat-Atome bei $0.91 \pm 0.32 \text{ \AA}$, und für die Schwere-Atome bei $1.86 \pm 0.36 \text{ \AA}$ liegen. Der Succinat-Linker nimmt in allen Strukturen eine anticlinale Stellung mit einem Dihedralwinkel von $-113.3 \pm 27.0^\circ$ ein, wobei auch hier wieder die höhere Streuung der Werte im Vergleich zu denen des Dimers auffällt.

Im Ramachandran-Plot (Abb. 3.25), variieren die Werte der Rückgratwinkel im Vergleich zum Dimer zwischen den einzelnen Strukturen stärker als beim Dimer, liegen allerdings ebenfalls im erlaubten Bereich für β -Helices. Dies wird auch in den Einzelplots für die ϕ/ψ -Winkel deutlich (Abb. 3.26 auf der nächsten Seite).

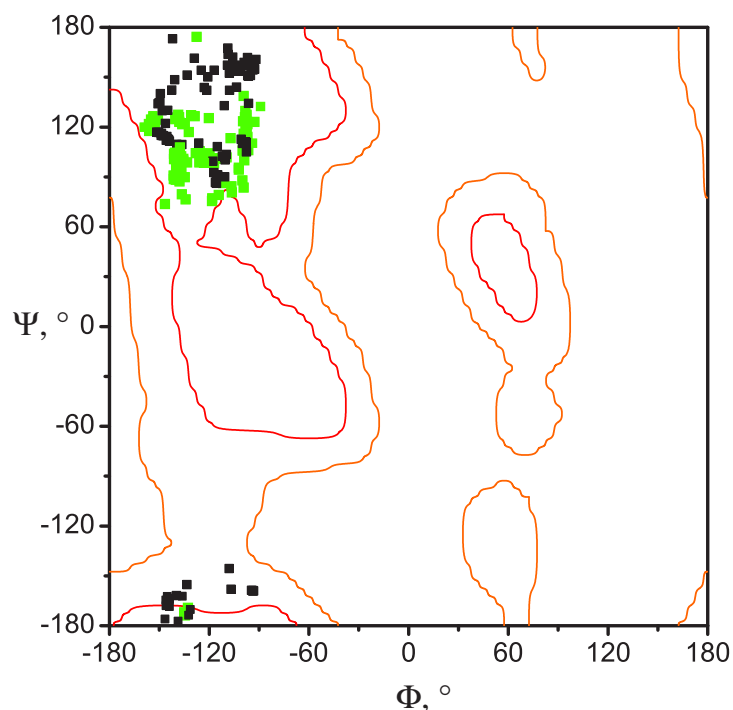


Abbildung 3.25: Ramachandran-Plot der Aminosäurereste von Minigramicidin in gesättigter Cäsiumchlorid- $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_3$ (3:1, v/v)-Lösung. Die Koordinaten der Winkel der D-Aminosäuren wurden einer Punktspiegelung im Koordinatenursprung unterzogen und sind in grün dargestellt.

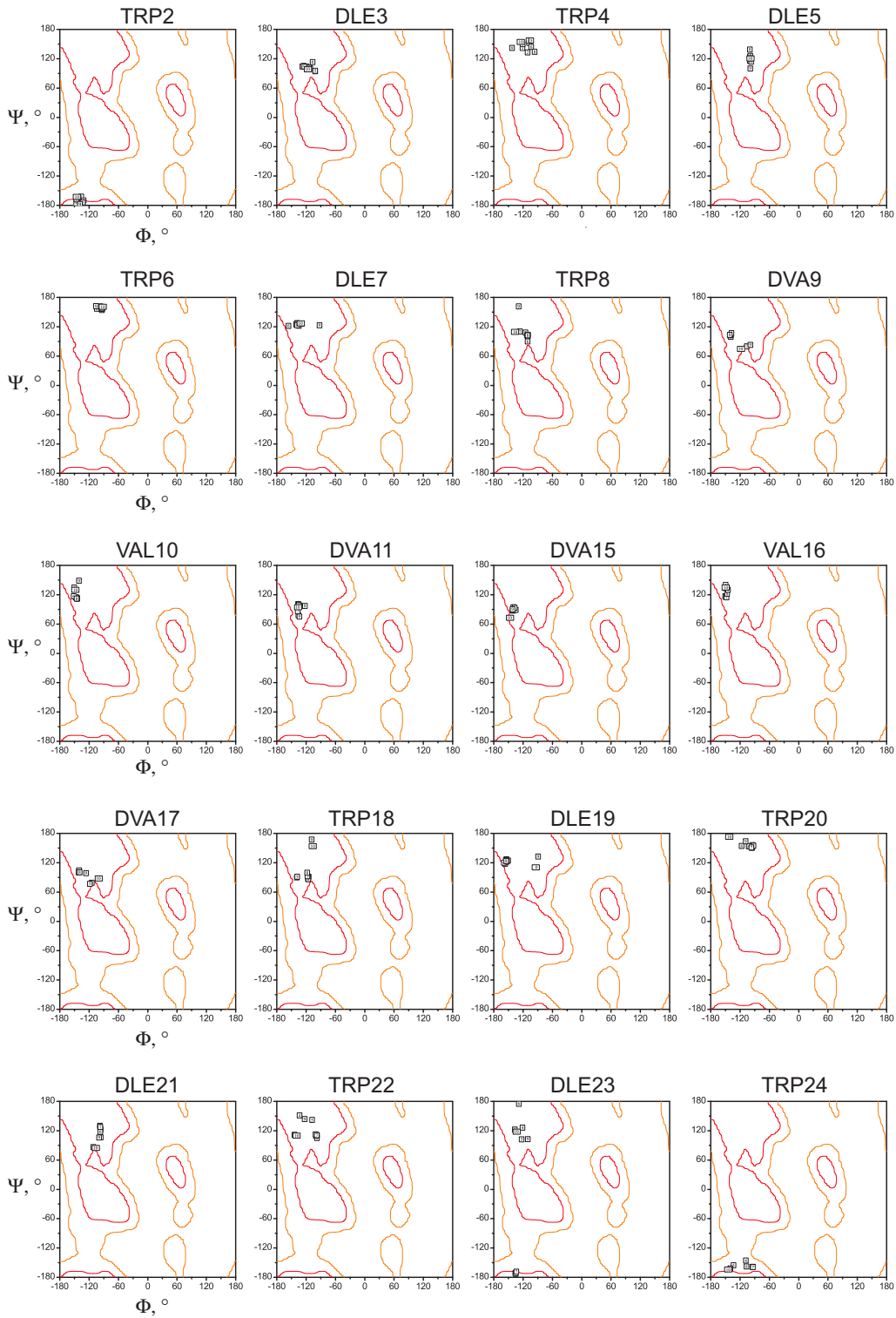


Abbildung 3.26: Ramachandran-Plots der einzelnen Aminosäuren des Minigramicidins in gesättigter Cäsiumchlorid- $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-d}_3$ (3:1, v/v)-Lösung. Die Koordinaten der Winkel der D-Aminosäuren wurden einer Punktspiegelung im Koordinatenursprung unterzogen. Die wirklichen Werte erhält man, indem man das Vorzeichen wechselt.

In Abbildung 3.27 ist die Verteilung des Seitenkettenwinkel χ_1 der zehn energetisch günstigsten Strukturen von Minigramicidin in gesättigter Cäsiumchlorid- $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_3$ (3:1, v/v)-Lösung gezeigt. Man erkennt die erhöhte Variabilität der Seitenketten, die auch für die schlechteren *rmsd*-Werte verantwortlich ist.

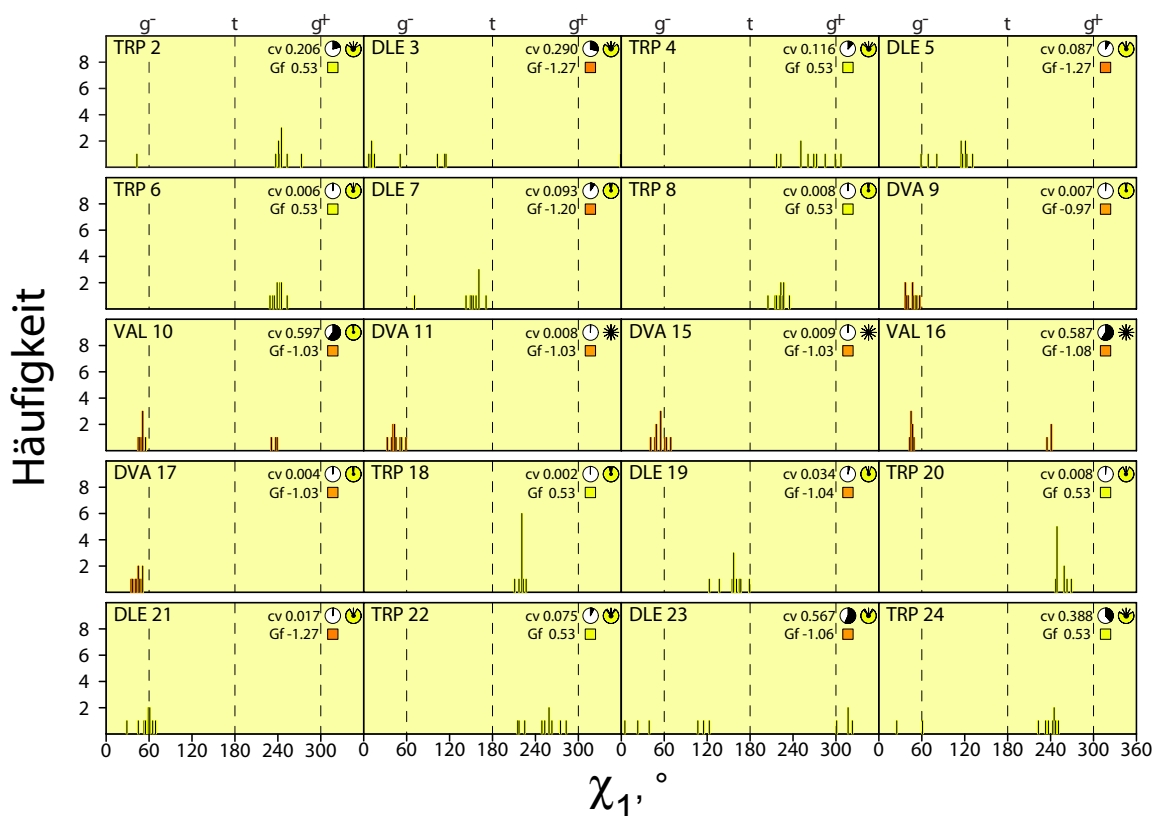


Abbildung 3.27: Verteilung des Seitenkettenwinkel χ_1 der zehn energetisch günstigsten Strukturen des Minigramicidins in gesättigter Cäsiumchlorid- $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_3$ (3:1, v/v)-Lösung.

Durch Zusatz von Cäsiumkationen zu Minigramicidin in Chloroform/Methanol-Lösung findet eine starke konformationelle Änderung der Struktur von einem linksgängigen parallel orientierten Dimer ($\uparrow\uparrow \pi\pi_{LD}^{5,7}$) zu einem rechtsgängigen Monomer des Minigramicidins statt. Diese Umwandlung konnte von Dr. Hans-Dieter Arndt durch eine NMR-Titration von Minigramicidin in Chloroform/Methanol (1:1, v/v) mit Cäsiumkationen direkt verfolgt werden. Die NMR-Signale am Ende der Titration entsprachen dabei denen in gesättigter Cäsiumchlorid- $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_3$ (3:1, v/v)-Lösung [307].

Die durch NMR-Strukturaufklärung ermittelte Monomerstruktur von Minigramicidin in gesättigter Cäsiumchlorid- $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_3$ (3:1, v/v)-Lösung ist die erste, bei der die bekannte kanalaktive Konformation von gA auch in organischen Lösemitteln

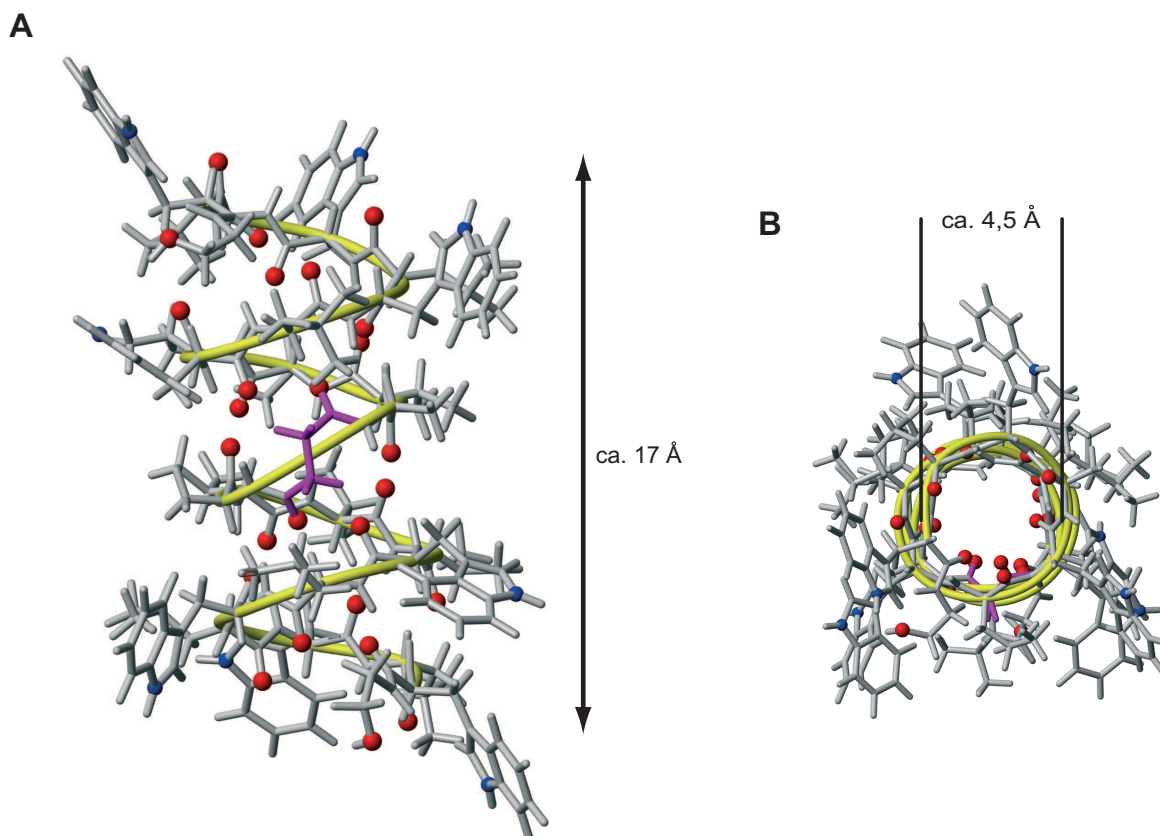


Abbildung 3.28: Gemittelte Struktur des Minigramicidin-Dimers in gesättigter Cäsiumchlorid- $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_3$ (3:1, v/v)-Lösung. **A** Seitenansicht mit Angabe der Länge von ca. 17 Å, **B** Draufsicht mit Angabe des Durchmessers von ca. 4,5 Å.

eingenommen wird. Man kann die Monomerstruktur als eine rechtsgängige π -Helix mit ca. 6,3 Resten pro Windung beschreiben. Die ungefähre Länge beträgt 17 Å und der Durchmesser von ca. 4,5 Å ist ausreichend, um einwertige Kationen zu komplexieren. Die Länge erklärt auch die gute Korrelation der Leitfähigkeiten und Offenzeiten für Minigramicidin in DMPC-Doppelschichten.

3.6 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die erfolgreiche NMR-spektroskopische Strukturaufklärung des künstlichen Ionenkanals Minigramicidin in verschiedenen Umgebungen beschrieben.

Die von Dr. Hans-Dieter Arndt im Arbeitskreis von Prof. Koert synthetisierte Verbindung stellt ein um vier Aminosäuren verkürztes und über einen Succinat-Linker in Kopf-an-Kopf Anordnung verbundenes Gramicidin A Dimer dar. Minigramicidin ist in Lipiddoppelschichten ein funktionaler Ionenkanal und zeigt in organischen Lösemitteln verschiedene Konformation und Aggregationszustände. Zugabe von einwertigen Kationen bewirkt eine starke Konformationsänderung von Minigramicidin.

Es wurden zwei Minigramicidinstrukturen aufgeklärt: in Benzol/Aceton (10:1, v/v) ohne Zusatz von Kationen und in gesättigter Cäsiumchlorid-Chloroform/Methanol (3:1, v/v)-Lösung. Im ersten Fall findet man ein doppelt helikales linksgängiges Dimer von Minigramicidin mit ca. 5.7 Resten pro Windung. Diese Struktur hat eine Länge von ca. 38 Å und einen Durchmesser von ca. 1.2 Å. Das Dimer kann nicht die kanalaktive Form sein, wie auch ein Vergleich mit den CD-Spektren zeigt [308], da die Abmessung keine Ioneneinlagerung bzw. Einpassung in eine Membran zulassen.

Der Komplex mit Cäsiumkationen zeigt hingegen eine große Ähnlichkeit mit den in membranähnlicher Umgebung gefundenen, kanalaktiven Konformationen von Gramicidin A. Das Monomer liegt als eine rechtsgängige π -Helix mit ca. 6.3 Resten pro Windung vor. Die Abmessung von 17 Å Länge erklärt die Abhängigkeit der Leitfähigkeit des Kanals von der Membrandicke. Mit einem Durchmesser von ca. 4.5 Å ist die monomere Struktur zur Komplexierung einwertiger Kationen durch die Sauerstoffatome der Carbonylgruppen im Innern der Kanals gut geeignet. Es konnte somit zum ersten Mal eine zu der ionenkanalaktiven Form von gA vergleichbare Konformation eines künstlichen Ionenkanals in organischen Lösemitteln nachgewiesen werden.

4 Konformationen eines molekularen Schalters

4.1 Einführung

Im Zuge der weiteren Miniaturisierung und des besseren Verständnisses der molekularen Grundlagen des Lebens ist die Entwicklung von künstlichen molekularen Maschinen machbar geworden. Die Nanotechnologie ist hier dabei, Methoden zur Produktion von molekularen Maschinen im „industriellen“ Maßstab zu ermöglichen. Hierbei ist die Chemie in besonderem Maße gefordert, mit Hilfe von ausgefeilten Synthesen die Bausteine für molekulare Maschinen zu liefern. Der „bottom up“ Ansatz [343] ermöglicht die gezielte Synthese der einzelnen Bauteile wie Drehkreuze und Rotoren [344–346]. Auch die Herstellung ganzer molekularer Motoren konnte synthetisch bewältigt werden [347]. Neben den Maschinen sind aber auch zu Steuerung Schalter und andere Regelemente sehr wichtig. Es konnten bisher viele verschiedene molekulare Schalter realisiert werden [348].

In diesem Abschnitt wird die Bestimmung der Konformation der zentralen Schalteinheit eines neuartigen, gekoppelten molekularen Schalters beschrieben, der von Dr. Michael Karle aus dem Arbeitskreis von Prof. Koert an der Philipps-Universität in Marburg hergestellt wurde [349, 350].

4.2 Beispiele molekularer Schalter

Die künstlich hergestellten molekularen Schalter sollten für ihre eindeutige Funktion folgende Vorgaben erfüllen:

- Das System muß mindestens zwei stabile unterscheidbare Zustände einnehmen (Ein/Aus).
- Diese zwei Zustände müssen reversibel ineinander überführbar sein, z.B. durch Änderung des pH-Wertes, photochemische Anregung.
- Der Zustand des Schalters muß von außen detektierbar sein, d.h. die Schalterstellung könnte z.B. durch Änderung seiner Farbe sichtbar werden.

Im folgenden werden verschiedene Konzepte zur Konstruktion molekularer Schalter vorgestellt. So wurden Systeme synthetisiert und untersucht, die intramolekularen Elektronentransfer ausnutzen [352–354], schaltbare allosterische Rezeptoren [355–357]

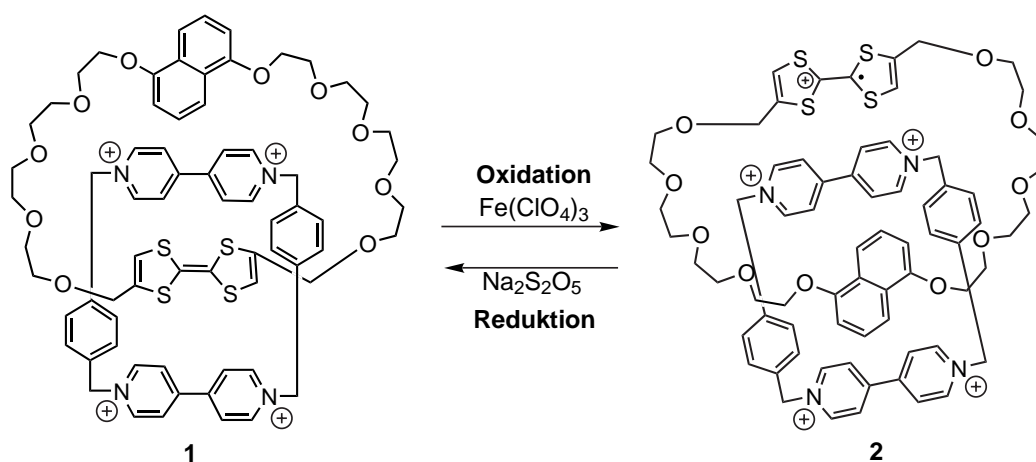


Abbildung 4.1: Redoxaktives schaltbares Catenan [351].

aufweisen, schaltbare Redox-Systeme beinhalten, sowie verschiedene Photoschalter und Schalter auf Catenan-Basis .

Catenane (*catena*=Kette) sind topologisch interessante Verbindungen [358] und können als Schalter verwendet werden. Die Schaltung beruht dabei auf der unterschiedlichen Anordnung der beiden Kettenglieder zueinander. Diese wird gesteuert durch H-Brückenbildung, π -Donor-Akzeptor-Wechselwirkung, Komplexbildung oder sterische Wechselwirkungen. Balzani et al. [351] konnten ein schaltbares Catenan herstellen, dessen Anordnung durch die Wechselwirkung zwischen π -elektronenarmen und π -elektronenreichen Erkennungsstellen bestimmt wird (Abb. 4.1).

Im reduzierten Zustand befindet sich das elektronenreiche Tetrathiofulven im Hohlraum des elektronenarmen Cyclophanrings. Das Absorptionsspektrum zeigt daher eine Bande bei 850 nm, die durch eine *charge transfer*-Wechselwirkung zwischen den Tetrathiofulven- und Bipyridinium-Einheiten entsteht. Wird **1** mit einem Äquivalent $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ zum Radikalkation oxidiert, rotiert der Polyetherzyklus aufgrund der elektrostatischen Abstoßung in das Translationsisomer **2** und die Absorption bei 850 nm verschwindet. Den ursprünglichen Zustand **1** stellt man durch Reduktion von **2** mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ wieder her. Die Rotation des Polyethers wird auch durch Zugabe von Tetrachloro-*o*-benzoquinon induziert.

Der Sehvorgang ist ein photochemisch induzierter Schaltvorgang [360]. Rhodopsin isomerisiert bei Bestrahlung von der *cis*- in die *trans*-Konfiguration innerhalb von Pi-

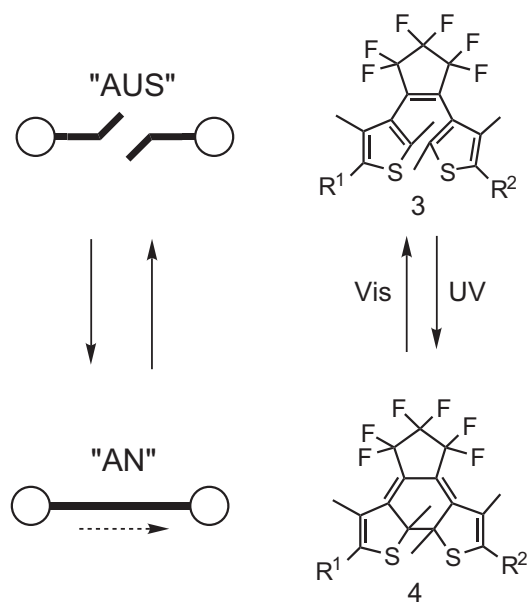


Abbildung 4.2: Diarylethene als Schalter zur Verknüpfung molekularer Drähte [359].

cosekunden. Dieser Schaltvorgang löst einen Nervenimpuls aus, der die Signale zur weiteren Verarbeitung in das Gehirn leitet.

Photochemische Reaktionen haben den Vorteil, daß sie oft ohne Nebenreaktion ablaufen und eine hohe Zahl von Schaltzyklen durchlaufen können. Für die Konstruktion künstlicher molekularer Schalter werden oft photochrome Moleküle verwendet, die zwei reversibel ineinander überführbare Isomere zeigen und deren Absorptionsspektren zwei unterschiedliche Maxima aufweisen. Daneben können sich die Isomere auch in ihren Strukturen, Redoxpotentialen, Brechungsindizes oder Drehwerten unterscheiden. Auf Basis von Diarylethenen konnten verschiedene Arten von Schaltern synthetisiert werden [361–366]. Die photochemischen Isomere der Diarylethene sind thermisch stabil und können daher auch in einem breiteren Anwendungsbereich eingesetzt werden. So können substituierte Diarylethene zum Aufbau schaltbarer molekularer Drähte genutzt werden [359] (Abb. 4.2).

Bestrahlt man **3** mit UV-Licht, bildet sich die geschlossene Form **4**, der molekulare Draht wird leitfähig. Bei Bestrahlung von **4** mit sichtbarem Licht öffnet sich der Schalter wieder zu **3**.

4.3 Bikonformationelle Schalter

Die Arbeitsgruppe von Prof. Koert an der Philipps-Universität Marburg ist seit vielen Jahren in Entwurf und der Synthese von molekularen Schaltern erfahren. Auf Basis von substituierten *cis*-Dekalinen, *cis-anti-cis*-Perhydroanthracenen und von Cyclohexanen [367–370] wurden verschiedene Schalter synthetisiert. Hierbei werden die durch die Substituenten definierten Konformationen als Schalterzustände genutzt. Entscheidend

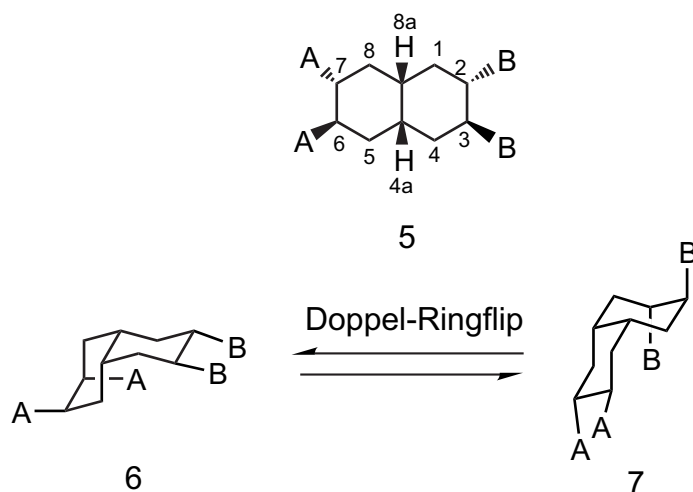


Abbildung 4.3: Substitutionsmuster tetrafunktionalisierter *cis*-Dekaline **5** und die beiden durch einen Doppelringflip ineinander überführbaren Konformationen **6** und **7**, die als Schalterzustände dienen könnten [367, 368].

für stabile Zustände zwischen denen hin- und hergeschaltet werden kann ist der Energieunterschied zwischen ihnen. Liegt die Energiebarriere des Ringflips für Cyclohexan bei 45.2 kJ/mol [371, 372], steigt sie im Falle des Dekalins auf 52.0 kJ/mol an [373]. Durch die Verwendung von tetrasubstituierten *cis*-Dekalinen (Abb. 4.3) kann der Energieunterschied zwischen den beiden Konformeren je nach Substitutionsmuster erhöht werden, um so zwei Schaltungszustände zu definieren.

Die Substituenten **A** dienen als Rezeptoren für einen geeigneten Reiz, der dann zu einer Konformationsänderung des *cis*-Dekalins mit entsprechender Änderung der Stellung der Effektoren **B** führt. Diese Änderung kann dann von außen ausgelesen werden (an/aus) (Abb. 4.3). Für die Realisierung eines derartigen Schalters muß der Grundzustand des System wohldefiniert sein, d.h. zu mindestens 95 % besetzt sein. Genauso sollte nach dem Schalten die Endposition zu 95 % populiert sein. In der Arbeitsgruppe

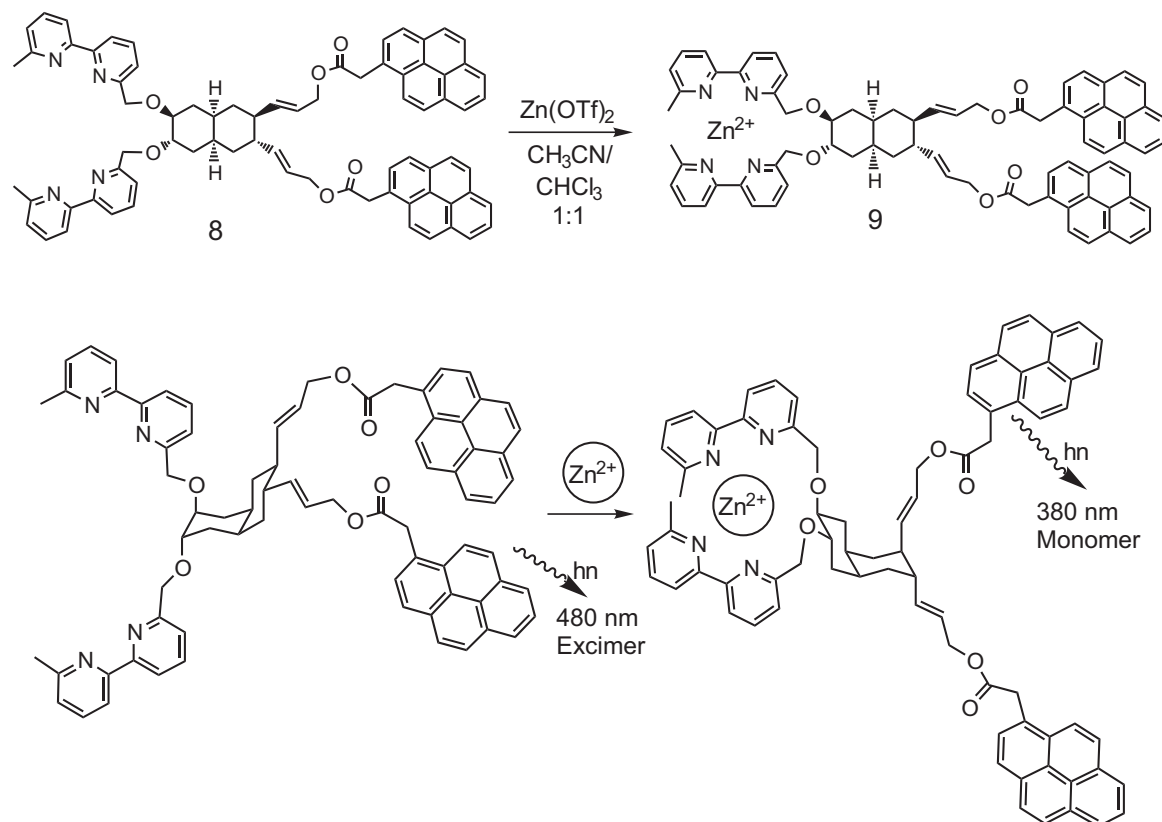


Abbildung 4.4: Beispiel tetrafunktionalisierter *cis*-Dekaline als molekulare Schalter. Durch Bindung der Zn^{2+} -Kationen der 6,7-Bipyridinliganden in **8** ändert sich die Konformation zu **9**. Die 2,3-Pyrenessigsäure-Effektoren stehen in *trans*-Stellung zueinander und das vorher bei $\lambda = 480\text{ nm}$ absorbierende Excimer wird zerstört und die beiden Monomere absorbieren nun bei $\lambda = 380\text{ nm}$ [367–370].

von Prof. Koert wurde der Schalter **8** erfolgreich synthetisiert und über nicht-kovalente Wechselwirkungen geschaltet (Abb. 4.4) [367–370].

Im Molekül wirken die Bipyridin-Liganden in 6,7-Stellung als Chelatbildner von Zinkkationen. Die Effektoren in 2,3-Stellung bilden ein Excimer im Grundzustand des molekularen Schalters. Bei Zugabe von Zinkkationen gehen die Bipyridinliganden in *cis*-Stellung zueinander und induzieren so einen Doppelringflip, der auf der anderen Seite des Dekalins das Excimer aufbricht und die Pyrenessigsäure in *trans*-Stellung bringt. Die Absorption entspricht nun der eines Monomers. Der ganze Schaltvorgang kann reversibel durch Entzug der Kationen gestaltet werden.

4.4 Kopplung bikonformationeller Schalter

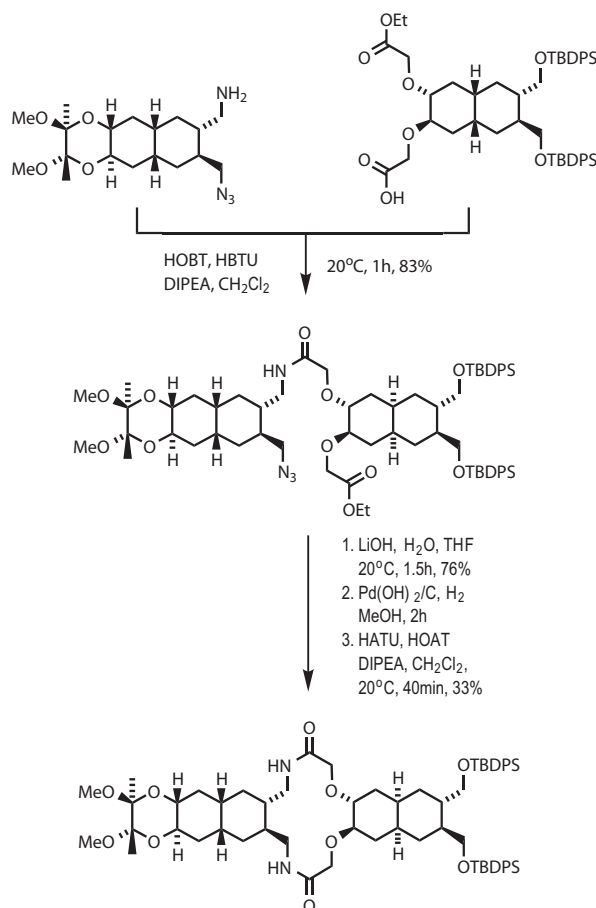


Abbildung 4.5: Synthese des molekularen Schalters durch Verknüpfung von zwei *cis*-Dekalinen [349, 350].

Die bisher in der Arbeitsgruppe von Prof. Koert beschriebenen molekularen Schalter auf Basis von tetrasubstituierten *cis*-Dekalinen können nur relativ kurze Schaltdistanzen von der Länge des *cis*-Dekalins überbrücken. Um auch längere Schaltdistanzen, z.B. durch eine Zellmembran hindurch, zu ermöglichen, können zwei oder mehr *cis*-Dekalinen miteinander verbunden werden. Hierbei müssen die Dekaline in konformationell eindeutiger Weise miteinander verknüpft werden, damit der Schaltzustand eindeutig definiert ist. Löst man den Schalter aus, muß zudem sichergestellt sein, daß die Konformationsänderung über die Linker zum nächsten *cis*-Dekalin eindeutig und definiert weitergegeben wird, so daß man nur zwei Zustände des gekoppelten Systems findet (an/aus).

Dr. Michael Karle aus der Arbeitsgruppe von Prof. Koert konnte in seiner Doktorarbeit erstmals einen derart gekoppelten molekularen Schalter durch Verknüpfung von zwei *cis*-Dekalinen über ein 14-gliedriges Bislactam herstellen (Abb. 4.5 auf der vorherigen Seite) [349, 350].

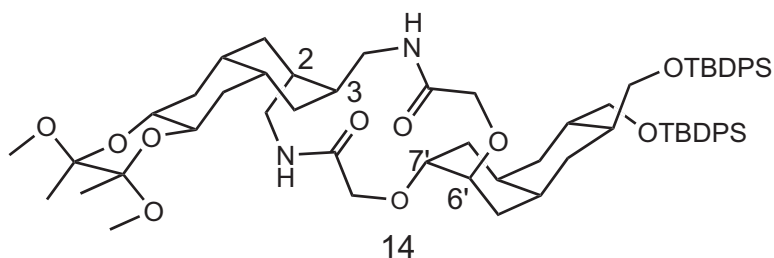


Abbildung 4.6: Zielkonformation des molekularen Schalters **13** im Grundzustand vor dem Schalten. Die *all*-axial Stellung des Linker-Makrozyklus wird durch das zyklische Ley-Acetal im linken Dekalingerüst erzwungen.

Hierbei ist der linke Dekalinteil durch ein zyklisches Acetal (Ley et al. [374]) in einer energetisch höher liegenden Konformation mit einer *all*-axial-Stellung der Positionen 2,3 fixiert. Im rechten Dekalinteil befinden sich die sterisch anspruchsvollen *tert*-Butyldiphenylsilyl Gruppen in ihrer Vorzugskonformation (Abb. 4.6). Der die Dekaline verbindende Makrozyklus zeigt eine *all*-axial-Stellung an den Dekalinpositionen. Durch Spaltung des Ley-Acetals unter sauren Bedingungen sollte der Schaltvorgang ausgelöst werden.

4.5 Aufgabenstellung

Um die Eignung von Linker-verknüpften *cis*-Dekalinen als molekulare Schalter zu überprüfen, sollten die Konformationen des molekularen Schalters **13** vor und nach dem Schaltvorgang mit NMR-spektroskopischen Methoden bestimmt werden. Hierbei wird der Schaltvorgang irreversibel ausgelöst. Die nach der Spaltung des Acetals freien OH-Gruppen wurden zur besseren Separierung der Protonen in Position 6 und 7 acetyliert (Abb. 4.7).

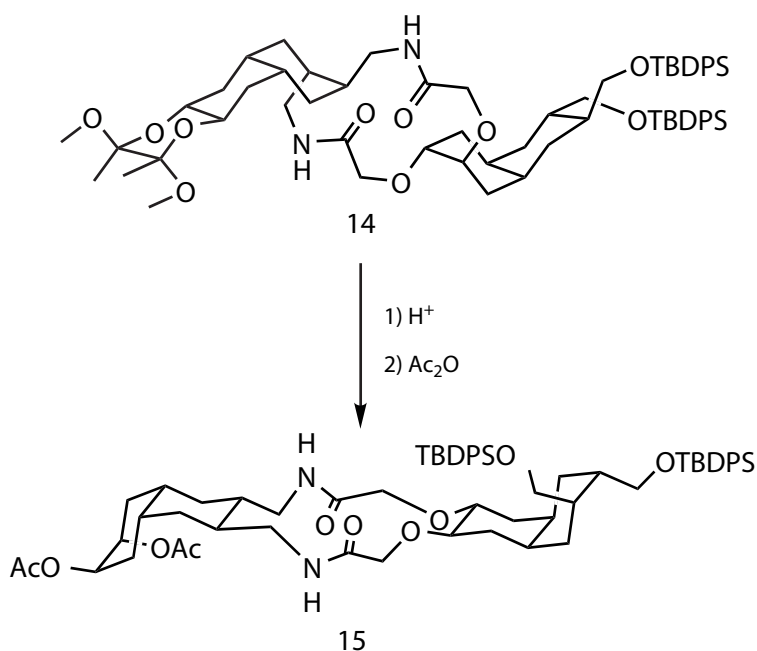


Abbildung 4.7: Auslösung des Schaltvorganges durch Entschützen der Verbindung **13**. Die freien OH-Gruppen werden als Ethylester geschützt. Gezeigt sind die Zielkonformationen **14** vor bzw. **15** nach dem Schaltvorgang. Übernommen aus [350].

4.6 Konformation vor dem Schalten

Mithilfe von homonuklearen zweidimensionalen Experimenten in CDCl_3 wurde die Ausgangskonformation des molekularen Schalters **13** untersucht (Abb. 4.8). Die Messungen wurden mit einer ca. 10 mM Lösung bei 293 K bei Feldstärken von 600 und

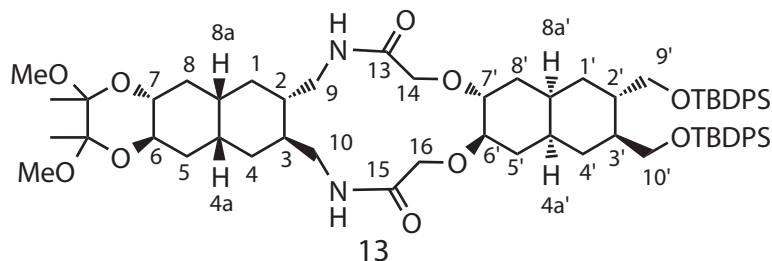


Abbildung 4.8: Strukturformel des molekularen Schalters **13** vor dem Schalten. Übernommen aus [350].

800 MHz durchgeführt. Die Verbindung lag nur in einer einzigen Konformation vor. Die Zuordnung erfolgte aus DQF-COSY, TOCSY- und ROESY [375–377]-Spektren und wurde von Dr. Michael Karle im Arbeitskreis von Prof. Koert durchgeführt. Um die Konformation der Dekalineinheiten bestimmen zu können, war die Bestimmung der Kopplungskonstanten der Protonen nötig.

Eine erste Analyse der vorliegenden Spektren ergab ein in den wichtigen Teilen überlagertes eindimensionales Protonenspektrum, aus dem nur wenige Kopplungskonstanten für die Dekalinringe gewonnen werden konnten (Abb. 4.9 auf der nächsten Seite).

Insbesondere die Signale der Protonen in 6,7 und 6',7' sind zum Teil überlagert. Einzig das Signal von 6' ist gut separiert und läßt die Auswertung zu. Die enthaltenen Kopplungen liegen im Bereich von ca. 4-5 Hz und entsprechen somit den Werten, die man für ein äquatoriales Proton erwartet.

Für eine detailliertere Analyse der Kopplungskonstanten in den Dekalinen wurde ein hochaufgelöstes DQF-COSY-Spektrum bei 800 MHz aufgenommen. Abbildung 4.10 auf Seite 154 zeigt das Kreuzsignal zwischen den beiden Protonen 6 und 7 der rechten Dekalineinheit von **13**. Die Auswertung ergibt eine große aktive Kopplung von 9.2 Hz zwischen den beiden Protonen sowie zwei passive Kopplungen von 11.9 und 5.1 Hz. Die Protonen stehen diaxial in *trans*-Stellung zueinander, zusätzlich stehen die Protonen

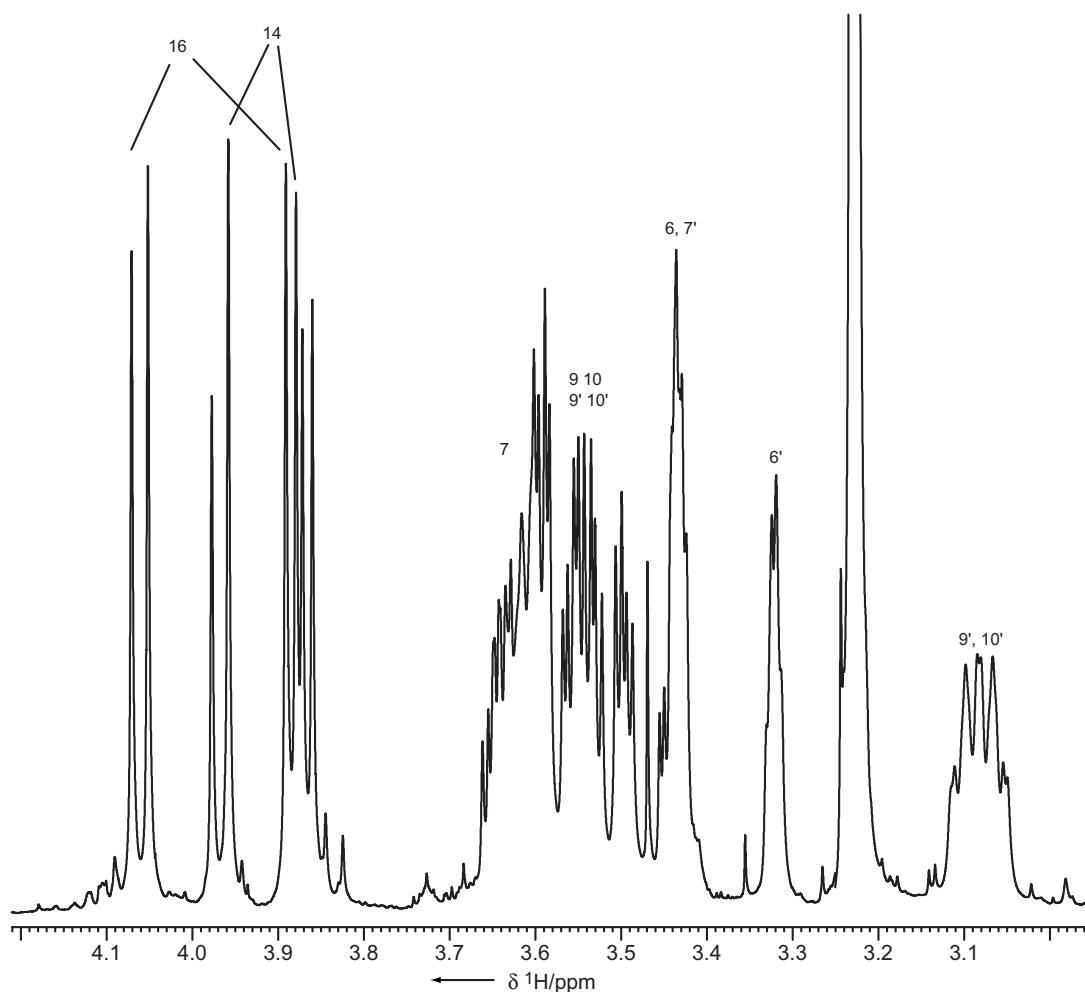


Abbildung 4.9: Ausschnitt aus dem ^1H -Spektrum des molekularen Schalters **13** bei 293 K (800 MHz, CDCl_3 , 10 mM). Nur das Signal von Proton $6'$ ist ausreichend aufgelöst.

7 und 8 ebenfalls diaxial, während das zweite Paar 7 und 8 eine *gauche*-Stellung einnimmt. Es konnten noch weitere Kopplungskonstanten bestimmt werden (Tab. 4.1 auf Seite 155) Aus den gemessenen Werten konnten mit Hilfe einer vereinfachten Karplus-Gleichung (4.1) für Sechsringe [378] angenäherte Werte für die Dihedralwinkel in den Dekalinen berechnet werden. Für die Konstante K wurden folgende, empirisch ermittelte Werte eingesetzt: $K_{a-a} = 12.5$ Hz, $K_{a-e} = K_{e-a} = 15.3$ Hz und $K_{e-e} = 12.0$ Hz

$${}^3J = K \cdot \cos^2\phi \quad (4.1)$$

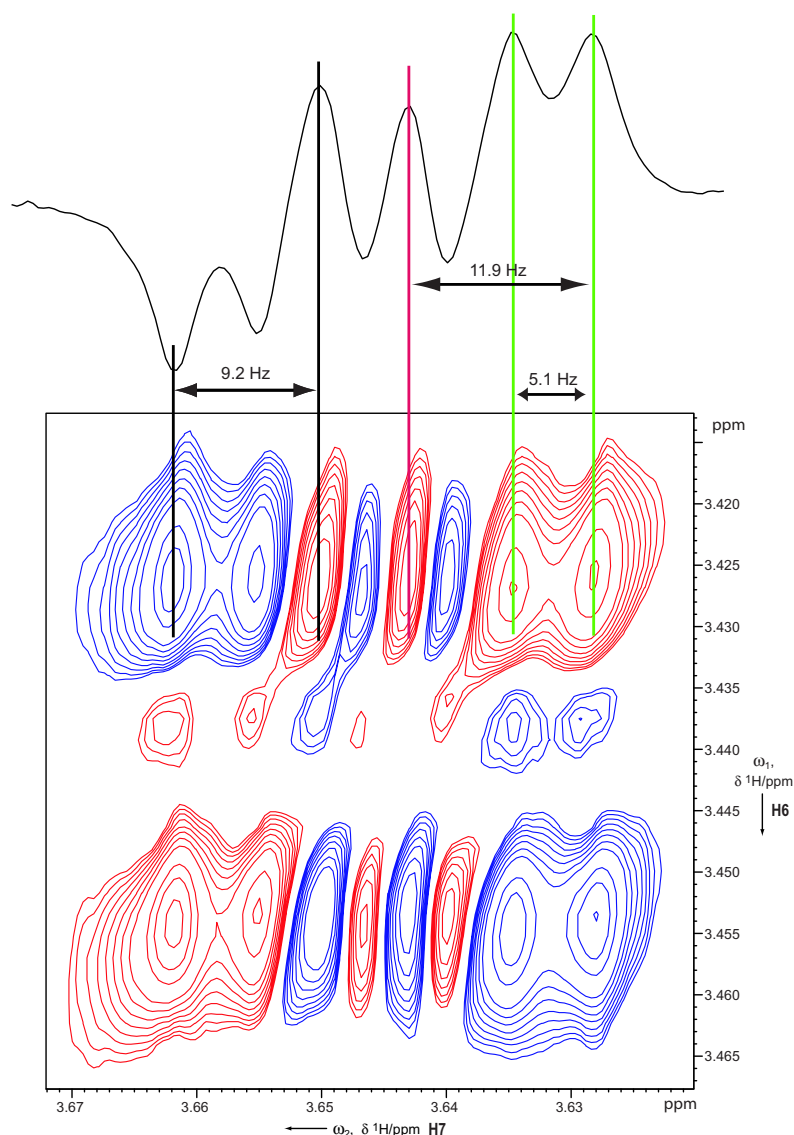


Abbildung 4.10: DQF-COSY-Kreuzsignal der Protonen 6 und 7 aus der rechten Dekalin-einheit von **13** (800 MHz, CDCl_3 , 293 K).

Aufgrund der unterschiedlichen Elektronegativität der Substituenten sind die Kopplungskonstanten im Vergleich zum unsubstituierten Cyclohexan etwas erniedrigt.

Aus dem ROESY-Spektrum mit 300 ms Mischzeit (Abb. 4.11 auf Seite 156) ließen sich für die Dekalinteile von **13** charakteristische Kreuzsignale zuordnen. Es wurden insgesamt 21 ROEs mit Abständen von 1.8–2.5 Å für die Dekaline in **13** zugeordnet (Abb. 4.12 auf Seite 157) und zur Strukturrechnung verwendet. Aufgrund von Schwierigkeiten mit dem Protokoll zur Molekulardynamik (*molecular dynamics, MD*)-

Kreuzsignal	$^3J[\text{Hz}]$	Dihedral-Winkel
7, 8 axial	11.9	167 °
7, 8 äquatorial	5.1	53 °
7,6	9.2	151 °
6,5 axial	11.6	164 °
3, 4 äquatorial	5.8	50 °
6', 7'	5.6	52 °
2', 3'	10.1	154 °

Tabelle 4.1: Aus dem DQF-COSY-Spektrum erhaltene Kopplungen und die daraus resultierenden Dihedralwinkel für die Konformation von **13**.

Rechnung wurden die berechneten Dihedralwinkel nicht in den Rechnungen berücksichtigt.

Es wurden jeweils 100 Strukturen mit dem Programm InsightII/Discover, Version 2000.1/2 (Accelrys Incl., San Diego, CA) unter Nutzung des *cvff*-Kraftfeldes (*common valence force field*, *cvff*) im Vakuum berechnet. Es wurden die zehn energetisch günstigsten Strukturen weiter analysiert. Tabelle 4.2 gibt einen Überblick über die Energien und die wichtigsten Dihedralwinkel von **13**.

Struktur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Energie [kcal/mol]	143.7	145.0	145.3	145.7	145.7	147.2	147.6	148.2	148.5	148.5
Dihedralwinkel [°]										
H2-C2-C3-H3	77.6	76.6	77.3	79.5	77.6	82.5	78.8	77.6	76.7	76.7
H6-C6-C7-H7	177.0	176.9	176.9	176.9	177.0	177.2	176.7	177.0	176.5	177.0
H2'-C2'-C3'-H3'	178.5	179.6	179.5	177.9	178.8	178.8	176.9	177.9	174.1	178.7
H6'-C6'-C7'-H7'	72.4	76.1	74.3	76.8	74.1	74.1	70.1	74.0	71.2	73.2

Tabelle 4.2: Tabelle der Energien und wichtigen Dihedralwinkel von **13**.

Die Rechnungen bestätigen die *all*-axial Stellung des Makrozyklus bezüglich der Dekaline. Wie in Abbildung 4.13 auf Seite 157 gezeigt, überlagern die Dekalingerüste der zehn energetisch günstigsten Strukturen sehr gut. Auffällig sind die relativ großen Abweichungen des Dihedralwinkels zwischen den Protonen 2 und 3 im linken Dekalingerüst mit 77–82 ° vom Idealfall mit 60 °. Dies läßt sich durch repulsive Wechselwirkungen von H9 des Makrozyklus mit H8-axial bzw. H10 des Makrozyklus mit H1-axial und H4a des Dekalingerüsts erklären.

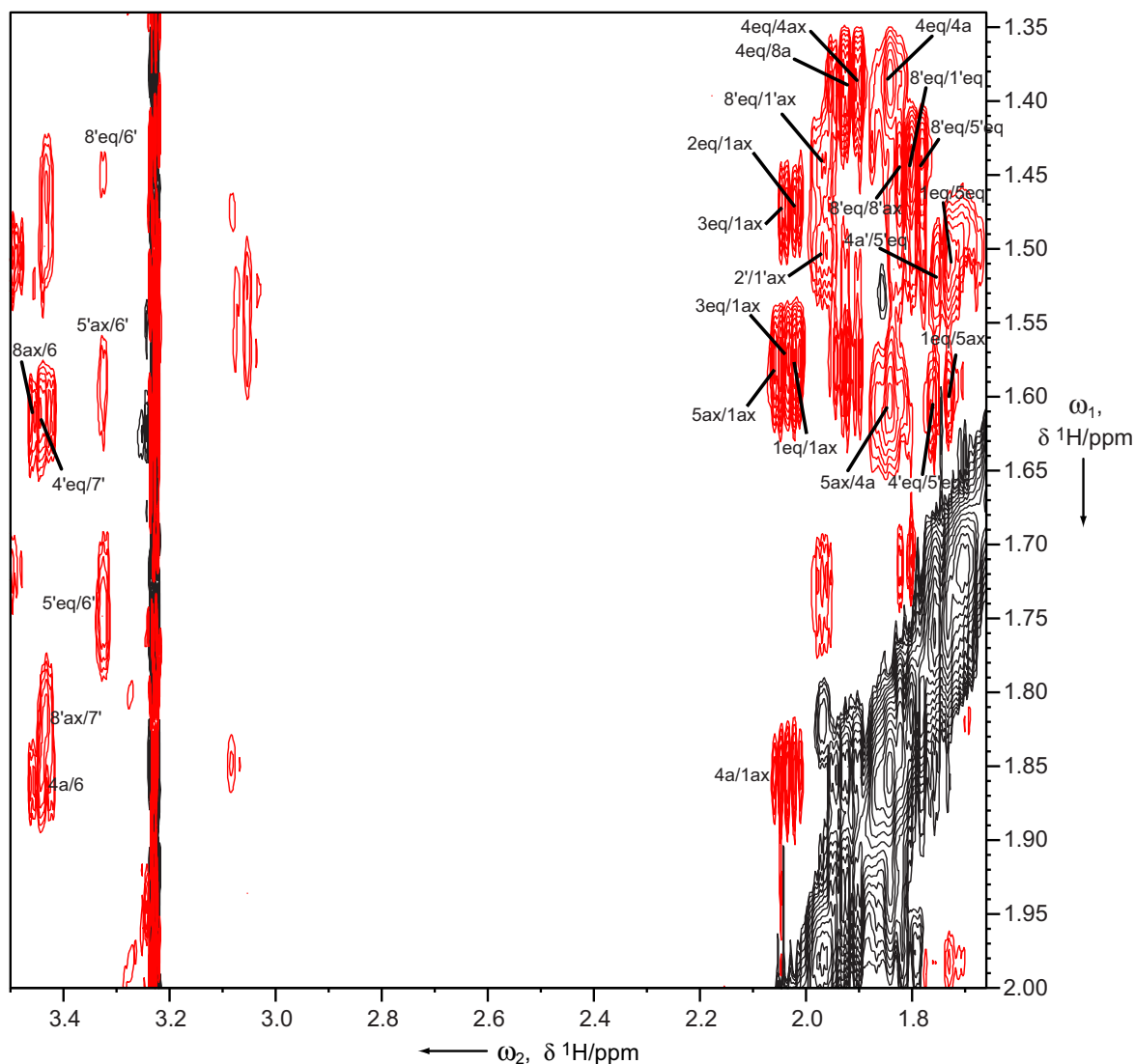


Abbildung 4.11: Ausschnitt aus dem 300 ms ROESY von **13**. Gezeigt sind ROEs aus den Dekalinen der Verbindung (600 MHz, 293K, 10 mM).

Für die Konformation des 14-gliedrigen Bis lactamringes konnten keine konsistenten Ergebnisse aus den Rechnungen erhalten werden. ROEs für den Makrozyklus führten zum Abbruch des *MD*-Protokolls während der Rechnung. Wahrscheinlich ist die konformative Beweglichkeit des Ringes zu groß, so daß die gemessenen ROE-Signale nur eine Mittelung darstellen, die keiner Konformation fest zu geordnet werden kann.

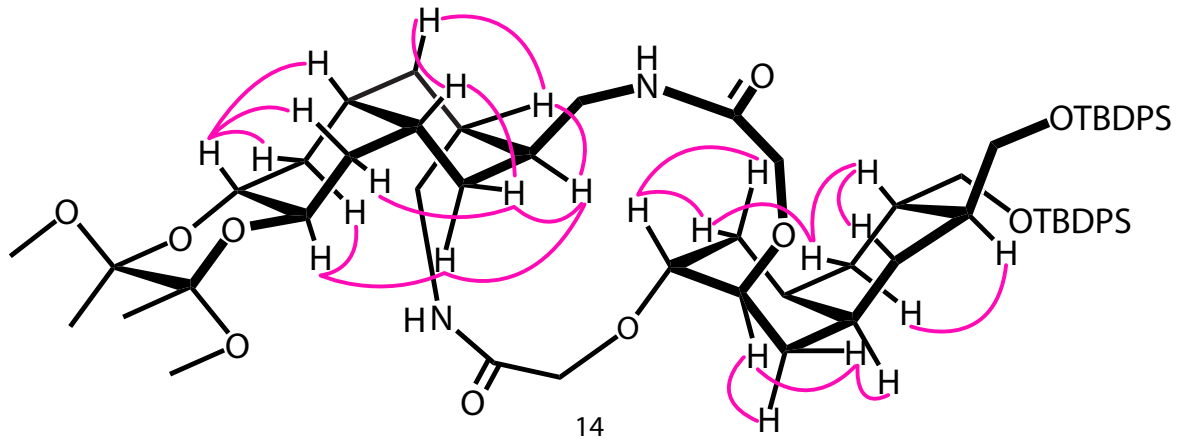


Abbildung 4.12: In der Strukturrechnung von **13** verwendete ROE-Kontakte für die Dekalinteile. Gezeigt ist die Zielkonformation **14** der Verbindung **13**.

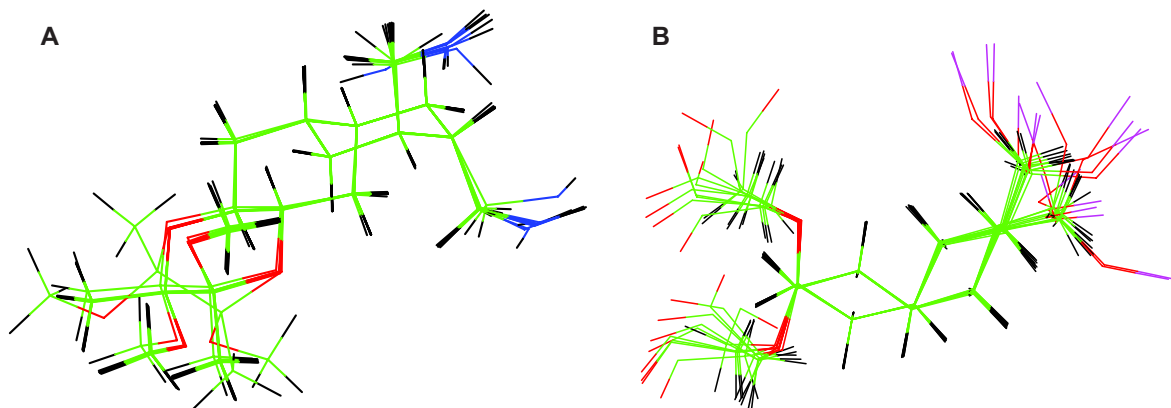


Abbildung 4.13: Überlagerung des linken (**A**) und rechten Dekalingerüstes (**B**) der zehn energetisch günstigsten Strukturen von **13**. Man erkennt die axiale Stellung des Makrozyklus an den Dekalingerüsten.

4.7 Konformation nach dem Schalten

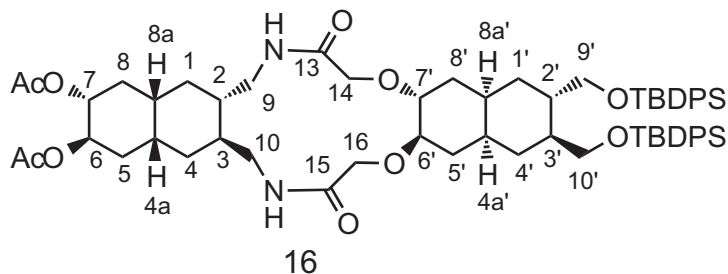


Abbildung 4.14: Strukturformel von Verbindung **16** nach dem Öffnen des Ley-Acetals und anschließende Acetylierung der OH-Gruppen. Dies entspricht einem irreversiblen Schaltvorgang.

Nach dem Öffnen der konformativen Klammer durch saure Spaltung des Ley-Acetals am linken Dekalin von **13** erhält man nach Acetylierung der entstandenen OH-Gruppen Verbindung **16** (Abb. 4.14). Diese Struktur entspricht dem molekularen Schalter nach dem irreversiblen Schaltvorgang.

Das eindimensionale Protonenspektrum von **16** zeigt für die Protonen 6,7 bzw. 6',7' den entgegengesetzten Fall von **13**. 6,7 zeigen nur eine geringe Aufspaltung, während 6',7' ein kompliziertes Kopplungsmuster mit großen Kopplungen aufweisen (Abb. 4.15 auf der nächsten Seite). Es konnten drei Kopplungskonstanten aus den Spektren gewonnen werden (Tab. 4.3).

Kreuzsignal	$^3J[\text{Hz}]$	Dihedral-Winkel
6,7	4-5	60 °
6', 7'	10.5	180 °
2, 3	10.2	180 °

Tabelle 4.3: Kopplungskonstanten für **16**. Die daraus resultierenden Dihedralwinkel wurden aus der vereinfachten Karplus-Beziehung abgeschätzt.

Aus dem ROESY-Spektrum mit 400 ms Mischzeit konnten insgesamt 12 ROEs für die Dekalingerüste von **16** zugeordnet werden (Abb. 4.16 auf Seite 160).

Für die Strukturrechnung von **16** wurden 12 ROEs und die drei aus den Kopplungskonstanten berechneten Dihedralwinkel für die Dekalingerüste verwendet. Es wurden

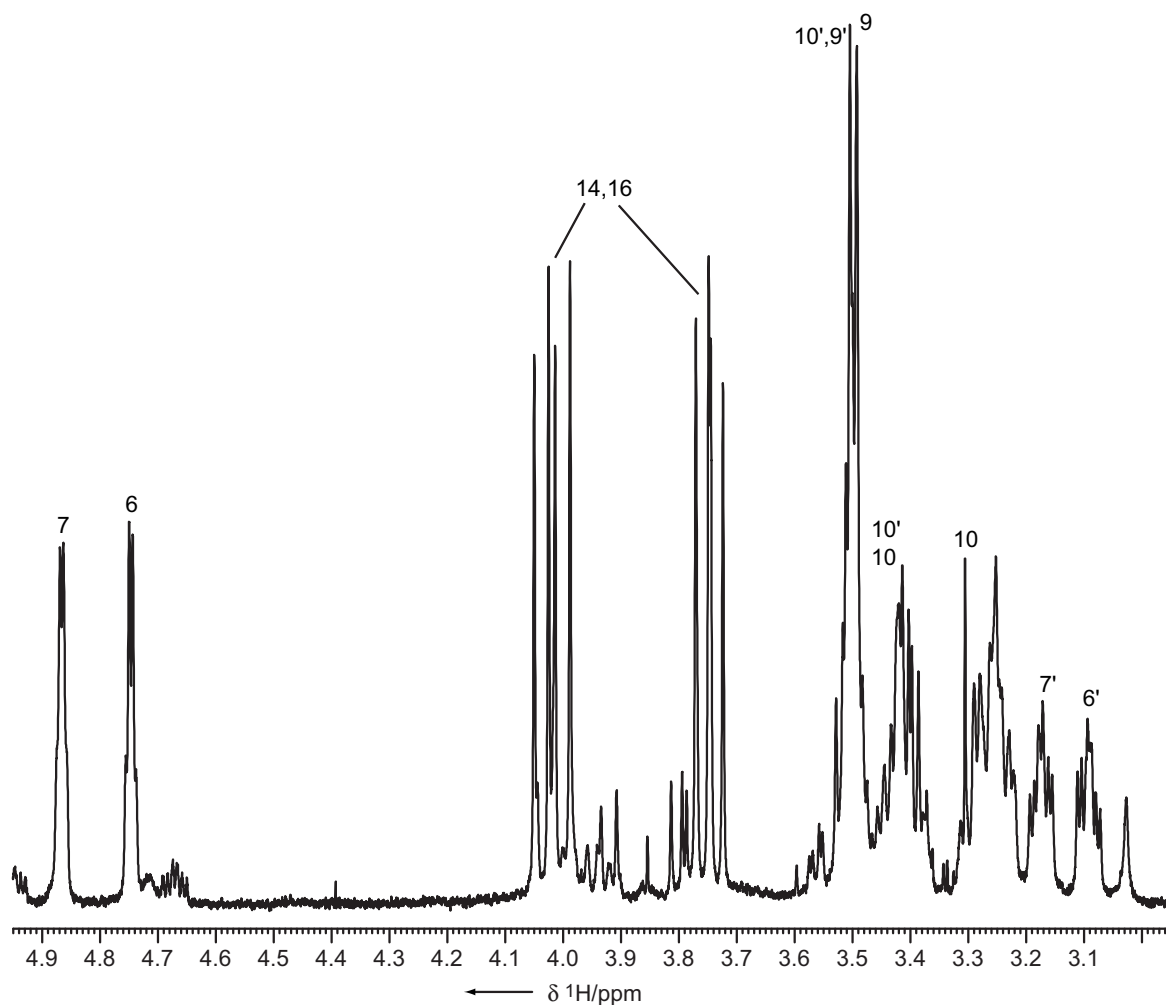


Abbildung 4.15: Ausschnitt aus ^1H -Spektrum von **16** nach der Spaltung des Ley-Acetals und anschließender Acetylierung der Hydroxylgruppen (600 MHz, CDCl_3 , 293 K).

Struktur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Energie [kcal/mol]	245.9	246.6	248.4	249.8	250.2	250.5	250.8	251.5	251.5	251.9
Dihedralwinkel [°]										
H2-C2-C3-H3	179.2	179.2	178.8	179.1	179.1	179.1	179.1	179.5	179.0	179.3
H6-C6-C7-H7	64.4	64.1	63.8	63.7	64.0	64.3	64.2	64.0	63.5	64.0
H2'-C2'-C3'-H3'	81.7	80.1	84.9	80.1	83.7	85.4	80.6	81.1	79.4	86.3
H6'-C6'-C7'-H7'	175.9	176.2	176.0	175.5	176.2	175.5	176.3	176.0	175.7	176.3

Tabelle 4.4: Statistik der zehn energetisch günstigsten Konformation von **16**.

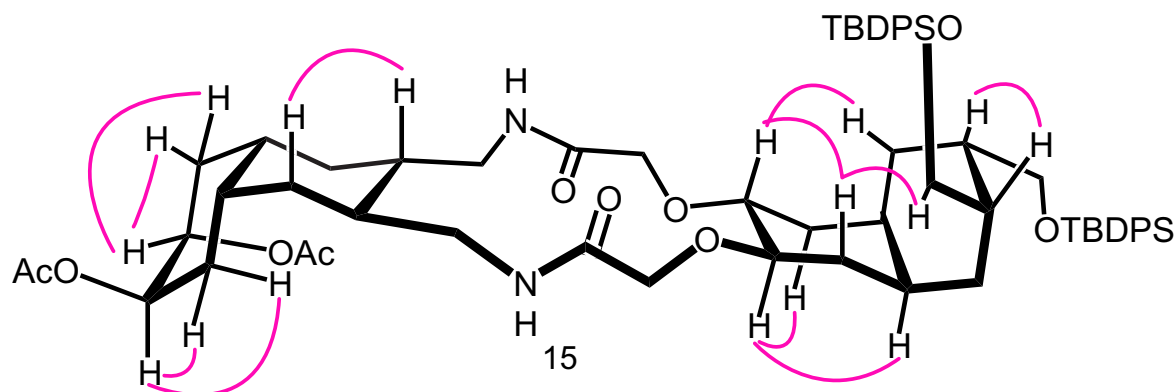


Abbildung 4.16: Zielkonformation **15** der Verbindung **16**. Gekennzeichnet sind die ROE-Abstände die für die MD-Rechnung von **16** verwendet wurden.

100 Strukturen mit dem Programm InsightII/Discover gerechnet. Die zehn energetisch günstigsten Strukturen wurden näher analysiert (Tab. 4.4 auf der vorherigen Seite).

Die Rechnungen bestätigen die aus den Kopplungskonstanten angedeutete Konformationsumwandlung der Dekalineinheiten. Beim Lösen der kovalenten Klammer (Ley-Acetal) wird die Konformationsänderung durch den 14-gliedrigen Bislactamring vermittelt. Dabei nimmt der Makrozyklus eine *all*-äquatorial Stellung ein, so daß auch das

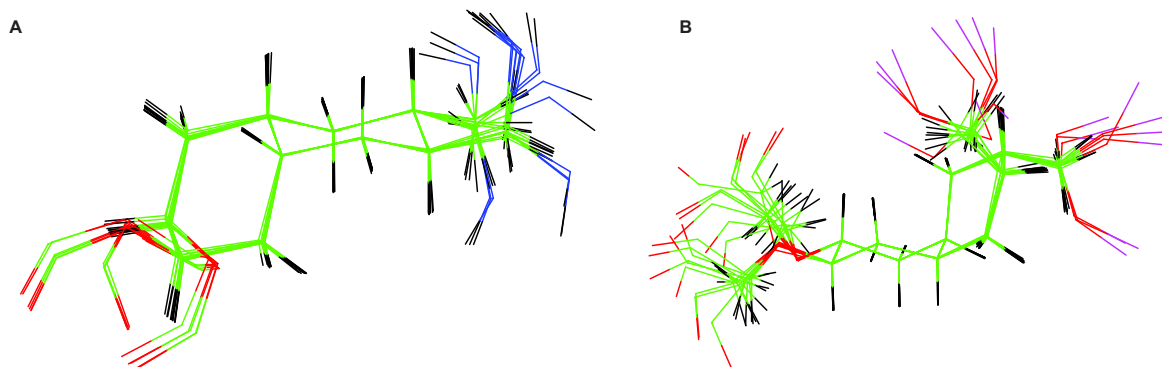


Abbildung 4.17: Überlagerung der Dekalingerüste der zehn energetisch günstigsten Strukturen von **16**. **A** Rechte Dekalineinheit, **B** linke Dekalineinheit.

zweite Dekalingerüst seine Konformation ändern muß. Die OTBDPS-Schutzgruppen nehmen nun eine energetisch ungünstige *trans*-Stellung ein. Auffällig ist hier der aufgeweitete Dihedralwinkel der Protonen H2', H3' im rechten Dekalinteil. Dieser wird durch die sterische Abstoßung der Schutzgruppen mit dem Rest des Moleküls verursacht.

Die zehn energetisch günstigsten Strukturen konvergieren für die Dekalingerüste sehr gut (Abb. 4.17 auf der vorherigen Seite). Wie für die Verbindung **13** konnten auch für **16** keine ROE-Abstände aus dem Makrozyklus in der Rechnung verwendet werden.

4.8 Zusammenfassung

Mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Methoden konnten die Ausgangs- und Endkonformation des irreversiblen Schaltprozesses der Verbindung **13** eindeutig charakterisiert werden. Der Schaltprozess wurde dabei durch die saure Spaltung des Ley-Acetals in **13** ausgelöst. Dieses Lösen der konformativen Klammer bewirkt einen Doppelringflip im linken Dekalingerüst der durch den Makrozyklus des Linkers an das rechte Dekalingerüst weitergeleitet wird. Die Konformation **14** der Verbindung **13** konnte

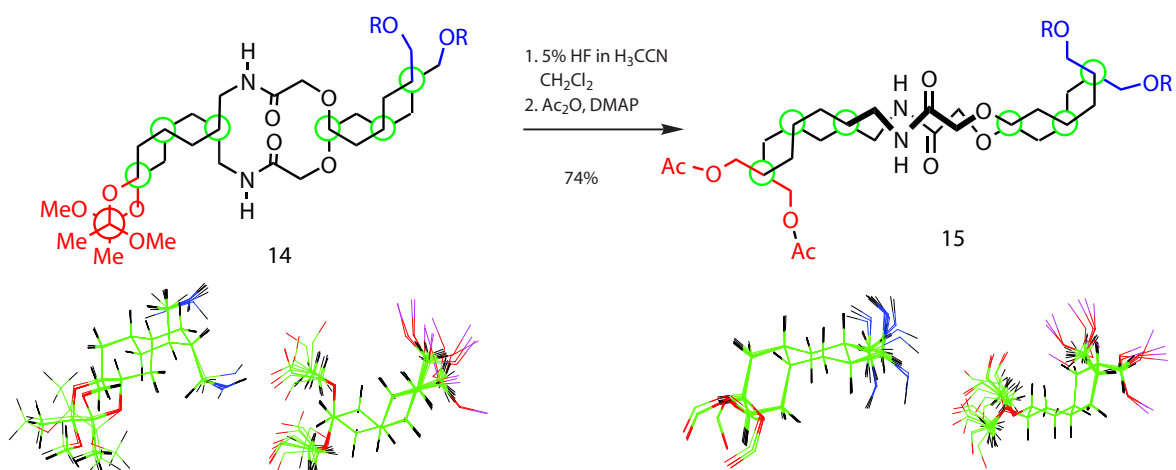


Abbildung 4.18: Zusammenfassung für den irreversiblen Schaltvorgang der Konformation **14** der Verbindung **13** durch Lösen der konformativen Klammer des Ley-Acetals durch saure Spaltung. Durch den ausgelösten Doppelringflip der linken Dekalineinheit wird über den 14-gliedrigen Bislactamring ein Doppelringflip in der rechten Dekalineinheit induziert. Die Verbindung **16** nimmt nun die Konformation **15** mit den OTBDPS-Schutzgruppen in diaxialer Stellung ein. Gezeigt sind die entsprechenden Newman-Projektionen in den Dekalingerüsten. Modifiziert aus [349]. Darunter sind die aus den mit NMR-Daten durchgeführten MD-Rechnungen erhaltenen Strukturen der Dekalineinheiten abgebildet.

durch Auswertung der Kopplungskonstanten und die MD-Rechnung mit den gewonnenen ROE-Abstandsinformationen ermittelt werden. Gleiches gilt für die Konformation **15** der geschalteten Verbindung **16** (Abb. 4.18). Mit dem so konstruierten Schalter können auch größere Distanzen (ca. 15.5 Å) in eindeutiger Weise geschaltet werden.

5 Zusammenfassung

Die klassische synthetische Organische Chemie wandelt sich mehr und mehr zu einer strukturorientierten Organischen Chemie, in der über die Strukturen interessante neue Materialien wie Nanoschalter und Regeleinheiten gewonnen werden oder pharmakologisch relevanter Fragestellungen beantwortet werden können. Neben den anspruchsvollen Herausforderungen bei der Synthese kommt es auf die schnelle, präzise und gut zugängliche Strukturbestimmung an.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Fragestellungen die den Aufbau und die Funktion von molekularen Maschinen und Regeleinheiten betreffen bearbeitet. Erfolgreich wurde die biochemische Synthese eines Kernbereiches der spleißosomalen U4/U6-RNA etabliert und die Sekundärstruktur mittels NMR-spektroskopischer Methoden charakterisiert. Die Konformationen von zwei molekularen Regeleinheiten, eines auf Gramacidin basierenden Ionenkanals sowie einem aus zwei *cis*-Dekalinen aufgebauten molekularen Schalters konnten in unterschiedlichen Umgebungen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie erfolgreich bestimmt werden.

Im zweiten Kapitel wurden die durchgeführten biochemischen Synthesen und NMR-spektroskopischen Untersuchungen des Y-förmigen Kernbereichs der Wechselwirkung des spleißosomalen U4/U6-RNA-Komplexes (Abb. 5.1 auf der nächsten Seite) dargestellt.

Zur biochemischen Synthese der RNA wurden verschiedene etablierte biochemische Konzepte zur Herstellung einer in der Länge homogenen RNA mit definierten 3'- und 5'-Ende neu kombiniert und optimiert. Es konnten insgesamt vier verschiedene RNA-Sequenzen mit dem gewünschten Y-förmigen Kernbereich in ausreichender Ausbeute hergestellt werden.

Eine Transkription mit T7-Polymerase von doppelsträngiger synthetischer Templat-DNA, wie im Falle von u4u6a42, führte zu einer Mischung aus N und N+1-RNAs in guter Ausbeute. Bei diesem Ansatz ist keine Aussage über die Lage der Inhomogenität (3'- oder 5'-Ende) möglich. Die RNAs unterschiedlicher Länge ließen sich nur schlecht über Gelelektrophorese oder HPLC voneinander trennen.

Versuche, eine homogene RNA durch Schneiden des T7-Transkriptes mit dem entsprechenden Hammerhead-Ribozym am 3'-Ende herzustellen, führten wie an den Beispielen von u4u6a46hh1 bis u4u6a46hh4 gezeigt werden konnte, zu keiner in der Länge

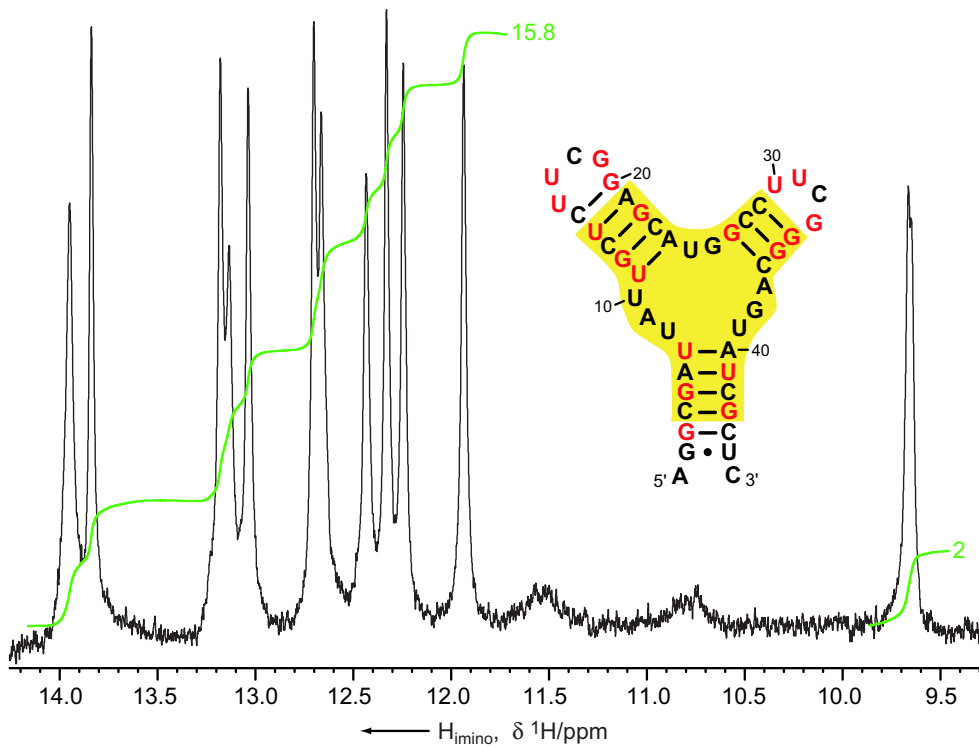


Abbildung 5.1: Iminobereich des J&R-Echo-Protonenspektrums der u4u6a46phh2-RNA ($T=290\text{ K}$, 600 MHz). Diese RNA kann als Konstrukt für die Synthese von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -gelabelter RNA dienen. In grün sind die Integrale über die Iminoprotonen angegeben. Daneben ist die wahrscheinliche Sekundärstruktur von u4u6a46phh2-RNA gezeigt. Der Kernbereich des Y-förmigen spleißosomalen U4/U6-RNA-Komplexes ist gelb unterlegt.

einheitlichen RNA. Anhand von am 5'-Ende radioaktiv markierter RNA konnte nachgewiesen werden, daß die Inhomogenität nach dem Schneiden am 3'-Ende am 5'-Ende lokalisiert ist.

Durch Verwendung des ϕ -Promotors im Falle von u4u6a46phh2 bzw. einer leicht anderen, ebenfalls mit G beginnenden Sequenz für u4u6a44hh7 konnten die Probleme bezüglich der 5'-Inhomogenität gelöst werden und so in der Länge einheitliche RNAs durch Schneiden am 3'-Ende mit den passenden Ribozymen erfolgreich synthetisiert werden.

Die NMR-spektroskopische Untersuchung der vier nicht isotopenmarkierten RNAs ergibt für die homonuklearen zweidimensionalen Spektren eine gute Übereinstimmung im Bereich der Iminoressonanzen und spiegelt somit die in allen RNAs enthaltene Struktur des Y-förmigen Kernbereichs des U4/U6-Komplexes wieder.

Aufgrund der vorliegenden Daten kann u4u6a46phh2-RNA als Konstrukt für die Synthese von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -gelabelter RNA dienen, da die Schneidreaktion und die daraus resultierende RNA definiert ist und die Integrale der Iminoprotonen für eine einzige Konformation der RNA sprechen.

Die Strukturen eines künstlichen Ionenkanals konnte mit Hilfe der NMR-Spektroskopie im Rahmen der Kooperation im VW-Projekt „Conformational control of biomolecular functions“ unter verschiedenen Bedingungen erfolgreich gelöst werden. Die durchgeführten Experimente und Strukturrechnungen wurden in Kapitel drei dargelegt.

Das von Dr. Hans-Dieter Arndt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Koert an der Humboldt-Universität zu Berlin hergestellte Minigramicidin ist aus zwei verkürzten Gramicidin A-Einheiten aufgebaut, die in einer Kopf-an-Kopf Anordnung durch einen Bernsteinsäure-Linker kovalent verknüpft sind.

Minigramicidin ist ein in Lipiddoppelschichten funktionaler Ionenkanal, der eine Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Membrandicke zeigt. Minigramicidin zeigt in organischen Lösemitteln verschiedene Konformationen und Aggregate und ähnelt damit Gramicidin A. Die Zugabe von Cäsiumkationen bewirkt eine starke Änderung in der Konformation und Aggregatbildung. In dieser Arbeit wurden die Strukturen von Minigramicidin in zwei unterschiedlichen Umgebungen aufgeklärt: in Benzol/Aceton (10:1, v/v) ohne Zusatz von Kationen und in gesättigter Cäsiumchlorid-Chloroform/Methanol (3:1, v/v)-Lösung (Abb. 5.2 auf der nächsten Seite).

Im ersten Fall findet man ein doppelt helikales linksgängiges Dimer von Minigramicidin mit ca. 5.7 Resten pro Windung. Diese Struktur hat eine Länge von ca. 38 Å und einen Durchmesser von ca. 1.2 Å. Das Aggregat kann nicht die kanalaktive Form sein, wie auch ein Vergleich mit den CD-Spektren zeigt, da die Abmessung keine Ioneneinlagerung bzw. Einpassung in eine Membran zulassen.

Der Komplex mit Cäsiumkationen zeigt hingegen eine große Ähnlichkeit mit den in membranähnlicher Umgebung gefundenen, kanalaktiven Konformationen von Gramicidin A. Das Monomer liegt als eine rechtsgängige π -Helix mit ca. 6.3 Resten pro Windung vor. Die Abmessung von 17 Å Länge erklärt die Abhängigkeit der Leitfähigkeit des Kanals von der Membrandicke. Mit einem Durchmesser von ca. 4.5 Å ist die monomere Struktur zur Solvatisierung einwertiger Kationen durch die Sauerstoffatome der Carbonylgruppen im Innern der Kanals gut geeignet. Es konnte somit zum ersten Mal eine zur Ionenkanalaktiven Form des gA ähnliche Konformation eines

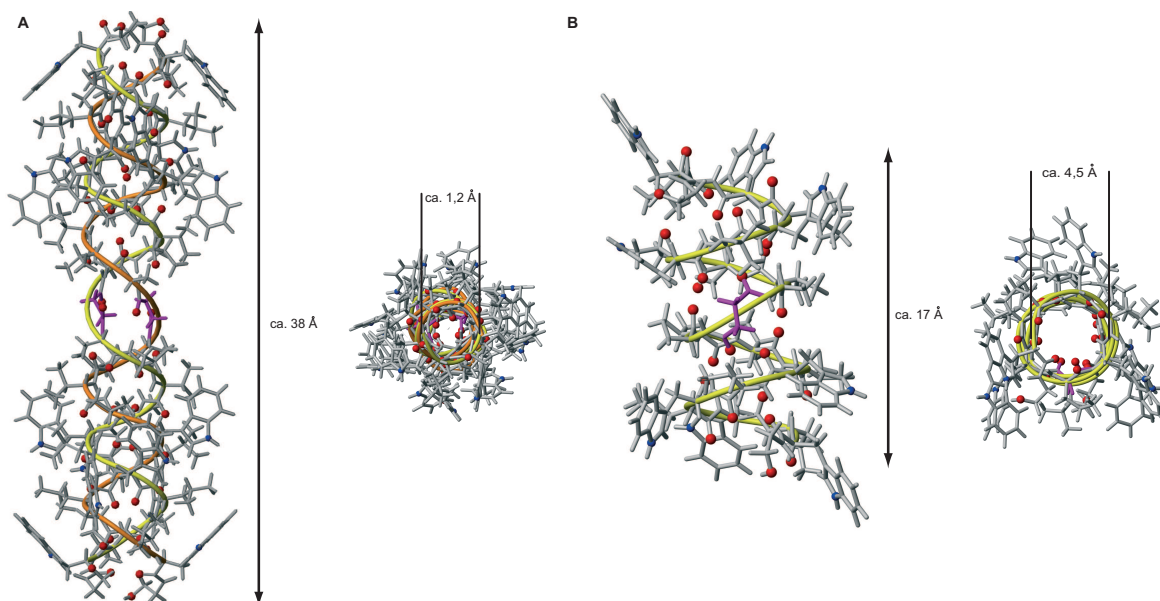


Abbildung 5.2: Strukturen von Minigramicidin in verschiedenen Lösemittelumgebungen. **A:** Gemittelte Struktur des Minigramicidin-Dimers in Benzol- d_6 /Aceton- d_6 (10:1, v/v). Seitenansicht mit Angabe der Länge von ca. 38 Å, und Draufsicht mit Angabe des Durchmessers von ca. 1,2 Å. **B:** Gemittelte Struktur des Minigramicidin-Dimers in gesättigter Cäsiumchlorid- $CDCl_3$ /MeOH- d_3 (3:1, v/v)-Lösung. Seitenansicht mit Angabe der Länge von ca. 17 Å, Draufsicht mit Angabe des Durchmessers von ca. 4,5 Å.

auf gA basierenden künstlichen Ionenkanals in organischen Lösemitteln nachgewiesen werden.

Die Bestimmung der Ausgangs- und Endkonformation des Schaltprozesses eines von Dr. Michael Karle aus der Arbeitsgruppe von Prof. Koert an der Philipps-Universität Marburg synthetisierten molekularen Schalters mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Methoden wurde in Kapitel 4 beschrieben.

Der molekulare Schalter besteht aus zwei *cis*-Dekalineinheiten, die durch einen 14-gliedrigen Bislactam-Ring miteinander gekoppelt sind. Der Schaltprozeß wurde dabei durch die saure Spaltung des Ley-Acetals in **13** ausgelöst. Dieses Lösen der konformativen Klammer bewirkt einen Doppelringflip im linken Dekalingerüst der durch den Makrozyklus des Linkers an das rechte Dekalingerüst weitergeleitet wird (Abb. 5.3 auf der nächsten Seite).

Die Konformation der Verbindung **13** konnte eindeutig durch die Auswertung von DQF-COSY-Spektren und ROESY-Spektren charakterisiert werden. Hierbei wurden

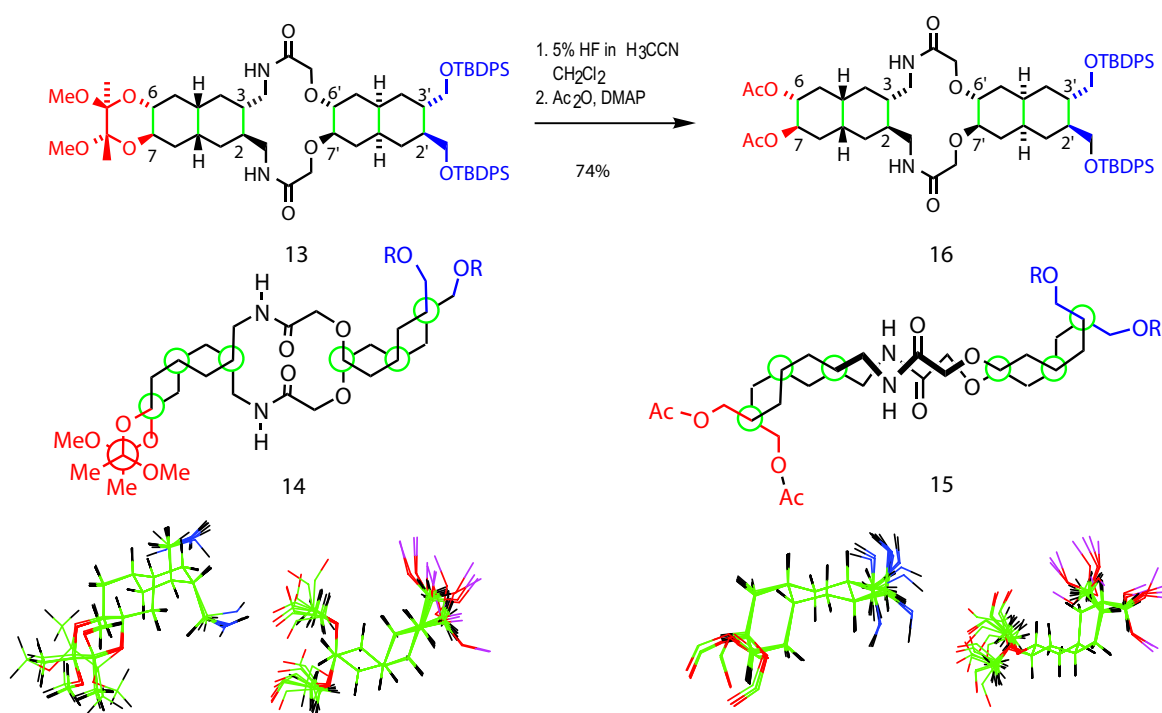


Abbildung 5.3: Zusammenfassung für den Schaltvorgang von **13** durch lösen der konformativen Klammer des Ley-Acetals durch saure Spaltung. Gezeigt sind die Konformationen, die durch die NMR-Experimente und MD-Rechnungen erhalten wurden. Durch den ausgelösten Doppelringflip der linken Dekalineinheit wird über den 14-gliedrigen Bislactamring ein Doppelringflip in der rechten Dekalineinheit induziert. In der Verbindung **16** nehmen die OTBDPS-Schutzgruppen nun eine diaxiale Stellung ein. In der Mitte sind die entsprechenden Newman-Projektionen entlang der grün markierten C-C-Bindungen in den Dekalingerüsten gezeigt. Der untere Teil zeigt die aus den NMR-Daten berechneten Strukturen für die jeweiligen Dekalineinheiten der beiden Verbindungen. Modifiziert aus [349].

die Kopplungskonstanten der Dekalingerüste und die ROE-Abstände ausgewertet und in MD-Rechnungen mit dem Programmpaket Insight/Discover verwendet. Es wurde für die Verbindung **13** eine *all*-axial Stellung für den Makrozyklus gefunden. Diese Struktur wird auch durch die gefundenen Kopplungskonstanten gestützt.

Nach dem Schaltprozeß wurde mit den gleichen Methoden die Struktur von **16** ermittelt. Wie erwartet, wurde durch das Lösen der konformativen Klammer ein Doppelringflip im linken Dekalingerüst ausgelöst und durch den Makrozyklus auf das rechte Dekalingerüst übertragen. Die gefundenen ROE-Abstände und Kopplungskonstanten für bestimmte Dekalinprotonen bestätigen die umgeschaltete Struktur. Somit wurde erstmals der Schaltvorgang zweier gekoppelter konformativer Schalter bestimmt. Der

so konstruierte Schalter kann damit als Basis für größere Schaltdistanzen, z.B. durch Membranen hindurch dienen.

6 Experimentelle Vorschriften

6.1 Synthese von RNA mittels Transkription von DNA-Templaten

6.1.1 Sequenzdesign der Templat-DNA für ein RNA-Konstrukt

Ist die Sequenz der zu transkribierenden RNA bekannt, lassen sich in wenigen Schritten die entsprechenden *sense*- und *antisense*-DNA-Sequenzen konstruieren. Hierbei muß man im Fall von plasmidischer Templat-DNA noch die verschiedenen Restriktionsschnittstellen für die Klonierung in pUC19 berücksichtigen. Am folgenden Beispiel soll für die 20 Nukleotide lange Test-RNA test1 mit der Sequenz 5' GAC GUG ACC UGG GGC CGI UA 3' das Vorgehen demonstriert werden (Sequenzen sind in 5'→3'-Richtung geschrieben).

1. Übersetzen in DNA:
GACGTGACCTGGGGCCGCTA
2. Anhängen der T7-Promotorsequenz:
TAATACGACTCACTATAGACGTGACCTGGGGCCGCTA
3. Einfügen der Pst I-Schnittstelle:
TAATACGACTCACTATAGACGTGACCTGGGGCCGCTACTGCAG
4. Bildung des reversen Komplements (*antisense*-Stranges):
CTGCAGTAGCGGCCCCAGGTCACGTCATAGTGAGTCGTATTA
5. Anfügen der EcoR I und Hind III-Restriktionsstellen:
sense-Strang
AATTCTAATACGACTCACTATAGACGTGACCTGGGGCCGCTACTGCAGA
antisense-Strang
AGCTTCTGCAGTAGCGGCCCCAGGTCACGTCATAGTGAGTCGTATTAG

Um Fehler bei der Generierung der DNA-Sequenzen zu vermeiden, wurde das Sequenzdesign über ein Webformular mit Hilfe des CGI-Skriptes rna_design.cgi (6.1.36 auf Seite 210) durchgeführt. Zur Ausführung des Skriptes wird eine Perl-Installation und ein Webserver (z.B. Apache) benötigt.

6.1.2 Herstellung von doppelsträngigen T7-DNA-Templaten

Auffüllen mit Klenow-Fragment, Variante 1

Bei dieser Variante wird das vor Herrn Dr. Dierk Blechschmidt hergestellte Klenow-Fragment verwendet [122].

- Im ersten Schritt wird der T7-Primer mit der DNA-Matrize hybridisiert. Ein 200 μl Ansatz hat folgende Zusammensetzung:

10x Phosphorylierungspuffer	20 μl
2% BSA-Lösung	20 μl
DNA-Matrize (1 OD ²⁶⁰ -Einheit/ μl)	5 μl
T7-Primer (1 OD ²⁶⁰ -Einheit/ μl)	2.5 μl
100 mM dTTP	5 μl
100 mM dCTP	5 μl
100 mM dGTP	5 μl
100 mM dATP	5 μl
steriles Wasser	122.5 μl

Der pH-Wert sollte nach dem Zusammengeben aller Komponenten 7.5 betragen.

- Die Mischung wird 3 min auf 65 °C aufgeheizt und im Heizblock langsam auf RT abkühlt.
- 5 μl Klenow-Fragment-Lösung (ca. 20 mg/ml) werden zugegeben, kurz vortexen.
- Es wird 2 h bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert.
- Zur Kontrolle trägt man ein Aliquot der Reaktionslösung gegen die Einzelstränge auf ein natives Gel auf. Die doppelsträngige DNA sollte wesentlich langsamer als die einzelsträngigen Ausgangs-DNAs laufen.
- Die Reaktion wird anschließend durch Zugabe von 50 μl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (Fluka) und intensives Schütteln gestoppt.
- Es wird für 10 min bei 13000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge) zentrifugiert.
- Die wässrige Phase wird abgenommen und mit 50 μl 10 M Ammoniumacetat-Lösung (pH 6.8) und 750 μl EtOH versetzt.
- Um die Fällung zu vervollständigen, wird die Mischung über Nacht bei -20 °C gelagert.
- Die ausgefallene DNA wird zentrifugiert (30 min, 16100 g, Eppendorf-Zentrifuge 5415 D).
- Die überstehende Lösung wird vorsichtig dekantiert und das Pellet mit 100% EtOH gewaschen.
- Das Pellet wird anschließend im Vakuumkonzentrator getrocknet (1 h, Heizung Stufe I).
- Die getrocknete DNA wird in 100 μl sterilem Wasser aufgelöst.

Auffüllen mit Klenow-Fragment, Variante 2

Bei diesem Ansatz wird kommerziell hergestelltes Klenow-Fragment von New England Biolabs (NEB) verwendet. Hierbei werden 10 nmol *antisense*-Strang und der T7-Primer in 1.1-fachen Verhältnis eingesetzt. Die Reaktion wird in 200 μl Volumen und 0.125 Einheiten Klenow-Fragment pro μg DNA mit einer Konzentration von 2.5 mM pro dNTP durchgeführt.

- Im ersten Schritt wird der T7-Primer auf die DNA-Matrize ohne Zusatz von dNTPs und Klenow-Fragment hybridisiert. Ein 200 μl Ansatz hat folgende Zusammensetzung:

10x Phosphorylierungspuffer	20 μl
1% BSA-Lösung	40 μl
<i>antisense</i> -DNA (0.7 mM)	13.5 μl
T7-Primer (2 mM)	5.3 μl
steriles Wasser	67.2 μl
40 mM dNTP-Mix (je 10 mM)	50 μl
Klenow-Fragment (NEB, 5 U/ μl)	4 μl

- Die Mischung ohne dNTPs und Klenow-Fragment wird 3 min auf 70 °C aufgeheizt und langsam im Heizblock auf RT abkühlt.
- 4 μl Klenow-Fragment-Lösung und 40 μl dNTP-Mix werden zugegeben. Kurz vortexen.
- Man inkubiert 3 h bei 37 °C im Wärmeschrank.
- Zur Kontrolle trägt man ein Aliquot der Reaktionslösung gegen die Einzelstränge auf ein natives Gel auf. Die doppelsträngige DNA sollte wesentlich langsamer als die einzelsträngigen Ausgangs-DNAs laufen.
- Die Reaktion wird anschließend durch Zugabe von 50 μl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1, Fluka) und intensives Schütteln gestoppt.
- Es wird für 10 min bei 16100 g (Eppendorf-Zentrifuge 5415 D) zentrifugiert.
- Die wässrige Phase wird abgenommen und mit 50 μl 10 M Ammoniumacetat-Lösung (pH 6.8) und 750 μl EtOH versetzt.
- Um die Fällung zu vervollständigen, wird die Mischung über Nacht bei -20 °C gelagert.
- Die ausgefallene DNA wird zentrifugiert (30 min, 16100 g, Eppendorf-Zentrifuge).
- Die überstehende Lösung wird vorsichtig dekantiert und das Pellet mit 100% EtOH gewaschen.

- Das Pellet wird anschließend im Vakuumkonzentrator getrocknet (1 h, Heizung Stufe I).
- Die getrocknete DNA wird in 100 μl sterilem Wasser aufgelöst.

Direkte Hybridisierung

Die von Metabion gelieferten Top- und Bottomstränge werden mit H_2O auf eine Konzentration von 100 pmol/ μl eingestellt. Je 10 μl der Einzelstränge werden zusammengegeben und für 3 min auf 95 °C erhitzt. Dann läßt man im Heizblock innerhalb einer Stunde auf RT abkühlen.

6.1.3 T7-Polymerase

Für die Transkriptionen wurde die von Dr. Dierk Blechschmidt in seiner Doktorarbeit hergestellte T7-Polymerase verwendet [122].

6.1.4 Transkriptionsbedingungen

Testtranskriptionen von 40 μl

Für die Transkriptionen werden zwei unterschiedliche Puffer verwendet. In 10x T7-Transkriptionspuffer1 ist im Vergleich zum 10x Transkriptionspuffer2 kein DTT enthalten. Außerdem wird bei Transkriptionen mit Transkriptionspuffer2 zusätzlich BSA zur Reaktionsmischung zugesetzt.

Um die Templat-DNA von neuen Konstrukten zu testen, wird eine Testtranskription in 40 μl durchgeführt. Dabei werden üblicherweise folgende Mengen eingesetzt:

Plasmid oder doppelsträngige Templat-DNA	500–700 ng
oder doppelsträngige Templat-DNA	
10x Transkriptionspuffer	4 μl
100 mM NTP-Mix	16 μl
500 mM Magnesiumchloridlösung	3.6 μl
100 mM DTT-Lösung	0.4 μl
PEG8000-Lösung(0.5 g/ml)	6.4 μl
T7-Polymerase (6.2 mg/ml)	2 μl
mit Wasser auf 40 μl auffüllen	

- Wenn nicht anders beschrieben, wird für vier Stunden bei 37 °C inkubiert.

- Zur Reaktionskontrolle trägt man ein Aliquot auf ein 15 % denaturierendes Polyacrylamidgel (7 M Harnstoff) auf.

Optimierung der Transkriptionsbedingungen

Um möglichst viel RNA von einer gegebenen Menge DNA-Templat zu erhalten, muß die Transkription bezüglich der Konzentration von Magnesiumionen, NTPs, Plasmidmenge, T7-Polymerase und der Reaktionsdauer für jedes Konstrukt optimiert werden. Typischerweise liegt dabei die Konzentration der Magnesiumionen ca. 5 mM über der der eingesetzten NTPs, um sicherzustellen, daß diese als Magnesiumsalze für die T7-Polymerase zur Verfügung stehen. In einer ersten Versuchsreihe wird die NTP-Konzentration zusammen mit der Magnesiumionenkonzentration und der Konzentration der T7-Polymerase variiert (Abb. 6.1 auf der nächsten Seite). Im nächsten Schritt wird dann das Verhältnis von Templat-DNA zu T7-Polymerase bei konstanter Konzentration vom Magnesiumionen und NTPs optimiert (Abb. 6.2 auf Seite 178). Gleichzeitig werden Proben bei unterschiedlichen Zeiten entnommen, um die zeitliche Effizienz der Transkription zu verfolgen. Für die in dieser Arbeit hergestellten RNAs wurden die folgenden Transkriptionsbedingungen verwendet:

RNA	NTPs	Mg ²⁺	T7-Polymerase	Plasmid/DNA	Zeit
u4u6a42	10 mM	24 mM	2 μ l	10 pmol	2 h
u4u6a42-OMe	10 mM	24 mM	2 μ l	10 pmol	2 h
u4u6a42	30 mM	35 mM	6 μ l	1.8 μ g	4 h
u4u6a46hh1_vs	40 mM	45 mM	4 μ l	1.4 μ g	4 h
hh1_3b	40 mM	45 mM	2 μ l	1.4 μ g	4 h
hh1_3c	40 mM	45 mM	2 μ l	40 pmol	4 h
hh1_3d	40 mM	45 mM	2 μ l	40 pmol	4 h
u4u6a46hh5_vs	40 mM	45 mM	6 μ l	1 μ g	4:30 h
hh5_3	30 mM	45 mM	6 μ l	1.4 μ g	4:30 h
hh5_5	40 mM	45 mM	6 μ l	1.8 μ g	4:30 h
u4u6a46hh2_vs	40 mM	45 mM	2 μ l	4 pmol	4 h
hh2_3	40 mM	45 mM	2 μ l	4 pmol	4 h
u4u6a46hh3_vs	40 mM	45 mM	2 μ l	4 pmol	4 h
hh3_3	40 mM	45 mM	2 μ l	4 pmol	4 h
u4u6a46hh4_vs	40 mM	45 mM	2 μ l	4 pmol	4 h
hh4_3	40 mM	45 mM	2 μ l	4 pmol	4 h
u4u6a44hh7_vs	40 mM	45 mM	6 μ l	1.2 μ g	6 h
hh7_3b	30 mM	35 mM	4 μ l	1.2 μ g	24 h
u4u6a43de_1	30 mM	35 mM	6 μ l	1.6 μ g	4 h

6 Experimentelle Vorschriften

Probenvolumen 40 ul, 4h inkubieren													
Test-RNA	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10			
Test-Plasmid (1.6ug/ml)	200ng	400ng	600ng	800ng	1000ng	1200ng	1400ng	1600ng	1800ng	2000ng			
10x Transkriptionspuffer2	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	0,88	1	1,13	1,25			
NTPs 100mM-Stammlsg. (25 each)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4			
MgCl ₂ , 0,5 M	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			30mM NTPs
100 mM DTT	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6			45mM Mg
PEG 8000 (500mg/ml)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4			2ul T7
T7	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4			
H ₂ O	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2			
	11,47	11,35	11,22	11,1	10,97	10,85	10,72	10,6	10,47	10,35			
Test-RNA	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10			
Test-Plasmid (1.6ug/ml)	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	0,88	1	1,13	1,25			
10x Transkriptionspuffer2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4			
NTPs 100mM-Stammlsg. (25 each)	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			30mM NTPs
MgCl ₂ , 0,5 M	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6			45mM Mg
100 mM DTT	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4			4ul T7
PEG 8000 (500mg/ml)	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4			
T7	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4			
H ₂ O	9,47	9,35	9,22	9,1	8,97	8,85	8,72	8,6	8,47	8,35			
Test-RNA	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10			
Test-Plasmid (1.6ug/ml)	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	0,88	1	1,13	1,25			
10x Transkriptionspuffer2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4			
NTPs 100mM-Stammlsg. (25 each)	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12			30mM NTPs
MgCl ₂ , 0,5 M	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6			45mM Mg
100 mM DTT	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4			6ul T7
PEG 8000 (500mg/ml)	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4			
T7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6			
H ₂ O	7,47	7,35	7,22	7,1	6,97	6,85	6,72	6,6	6,47	6,35			

Abbildung 6.2: Beispiel für eine Feinoptimierung bezüglich der Konzentration der Templat-DNA gegenüber der T7-Polymerasekonzentration. Die Buchstaben A, B, C bezeichnen die verschiedenen Ansätze, die sich in der Konzentration der T7-Polymerase unterscheiden. Innerhalb der Versuchsreihen wird die Plasmidmenge bei konstanter Konzentration von NTPs und Mg²⁺ erhöht.

6.1.5 Herstellung von u4u6a42 über ds-DNA-Templat

Für einen typischen Reaktionsansatz von 4 ml werden folgende Mengen verwendet:

DNA-Templat	100 μ l (6.1.2 auf Seite 172)
10x T7-Puffer1	400 μ l
2 % BSA-Lsg.	400 μ l
PEG8000	640 μ l
NTP-Lsg (100 mM)	je 100 μ l
MgCl ₂ (300 mM)	320 μ l
T7-Polymerase	100 μ l
Wasser	1640 μ l

- Die Lösungen werden in einem PP-Reagenzglas in folgender Reihenfolge zusammengegeben: Wasser, T7-Puffer, BSA-Lsg., PEG8000, NTPs, MgCl₂, DNA-Templat und zum Schluß die T7-Polymerase. Man vortext kurz und inkubiert 1 h bei 37 °C.
- Zur Zerstörung des DNA-Templats werden 200 Einheiten DNase I (Boehringer Mannheim) zugegeben, kurz gevortext und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert.
- Zur Aufarbeitung gibt man 800 μ l einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1, v/v/v) hinzu und schüttelt die Mischung kräftig. Anschließend wird 10 min bei 8500 g zentrifugiert.
- Man nimmt die wässrige Phase vorsichtig mit einer Pipette ab und reextrahiert den Rückstand nochmals mit 4 ml Wasser. Anschließend wird nochmals für 10 min bei 8500 g zentrifugiert.
- Die wässrige Phase wird abgenommen und mit der Fraktion von der ersten Extraktion in einem großen PP-Reagenzglas (40 ml) vereinigt.
- Zur Fällung der RNA wird die wässrige Lösung mit 1 ml 10 M Ammoniumacetatlösung und 24 ml 100 % Ethanol gemischt. Man läßt die Mischung über Nacht im Gefrierschrank stehen.
- Am nächsten Tag wird der Niederschlag 1 h bei 8500 g abzentrifugiert. Die überstehende Lösung wird vorsichtig abgegossen und der Rückstand im Vakuum 2 h getrocknet.
- Die farblose, getrocknete roh-RNA wird in 500 μ l Wasser gelöst und die Konzentration am UV-Spektrometer bestimmt.

6.1.6 HPLC-Aufreinigung der roh-RNA über Nucleogen DEAE 60-7 Säulen

Die HPLC wird mit Nucleogen DEAE 60-7 Säulen der Firma Machery-Nagel, Düren durchgeführt.

Puffer A: 20 mM K_2HPO_4 , 5 M Harnstoff, pH = 6.5

Puffer B: 20 mM K_2HPO_4 , 5 M Harnstoff, 1 M KCl, pH = 6.5

Für analytische Trennungen werden Säulen von 4 x 125 mm, für präparative Läufe von 10 x 125 mm verwendet.

Flußrate: analytisch 1 ml/min, präparativ 3.6 ml/min

Folgendes Gradientenprogramm wird verwendet:

Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]
0	100	0
5	70	30
55	40	60
70	20	80
75	0	100
80	0	100
85	100	0

6.1.7 HPLC-Aufreinigung der roh-RNA über Dionex DNAPac PA100 Säulen

Die HPLC wird mit DNAPac PA100 Säulen der Firma Dionex, Sunnyvale, CA (USA) durchgeführt.

Puffer A: 25 mM TRIS, 2 mM EDTA, pH = 8.0

Puffer B: 25 mM TRIS, 2 mM EDTA, 1 M NH_4Cl , pH = 8.0

Für analytische Trennungen werden Säulen von 4 x 250 mm, für präparative Läufe von 9 x 250 mm verwendet mit Vorsäulen DNAPac PA-100 4 x 50 mm.

Alle Trennungen werden bei einer Säulentemperatur von 85 °C durchgeführt.

Flußrate: analytisch 1 ml/min, präparativ 2.5 ml/min

Folgendes Gradientenprogramm wird verwendet:

Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]
0	100	0
11	45	55
45	0	100
50	0	100
55	100	0
65	100	0

6.1.8 Entsalzung über Sephadex G15-Säule

Für die Entsalzung einer über HPLC vorgereinigten RNA-Probe wird eine Säule von 4.5 x 80 cm, gefüllt mit 200 g Sephadex G15 verwendet. Es können bis zu 15 ml Probenvolumen aufgegeben werden [122].

Packen der Säule

- 200 g Sephadex G15 werden in 1.5 l Wasser suspendiert und unter Schütteln mehrere Stunden äquilibriert, bis das Säulmaterial gut gequollen ist.
- Zum Füllen der Säule wird auf diese ein Vorratsgefäß aufgesetzt und das aufgeschlämmte Säulmaterial wird in kleinen Portionen zugegeben, so daß sich keine Schichten bilden können. Anschließend wird die Säule mit 6-8 l Wasser bei einer Flußrate von 3.5 ml/min äquilibriert.
- Zur Lagerung wird die Säule mit 0.01 %iger Natriumazidlösung gespült. Das Säulenmaterial kann gegebenenfalls in einer 1%igen Kaliumhydroxidlösung regeneriert werden.

Entsalzung

- Die Säule wird mit 3-4 l Wasser bei einer Flußrate von 3.5 ml/min gespült.
- Bis zu 15 ml der in Wasser gelösten RNA wird auf die Säule aufgetragen und mit Wasser bei einer Flußrate von 3.5 ml/min eluiert. Über einen UV-Detektor mit angeschlossenen Fraktionssammler werden Fraktionen à 10 ml gesammelt.
- Die RNA-Fraktionen werden vereinigt und am Vakuumkonzentrator weiter eingengt. Um das verbleibende Salz zu entfernen, kann die Probe weiter mittels Mikrokonzentratoren entsalzt werden.

6.1.9 Entsalzung von 2 ml Transkriptionen

Zur Entsalzung werden PD-10-Säulen von Amersham und mit Sephadex G-50 gefüllte Gravitationsssäulen verwendet. Das Volumen beider Säulen beträgt ca. 9 ml bei einer Füllhöhe von ca. 5 cm. Die Abmessung beider Säulen sind identisch.

- Die Säulen werden mit 25 ml Wasser äquilibriert.
- Das Pellet der gefällten roh-RNA wird in 2.5 ml Wasser gelöst und auf die Säule gegeben. Der Durchfluß aus der Säule wird verworfen.
- Die RNA wird durch Zugabe von 3.5 ml Wasser von der Säule eluiert und in Fraktionen von 1 ml gesammelt. Zusätzlich wird noch mit 4 ml Wasser gespült und die Fraktionen ebenfalls aufgefangen.
- Die gesammelten Fraktionen werden auf einem denaturierenden Gel analysiert. Fraktionen, die RNA enthalten, werden vereinigt und weiter konzentriert.

6.1.10 Entsalzung über Sephadex G25-Säule

Die Kapazität einer PD-10-Säule (s.o.) reicht nicht zur vollständigen Abtrennung der NTPs und der Abbruch-RNAs aus. Deshalb wird eine 14 x 205 mm Säule mit dem gleichen Material (Sephadex G25-Fine) gepackt.

Packen der Säule

- Ca. 10 g Sephadex G25-Fine werden über Nacht in 120 ml 0.1 M NaOH-Lösung aufgequollen
- Zum Füllen der Säule wird auf diese ein Vorratsgefäß aufgesetzt und das aufgeschlämmte Säulenmaterial wird in kleinen Portionen zugegeben, so daß sich keine Schichten bilden können. Es wird mit ca. 1 l Wasser gespült (Flußrate 1.3 ml/min), so daß die Säule homogen gepackt ist.

Entsalzung

- Die Säule und die Anlage (Äkta prime) werden 30 min bei einer Flußrate von 1.3 ml/min mit 0.1 N NaOH-Lösung gespült und dann nochmals 30 min stehen gelassen.
- Anschließend wird die Anlage zusammen mit der Säule mit Wasser gespült, bis sich die Leitfähigkeit und die UV-Absorption nicht mehr ändern.

- Die roh-RNA einer 2 ml Transkription wird in 1.6 ml Wasser gelöst und dann über eine 5 ml Probenschleife mit einer Flußrate von 1.3 ml/min aufgegeben.
- Es werden Fraktionen von 2 ml über einen Probensammler gesammelt. Dabei werden die Leitfähigkeit und die UV-Absorption bei $\lambda=256$ nm detektiert.
- Die gesammelten Fraktionen werden anschließend auf einem denaturierenden Gel untersucht. Fraktion mit gleicher Zusammensetzung werden vereinigt.

6.1.11 Linearisieren von pUC19

Zum Schneiden von 10 μg pUC19 werden folgende Mengen benötigt (50 μl Ansatz):

- 11.5 μl Plasmid (Stammlösung: 0.871 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
- 5 μl 10-f NEB2-Puffer
- 5 μl EcoR I Enzym (20000 U/ml)
- 5 μl Hind III Enzym (20000 U/ml)
- Mit sterilem H_2O auf 50 μl auffüllen
- 2 h bei 37 °C inkubieren
- Vollständigkeit anhand eines 0.8 %igen Agarosegels überprüfen; bei unvollständigem Linearisieren nochmal jeweils 2 U pro μg Plasmid der Enzyme zugeben und eine weitere Stunde inkubieren (Abb. 6.3).

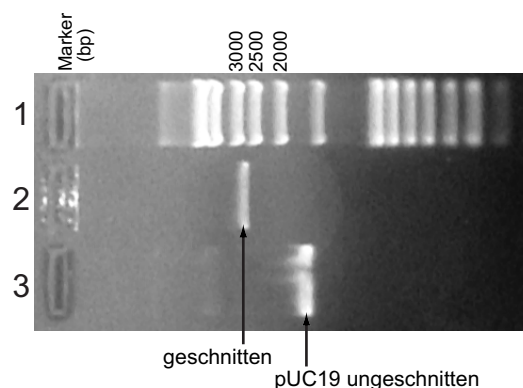


Abbildung 6.3: Schneiden von pUC19 mit EcoR I und Hind III. Spur 1: Marker, Spur 2: pUC19-Vektor aufgeschnitten, Spur 3: pUC19-Vektor ungeschnitten. Agarosegel mit Ethidiumbromid angefärbt.

Fällung der linearisierten Plasmid-DNA:

- Lösung mit sterilem Wasser auf 100 μl verdünnen

- Mit gleichem Volumen einer Phenol:CHCl₃:Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v)- Mischung versetzen, vortexen und 2 min bei 16100 g zentrifugieren
- Die wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Cup überführen, mit gleichem Volumen einer CHCl₃:Isoamylalkohol-Mischung (1:1, v/v) versetzen und vortexen
- Die wässrige Phase abnehmen und mit dem 2.5-fachen Volumen an EtOH und 1/10 Volumen 3 M NaAc-Lösung versetzen und über Nacht bei -20 °C fällen.
- 30 min mit 16100 g (Eppendorf-Zentrifuge) zentrifugieren; es sollte ein farbloser Niederschlag sichtbar sein. Das überschüssige Ethanol vorsichtig dekantieren und den Rückstand mit 100 µl 70 %igem EtOH waschen. Das Pellet wird bei RT getrocknet (eventuell im Heizblock 5 min bei max. 40 °C).
- Das getrocknete Pellet wird in 50 µl Wasser gelöst.
- Die Konzentration wird per UV-Absorption bestimmt (6.1.32 auf Seite 200).

6.1.12 Hybridisierung der DNA-Einzelstränge für die Klonierung

Variante 1

Die von Metabion gelieferten Top- und Bottomstränge werden mit H₂O auf eine Konzentration von 100 pmol/µl gebracht. Je 10 µl der Einzelstränge werden zusammengegeben und für 3 min auf 95 °C erhitzt. Dann läßt man im Heizblock innerhalb einer Stunde auf RT abkühlen. Von dieser Lösung der Doppelstränge werden 0.6 µl entnommen und mit Wasser auf 30 µl verdünnt.

Variante 2

Jeweils 30 pmol ($\hat{=}$ 0.3 µl einer 100 pmol/µl Stammlösung) der beiden einzelsträngigen DNAs werden in 30 µl H₂O gelöst. Man erhitzt 3 min bei 95 °C und läßt dann im Heizblock auf RT abkühlen.

6.1.13 Ligation der Ziel-DNA in den pUC19-Vektor

Analog der Vorschrift von Fermentas werden folgende Mengen in einem Eppendorf-Cup vermischt (Gesamtvolumen: 20 µl):

- 5 µl Hybridisierungsansatz (6.1.12)
- 1 µl (ca. 50-100 ng) linearisierten pUC19-Vektor
- 2 µl 10x Fermentas Ligationspuffer

- 1 μl 10 mM ATP-Lösung
- 1 μl Fermentas T4 DNA Ligase (5U)
- Mit sterilem H_2O auf 20 μl auffüllen
- Über Nacht bei 16 °C im Wasserbad inkubieren

6.1.14 Transformation in kompetente BL21 (DE3)-Zellen

Die Vorschrift kann auch für andere kompetente Zellen verwendet werden.

- 50 μl kompetente Zellen auf Eis auftauen
- 10 μl des Ligationsansatzes (6.1.13 auf der vorherigen Seite) zugeben und 30 min auf Eis inkubieren.
- Hitzeschock: 42 s bei 42 °C im Heizblock erwärmen.
- 2 min auf Eis inkubieren.
- 970 μl 2x YT-Medium zugeben.
- 1 h bei 37 °C inkubieren.
- 30 s bei 16100 g (Eppendorf-Zentrifuge) zentrifugieren.
- 900 μl des Überstandes abnehmen und verwerfen
- Kurz vortexen
- 100 μl des Rückstandes auf LB/Amp-Platten ausstreichen
- Über Nacht bei 37 °C inkubieren

6.1.15 Überprüfung der Klone auf Inserts per PCR

Die PCR-Reaktion wird mit Hilfe des Qiagen HotStarTaq-Master-Mix-Kits durchgeführt. Die mit einer feinen Pipettenspitze von der LB/Amp-Platte selektierten Einzelkolonien werden in 25 μl des folgenden Gemisches in einem 100 μl PCR-Reaktionsgefäß suspendiert:

HotStarTaq Master Mix	12.5 μl
10 pmol reversed M13 Primer	1 μl
10 pmol forward M13 Primer	1 μl
Wasser	10.5 μl

Die PCR-Reaktion wird in einem HYBAID PCRSprint-Gerät nach dem HotStar-Protokoll ausgeführt (Abschnitt 6.1.36 auf Seite 205). Nach Ablauf der Reaktion

werden 10 μ l der PCR-Reaktion über ein 5 %iges natives Polyacrylamidgel in einer Minigel-Apparatur bei 70 V innerhalb 70 min aufgetrennt. Als Referenz läuft eine Probe von unmodifiziertem pUC19-Vektor mit (Abb. 6.4).

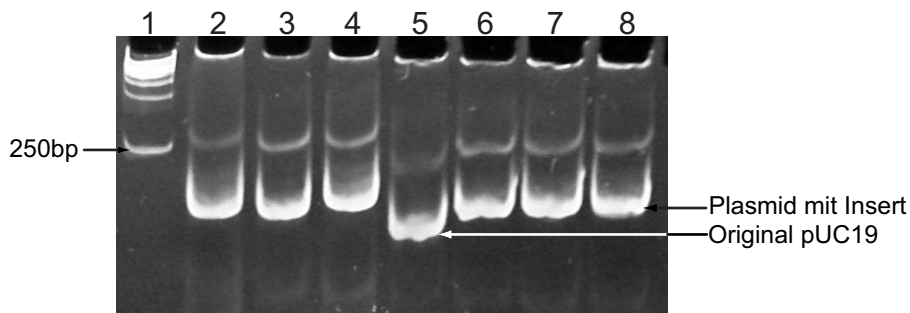


Abbildung 6.4: Kontrolle nach der PCR-Reaktion auf insertierte Templat-DNA in den pUC19-Vektor mittels nativer PAGE. In Spur 1 ist Marker aufgetragen, die unterste Bande entspricht einer 250 Basenpaaren langen doppelsträngigen DNA. Die Spuren 2–4 und 6–8 zeigen Plasmidabschnitte mit dem jeweiligen Insert, Spur 5 zeigt den PCR-amplifizierten Plasmidabschnitt von reinem pUC19-Vektor.

Folgende Sequenzen wurden als M13-Primer für die PCR-Reaktion verwendet:

M13/puc sequencing forward (-46)
5'-GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG A-3'

M13/puc sequencing reverse (-46)
5'-GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG-3'

6.1.16 Anlegen von Mini-Prep-Kulturen

Die Kulturen werden angelegt, um die DNA mit Hilfe des Qiagen Plasmid Miniprep-Kits zu isolieren und anschließend zu sequenzieren.

Die von den LB/Amp-Platten ausgewählten Einzelkolonien werden mit einer feinen Pipettenspitze eingestochen. Das an der Pipettenspitze haftende Material wird in 2.5 ml LB-Medium (0.1 g Ampicillin pro ml) suspendiert. Man schüttelt bei 37 °C und 220 rpm über Nacht. Von der Lösung werden 200 μ l mit 200 μ l 40 %iger Glycerin-Lösung als Stammlösung angesetzt, die bei -80 °C gelagert wird. Aus 2 ml der Kultur wird mit Hilfe des QIAGEN-Kits die Plasmid-DNA für die Sequenzierung isoliert.

6.1.17 DNA für die Sequenzierung

Die mit Hilfe des QIAGEN-Kits isolierte DNA wird anhand eines Agarosegels quantifiziert. Für die Sequenzierung der DNA bei der Firma SEQLAB (Göttingen) werden für die unkontrollierte Sequenzierung (HotShots, 300 bp) 700 ng DNA benötigt. Diese gibt man zusammen mit jeweils 20 pmol forward- oder reversed-M13-Primer zusammen in ein 100 μ l PCR-Gefäß mit flachem Deckel und engt die Lösung an einem Vakuumpkonzentrator (SpeedVac) bis zur Trockene ein. Der Rückstand wird in 7 μ l 10 mM TRIS-Puffer pH 8.5 gelöst und zur Sequenzierung eingeschickt.

6.1.18 Anlegen von Einzelkolonien

10 μ l der Glycerin-Stammlösung (6.1.16 auf der vorherigen Seite) werden mit einer Plastikimpföse auf einer LB/Amp-Platte ausgestrichen. Man inkubiert 12-16 h bei 37 °C im Wärmeschrank.

6.1.19 Anlegen von Kulturen für die Mega-Prep

Um größere Mengen an Plasmid-DNA für die Transkription zu gewinnen, müssen große Kulturen von *E. coli* angelegt werden. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt wiederum mit Hilfe von QIAGEN-Kits (Plasmid Mega Kit).

- Die von den LB/Amp-Platten ausgewählte Einzelkolonie wird mit einer feinen Pipettenspitze eingestochen. Das an der Pipettenspitze haftende Material wird in 2.5-5 ml LB/Amp-Medium (0.1 g Ampicillin pro ml) suspendiert. Man schüttelt bei 37 °C und 220 rpm für 6-8 h.
- Die Vorkultur (ca. 3-5 ml, je nach Dichte der Kultur) wird in 750 ml oder 1 l LB/Amp-Medium geschüttet. Man läßt über Nacht unter ständigem Schütteln (100-120 rpm) bei 37 °C wachsen.
- Aus den gewachsenen Kulturen wird nach der Vorschrift des QIAGEN-Kits die Plasmid-DNA isoliert.

6.1.20 Schneiden mit Pst I

Zum Schneiden von 0.5–1 mg pUC19-Plasmid-DNA mit der gewünschten RNA-Sequenz in einem Volumen von 1 ml geht man wie folgt vor:

- Die Schneidreaktion wird in einem 2 ml PP-Reaktionsgefäß durchgeführt.
- 0.5–1 mg pUC19-Plasmid in wässriger Lösung

- 100 μl 10-f O⁺-Puffer von Fermentas
- 2 U Pst I Restriktionsenzym (Fermentas) pro μg Plasmid
- Mit sterilem H₂O auf 1 ml auffüllen
- 3 h bei 37 °C inkubieren
- Die Vollständigkeit der Schneidreaktion wird anhand eines 0.8% Agarosegels überprüft. Bei unvollständigen Linearisieren wird nochmal jeweils 1 U Pst I pro μg Plasmid zugegeben und eine weitere Stunde inkubiert.

Fällung der linearisierten Plasmid-DNA:

- Man versetzt mit gleichem Volumen einer Phenol:CHCl₃:Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1, v/v/v), vortext und zentrifugiert 2 min bei 16100 g.
- Die wässrige Phase wird in ein neues Eppendorf-Cup überführt, mit gleichem Volumen einer CHCl₃:Isoamylalkohol-Mischung (24:1, v/v) versetzt und gevortext.
- Die wässrige Phase wird abgenommen (ca. 900-1000 μl) und mit dem 0.9-fachen Volumen Isopropanol versetzt.
- Man fällt über Nacht bei -20 °C
- Das ausgefallene Plasmid wird 30 min mit 16100 g (Eppendorf-Zentrifuge) abzentrifugiert; es sollte ein farbloser Niederschlag sichtbar sein. Die überstehende Lösung wird vorsichtig dekantiert. Den Rückstand wird mit 400 μl 70%-EtOH gewaschen. Nach kurzem Zentrifugieren wird die überstehende Lösung vorsichtig abpipettiert.
- Der Niederschlag wird 1 h am Vakuumkonzentrator (SpeedVac) mit Heizung Stufe I getrocknet.
- Das getrocknete Pellet wird in je nach Größe in ca. 100-300 μl Wasser gelöst und anschließend die Konzentration per UV-Absorption bestimmt (6.1.32 auf Seite 200). Bei zu großer Absorption wird die Lösung verdünnt.
- Die Plasmidlösung wird bei -20 °C gelagert.

6.1.21 20 ml Transkription von plasmidischer Templat-DNA

Im Folgenden sind die Bedingungen für die Transkription von u4u6a44hh7_vs bei den optimierten Transkriptionsbedingungen von 40 mM NTPs, 45 mM Magnesiumchlorid, 1.2 μg Plasmid, 6 μl T7-Polymerase (6.2 mg/ml) über 6 h angegeben.

Für andere RNAs sind die angegebenen optimalen Transkriptionsbedingungen entsprechend zu skalieren.

Für einen typischen Reaktionsansatz von 20 ml werden folgende Mengen verwendet:

DNA-Plasmid	248 μ l (600 μ g)
10x T7-Transkriptionspuffer ²	2 ml
ATP-Lösung (221 mM)	905 μ l
CTP-Lösung (595 mM)	337 μ l
GTP-Lösung (304 mM)	658 μ l
UTP-Lösung (312 mM)	641 μ l
PEG 8000 (0.5 g/ml)	3.2 ml
MgCl ₂ (500 mM)	1.8 ml
DTT-Lösung (100 mM)	200 μ l
T7-Polymerase (6.2 mg/ml)	3 ml
IPP-Lösung (20 U)	80 μ l
Wasser	6931 μ l

- Die Lösungen werden in einem PP-Zentrifugenröhrchen (40 ml) in folgender Reihenfolge zusammengegeben: Wasser, PEG8000, 10x T7-Transkriptionspuffer², DTT-Lösung, MgCl₂, NTPs, Plasmid, T7-Polymerase und zum Schluß die IPP-Lösung. Zwischen der Zugabe der einzelnen Lösungen wird das Zentrifugenröhrchen immer wieder auf 37 °C im Heizblock aufgewärmt, um Ausfällungen zu vermeiden.
- Man vortext kurz und inkubiert 5 h bei 37 °C im Wärmeschrank. Nach 2 h wird die Lösung nochmals kurz geschwenkt, meist ist die Mischung zu diesem Zeitpunkt durch ausfallendes Pyrophosphat schon leicht getrübt.

6.1.22 Aufarbeitung einer RNA-Transkription

Im folgenden Abschnitt wird die Aufreinigung einer 10-20 ml Transkription beschrieben. Der Ansatz ist für 2 ml und Transkriptionen mit geringeren Volumina entsprechend zu verringern.

- Die Reaktion wird durch Zugabe einer entsprechenden Menge einer 0.5 M Na-EDTA-Lösung (pH 8.5) beendet, so daß die EDTA-Konzentration ungefähr 50 mM beträgt und damit größer als die eingesetzte Magnesiumionenkonzentration ist. Die trübe Lösung wird klar.
- Man gibt das gleiche Volumen einer 1:1-Mischung von Phenol (äquilibriert mit Wasser) und Chloroform/Isoamylalkohol (25:1, v/v) zu. Die Mischung wird kurz gevortext und dann 10 min bei 5000 g (Heraeus-Zentrifuge) im Kühlraum (+4 °C) zentrifugiert.

- Die wäßrige Phase wird vorsichtig mit Hilfe einer Pipette abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Der Rückstand wird mit 2-5 ml Wasser reextrahiert. Die wäßrigen Phasen werden vereinigt.
- Zu den vereinigten wässrigen Phasen wird das gleiche Volumen einer Chloroform:Isoamylalkohollösung (25:1, v/v) gegeben und geschüttelt. Nach kurzer Zentrifugation (5000 g, 5 min, Heraeus-Zentrifuge) wird die wässrige Phase abgenommen. Die organische Phase wird mit 2 ml Wasser nochmals extrahiert. Die wässrigen Phasen werden vereinigt und in ein oder mehrere Beckmann Zentrifugenröhrchen (29 x 104 mm, Polyallomer, Volumen ca. 40 ml) überführt.
- Zur Fällung der roh-RNA werden die vereinigten wässrigen Phasen mit 0.9 bis 1.0 Volumenteilen kaltem Isopropanol vermischt und über Nacht bei -20 °C gelagert.
- Am nächsten Tag wird die gefällte RNA 1 h bei 25000 rpm im Beckmann-Rotor JA 30.50 Ti abzentrifugiert. An der Wandung wird ein farbloses Pellet sichtbar.
- Die überstehende Lösung wird vorsichtig dekantiert und das zurückgebliebene Pellet wird mit 3 ml 70 %igen EtOH versetzt, kurz gevortext und dann für 30 min bei 25000 rpm (Rotor JA 30.50 Ti, Zentrifuge JM 20) zentrifugiert.
- Die überstehende Lösung wird vorsichtig abpipettiert. Das Pellet wird mit 2 ml 100% EtOH versetzt, kurz gevortext und dann nochmals bei 25000 rpm für 10 min abzentrifugiert.
- Das Ethanol wird vorsichtig abpipettiert und das Pellet 1-2 h am Vakuumkonzentrator (SpeedVac, Heizung Stufe I) getrocknet.
- Das Pellet wird bei -20 °C gelagert.

6.1.23 Präparative Aufreinigung der roh-RNA über PAGE

- Man gießt ein 3 mm starkes, 53 x 43 cm großes PA-Gel. Es wird ein 2 x 35 cm großer Kamm eingesteckt, so daß man problemlos Volumen von 5-10 ml auftragen kann.
- Vor dem Einbau des Gels in die Apparatur zieht man den Kamm heraus, füllt die beiden Kammern mit 1x TBE-Puffer und klemmt zur Kühlung vor die Glasplatte eine 3 mm starke Aluminiumplatte.
- Die Probenflasche des Gels wird vor der Beladung mit Hilfe einer Spritze mit 1x TBE-Puffer gespült.
- Das vorher getrocknete Pellet (6.1.22 auf der vorherigen Seite) der roh-RNA wird in einer 1:1-Mischung von Wasser und Probenpuffer unter intensivem Schütteln gelöst (ca. 1-2 h !). Sollte sich nicht alles lösen, wird bis zur vollständigen Auflösung auf bis zu 5 ml Gesamtvolumen verdünnt.

- Man trägt die gelöste roh-RNA gleichmäßig mit einer Pipette in die Probestasche auf.
- Die Elektrophorese wird mit einer Leistung von 40-60 Watt an einem Stromversorgungsgerät mit einer Maximalspannung von 3000 V gestartet und läuft über Nacht. Die Leistung wird je nach Länge der zu trennenden RNA variiert: Für 30mere reichen ca. 40 W, für 60mere sind eher 50-60 W anzuraten.
- Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel vorsichtig von den Glasplatten entfernt und in Folie eingepackt (Dow Saran-Wrap). Man legt das eingepackte Gel auf mit Fluoreszenzindikator behandelten Kieselgelplatten (Roth, DC-Fertigschichten SIL G-25 UV, $\lambda=254$ nm, 20 x 20 cm) und macht die RNA-Banden durch Beleuchten mit einer UV-Lampe (Herolab UV-Handlampe, $\lambda=254$ nm) bei abgedunkeltem Licht sichtbar und markiert sie mit einem Filzschreiber auf der Folie (Abb. 6.5 auf der nächsten Seite).
- Die markierten Banden werden anschließend mit einem Skalpell auf eine Größe von 5 mm x 5-7 cm (Breite x Länge) zugeschnitten und mit einer Pinzette vorsichtig aus dem Gel gelöst.
- Die Gelstücke werden entweder sofort in die Elektroelutionskammern (6.1.24) gepackt oder können alternativ bei -20 °C für maximal einen Tag gelagert werden.

6.1.24 Elektroelution der aufgereinigten RNA aus Polyacrylamidgelen

Es wird eine EluTrap Elektroelutionskammer der Firma Schleicher & Schüll verwendet. Vier Elutionskammern passen in eine Elektrophoresekammer. Die Elektroelution wird im Kühlraum bei $+4$ °C durchgeführt.

- Die Kammern werden vom Pluspol beginnend mit den Membranen BT1, BT2 und nochmals BT1 bestückt (Abb. 6.6 auf Seite 193). Dann werden die Gelstücke mit der Pinzette zum Pluspol hin eingelegt. Die fertigen Kammern werden in die Elektrophoresekammer eingesetzt.
- Man füllt die Elektrophoresekammer und die Elutionskammern mit 1x TBE-Puffer soweit auf, daß die Gelstücke vollständig bedeckt sind.
- Die Kammer wird geschlossen und die Elektrophorese gestartet. Der Strom sollte im Bereich von 40-45 mA liegen, jedoch 50 mA nicht überschreiten. Daher ist eine regelmäßige Überprüfung der Stromstärke alle 15-30 min sinnvoll, um eine Erwärmung des Puffers und damit verbundenen Verlusten bei der Elektroelution zu vermeiden.

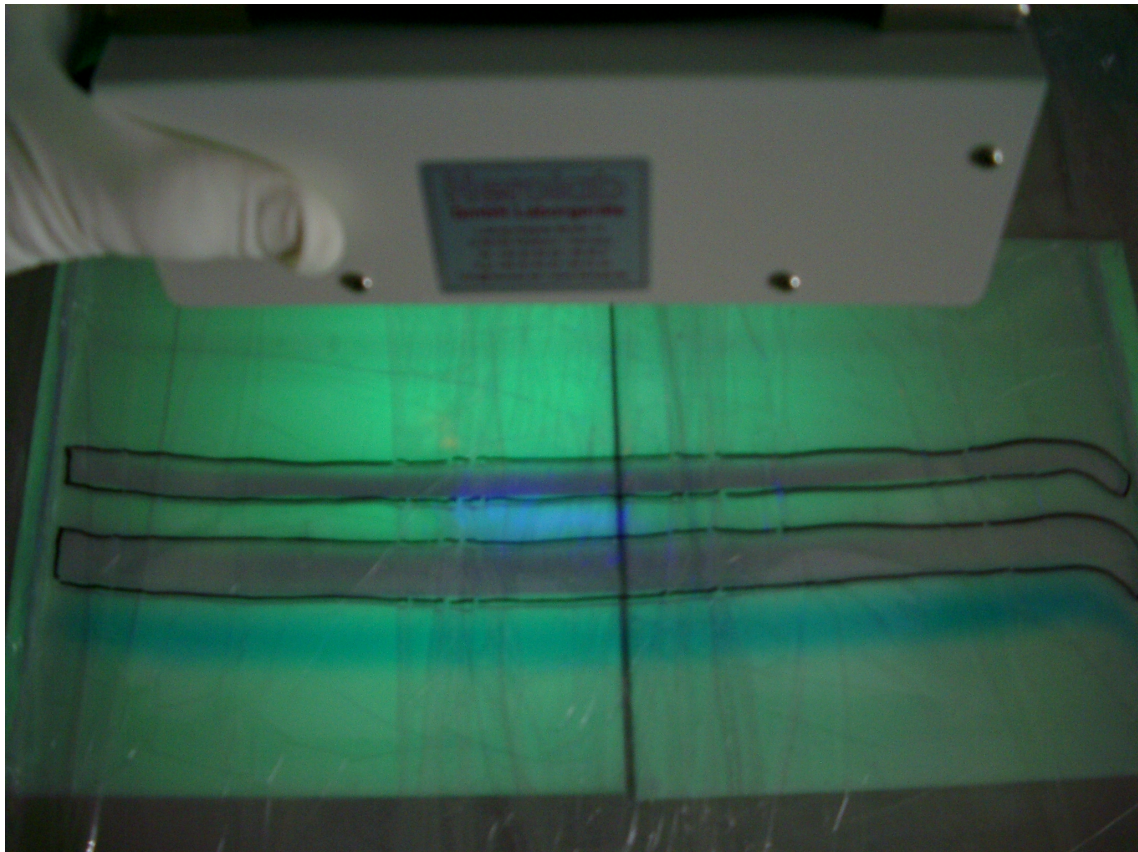


Abbildung 6.5: Aufnahme eines präparativen PA-Gels beim UV-Shadowing zum Sichtbarmachen der RNA-Banden. Hierzu wird eine UV-Handlampe verwendet. Die RNA-Banden werden mit Filzschreiber auf der Folie markiert.

- Nach ca. 3 h wird ein Gelstück aus der Kammer entnommen und per UV-Shadowing auf den RNA-Gehalt überprüft. Die eluierte RNA wird aus der Sammelkammer zwischen BT1- und BT2-Membran am Pluspol entnommen und die Kammer mit frischem 1x TBE-Puffer aufgefüllt.
- Sobald keine RNA im Gel mehr nachgewiesen werden kann (ca. 6 h), werden die Kammern für 20 s umgepolt, um an der Membran haftende RNA in Lösung zu bringen.

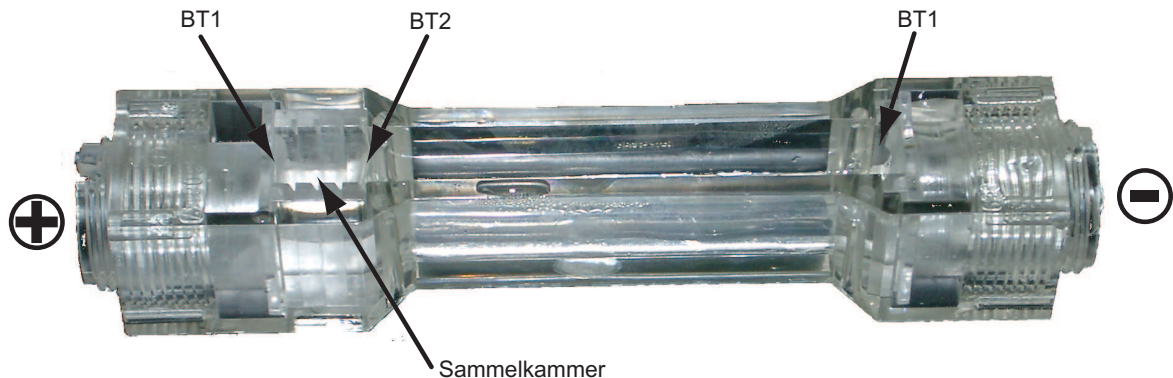


Abbildung 6.6: Elutionskammer für die Elektroelution. BT1, BT2 bezeichnet die Membranen. Die Kammer, in der die eluierte RNA gesammelt wird, liegt zwischen BT1 und BT2.

- Die gesammelten RNA-Fractionen aus den Kammern werden vereinigt und mit 5 M NaCl-Lösung auf eine NaCl-Konzentration von 0.3 M gebracht.
- Die RNA wird durch Zugabe von 0.9-1 Volumenteilen Isopropanol über Nacht im Gefrierschrank gefällt.
- Die gefällte RNA wird am nächsten Tag 1 h bei 25000 rpm im Rotor JA 30.50 Ti abzentrifugiert. Man sieht ein farbloses Pellet.
- Die überstehende Lösung wird vorsichtig abgegossen und der Rückstand mit 2.5 ml 70 %igen EtOH gewaschen.
- Man zentrifugiert nochmals für 30 min mit 25000 rpm im Rotor JA 30.50 Ti. Die überstehende Lösung wird danach vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Den farblosen Rückstand trocknet man für 1-2 h im Vakuumkonzentrator (Heizung Stufe I).
- Die getrocknete RNA wird in Wasser aufgelöst. Die Konzentration wird per UV-Absorption (6.1.32 auf Seite 200) bestimmt.

6.1.25 Schneidreaktion mit HH-Ribozymen

Für die Schneidreaktion der Substrat-RNAs mit den entsprechenden Hammerhead-Ribozymen wird unter folgenden Bedingungen gearbeitet. Die gereinigten RNAs werden in Wasser gelöst und auf eine Konzentration von 0.5 bis 5 mM eingestellt, um das Volumen gering zu halten. Der Puffer besteht aus folgenden Bestandteilen: 40 mM TRIS, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA und einem pH-Wert von 7.4.

Analytisch

Um die Schneidreaktion zu testen, wird eine Konzentration von 50 μM für die Substrat-RNA verwendet. Das entsprechende Ribozym wird in den entsprechenden Verhältnissen (1:1, 1:2 etc.) zugegeben. Im Folgenden werden die Bedingungen für die Schneidreaktion einer Substrat-RNA mit einem HH-Ribozym im Verhältnis 1:1 und eine Magnesiumionenkonzentration von 25 mM angegeben.

Substrat-RNA (0.5 mM)	2 μl
HH-Ribozym (0.5 mM)	2 μl
TRIS (0.5 M, pH 7.4)	1.6 μl
NaCl-Lösung (1 M)	2 μl
EDTA-Lösung (100 mM)	0.4 μl
MgCl ₂ -Lösung (1 M)	0.5 μl
H ₂ O	11 μl

- Die Lösungen werden bis auf die Magnesiumchloridlösung zusammengegeben und für 3 min auf 85 °C erhitzt. Man läßt anschließend im Heizblock auf 37 °C abkühlen.
- Zugabe der Magnesiumchloridlösung und durchmischen der Lösung.
- Bei 37 °C inkubieren. Zur Überprüfung der Reaktion werden in regelmäßigen Abständen Aliquote von 0.5 μl entnommen und mit EDTA-Lösung gestoppt.
- Auf einem denaturierenden Gel wird das Aliquot zusammen mit der Substrat-RNA und dem HH-Ribozym als Referenz aufgetragen.

Präparativ

Die Schneidreaktion wird in einem Volumen von 1 ml und einer Substrat-Konzentration von 0.1 mM durchgeführt. Folgende Mengen wurden eingesetzt:

Substrat-RNA (200 μM)	250 μl
HH-Ribozym (486 μM)	206 μl
TRIS (0.5 M, pH 7.4)	80 μl
NaCl-Lösung (5 M)	20 μl
EDTA-Lösung (100 mM)	20 μl
MgCl ₂ -Lösung (1 M)	25 μl
H ₂ O	399 μl

- Die Lösungen bis auf die Magnesiumchloridlösung. werden in einem 2 ml PP-Reaktionsgefäß zusammengegeben.
- Man erhitzt für 3 min auf 85 °C und läßt anschließend im Heizblock auf 37 °C abkühlen.

- Zugabe der Magnesiumchloridlösung, die Mischung wird kurz gevortext.
- Man inkubiert bei 37 °C für vier Stunden (Reaktionskontrolle per denaturierendem Gel).
- Die Schneidreaktion wird durch Zugabe von 100 μl 0.5 M EDTA-Lösung (pH 8.5) beendet und 1 ml Formamidpuffer gestoppt.
- Zur weiteren Reinigung des Reaktionsgemisches wird die Lösung auf ein präparatives Gel geladen.

6.1.26 Schneidreaktion mit DNA-Enzym

Für die Schneidreaktion von u4u6a43de1_vs mit de1_3 wurden jeweils 25 μl der RNA bzw. DNA in einem Puffer von 20 mM MgCl_2 , 150 mM NaCl, 50 mM EPPS bei einem pH-Wert von 7.5 zusammengegeben. Die Konzentration der RNA betrug dabei 2 μM ; das DNA-Enzym wurde im Verhältnis 1:1 verwendet. Die beiden getrennten Lösungen werden auf 37 °C erwärmt und zum Start der Schneidreaktion zusammengegeben. Man inkubiert bei 37 °C und entnimmt in bestimmten Zeitabständen Aliquote von 0.5 μl zur Reaktionskontrolle.

6.1.27 Dephosphorylierung von RNA am 5'-Ende

Die Dephosphorylierung wird mit Phosphatase vom Kalb (*Calf intestinal Phosphatase*, CIP) von New England Biolabs durchgeführt. Es werden ungefähr 100 μg RNA in einem Gesamtvolumen von 50 μl eingesetzt. Folgende Mengen werden eingesetzt:

Substrat-RNA (ca. 100 μg)	11 μl
10x NEB3-Puffer	5 μl
CIP (10000 U/ml)	5 μl
H ₂ O	29 μl

- Die Lösungen werden in folgender Reihenfolge zusammengegeben: Wasser, 10x NEB3-Puffer, RNA-Lösung und CIP.
- Man vortext kurz und inkubiert für 2:30 h bei 37 °C im Wärmeschrank.
- Die Reaktion wird durch Zugabe von 30 μl 0.1 M EDTA-Lösung und 20 μl Wasser gestoppt.
- Man gibt 50 μl einer 1:1-Mischung von Phenol (äquilibriert mit Wasser) und Chloroform/Isoamylalkohol (25:1, v/v) zu. Die Mischung wird kurz gevortext und dann 7 min mit 16100 g zentrifugiert.

- Die wässrige Phase wird vorsichtig mit Hilfe einer Pipette abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und mit dem gleichen Volumen einer Chloroform:Isoamylalkohollösung (25:1, v/v) geschüttelt. Nach kurzer Zentrifugation (16100 g 1 min, Eppendorf-Zentrifuge) wird die wässrige Phase abgenommen.
- Zur Fällung der roh-RNA wird wässrige Phase mit dem 3.2fachen Volumen EtOH vermischt und über Nacht bei -20 °C gelagert.
- Am nächsten Tag wird die gefällte RNA 45 min bei 16100 g zentrifugiert. An der Wandung wird ein farbloses Pellet sichtbar.
- Die überstehende Lösung wird vorsichtig dekantiert und das zurückgebliebene Pellet wird mit 50 μ l 70 %igen EtOH versetzt, kurz gevortext und dann für 10 min bei 16100 g zentrifugiert.
- Das Ethanol wird vorsichtig abpipettiert und das Pellet 1 h im Vakuumkonzentrator (SpeedVac, Heizung Stufe I) getrocknet.
- Das Pellet wird in 20 μ l Wasser gelöst.

6.1.28 Markierung mit γ -³²P-ATP

Alle Arbeiten werden unter ständiger Kontrolle mit einem Flächendetektor und hinter einer Plexiglasabschirmung durchgeführt.

Es werden Mischungen aus 15 μ l Kinasierungslösung und 5 μ l RNA-Lösung zusammengegeben.

- Für 45 μ l Kinasierungslösung werden folgende Lösungen zusammengegeben:

10x NEB-Puffer	6 μ l
γ - ³² P-ATP-Lösung (1.7 MBq-Aktivität)	4 μ l
T4-Polynucleotid Kinase (10000 U/ml)	6 μ l
H ₂ O	29 μ l
- Für die Phosphorylierung werden 5 μ l RNA-Lösung (ca. 25 μ g) und 5 μ l Kinasierungslösung gemischt und 1 h bei 37 °C im Wärmeschrank hinter einer Plexiglasabdeckung inkubiert.
- Die Reaktion wird durch Zugabe von 20 μ l Formamidpuffer gestoppt.
- Die RNA wird durch Gelelektrophorese über ein semipräparatives Gel von 20 x 20 cm und 1.5 mm Dicke aufgetrennt
- Die RNA-Banden werden über einen Phosphorimager sichtbar gemacht und anschließend angeschnitten.
- Aus den Gelstücken wird die RNA durch Elution mit 0.3 M Natriumchloridlösung herausgelöst und durch Zugabe von Isopropanol über Nacht bei -20 °C gefällt.

6.1.29 NMR-Proben

Lösungen für NMR-Messungen

In der folgenden Tabelle sind die Bedingungen der untersuchten NMR-Proben der verschiedenen RNAs angegeben.

RNA	c(RNA)	Kaliumphosphatpuffer	NaCl	EDTA	D ₂ O	pH
u4u6a42	1 mM	10 mM	100 mM	-	10 %	6.2
u4u6a44hh7	0.62 mM	10 mM	-	2 mM	10 %	6.6
u4u6a46p hh2	0.38 mM	10 mM	-	2 mM	10 %	6.6
u4u6achem	1 mM	-	-	-	10 %	7.6

Gemessene Spektren

Alle Messungen wurden bei einer Temperatur von 290 K durchgeführt, da die Auflösung der Iminosignale am besten war. Es wurden ein- und zweidimensionale Jump & Return-Spektren mit folgenden Parametern aufgenommen:

Spektrale Weite [Hz]	14367.82
Relaxationsdelay	1.5 s
Mischzeit 2D-NOESY	300 ms
Aufgenommene Punkte, real (TD1)	512
Aufgenommene Punkte, real (TD2)	4096
Anzahl der Scans pro Inkrement (NS)	64
Prozessierte Punkte, real (SI1)	1024
Prozessierte Punkte, real (SI2)	4096
J&R-Delay, τ	40 μ s
Prozessierungsfunktion (W1)	QSINE, SSB=2.5
Prozessierungsfunktion (W2)	EM, lb=2.0

6.1.30 Agarosegele

- Für ein 0.9 %iges Agarosegel werden in einem 100 ml Erlenmeyerkolben 0.45 g Agarose eingewogen.
- Man gibt 50 ml 1x TBE-Lösung hinzu und erwärmt in der Mikrowelle unter gelegentlichem Umschwenken zum Sieden bis eine klare Lösung entsteht.
- Die fertige Agarose-Lösung wird auf ca. 60 °C abkühlt und mit 2 μ l EtBr-Lösung (Roth) versetzt.
- Die Lösung wird nun in die Apparatur gegossen. Nach ca. 15-30 min ist das Gel fest.

6.1.31 DNA/RNA-Polyacrylamidgele

Verwendete Lösungen

40% Acrylamidlösung

Es wird Acrylamid 4K - Lösung (40%) - Mix 19:1 der Firma AppliChem, Darmstadt verwendet.

20% denaturierendes PAGE mit 7M Harnstoff

Für einen Liter Lösung werden folgende Mengen benötigt:
420.42 g Harnstoff ($M=60.06$ g/mol)
500 ml 40% Acrylamidlösung
100 ml 10x TBE-Puffer
mit Wasser auf 1 l auffüllen.

15% denaturierendes PAGE mit 7M Harnstoff

Für einen Liter Lösung werden folgende Mengen benötigt:
420.42 g Harnstoff ($M = 60.06$ g/mol)
375 ml 40% Acrylamidlösung
100 ml 10x TBE-Puffer
mit Wasser auf 1 l auffüllen.

12% denaturierendes PAGE mit 7M Harnstoff

Für einen Liter Lösung werden folgende Mengen benötigt:
420.42 g Harnstoff ($M=60.06$ g/mol)
300 ml 40% Acrylamidlösung
100 ml 10x TBE-Puffer
mit Wasser auf 1 l auffüllen.

10x TBE-Puffer

Für einen Liter Lösung werden folgende Mengen benötigt:
108 g TRIS (Base) ($M=121.14$ g/mol)
55 g Borsäure ($M=61.83$ g/mol)
20 ml einer 0.5 M Na-EDTA-Lösung pH 8.0
mit Wasser auf 1 l auffüllen.

1x TBE-Puffer

100 ml 10x TBE-Puffer werden mit Wasser auf einen Liter verdünnt.

10% (w/v) APS-Lösung

1 g Ammoniumperoxodisulfat (APS) ($M=228.2$ g/mol) werden mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt.

Formamid-Gelpuffer

Für 50 ml werden folgende Mengen benötigt:

48 ml Formamid p.a.

2 ml Wasser

0.5 % Bromphenolblau (250 mg)

0.5 % Xylencyanol (250 mg)

Gießen der Gele

Entsprechend Tabelle 6.1 werden zu der Acrylamidlösung unter Rühren die APS-Lösung und das TEMED gegeben. Die Lösung wird dann luftblasenfrei zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Abschließend wird der Kamm eingesteckt. Man läßt ca. 30-45 min polymerisieren. Zur Überprüfung der Polymerisation schaut man sich den Rest der Polyacrylamidlösung an.

Abmessungen [cm x cm, mm]	Volumen fertige Acrylamidlösung [ml]	Volumen 10%ige APS-Lsg. [μ l]	Volumen TEMED [μ l]
20 x 20, 0.3	20	160	10
20 x 20, 1	50	400	25
20 x 20, 1.5	70	560	35
45 x 31, 0.3	50	400	25
45 x 31, 1	150	1200	75
53 x 43, 1,5	350	2800	180
53 x 43, 3	700	5600	350

Tabelle 6.1: Benötigte Mengen zum Gießen von Polyacrylamidgelen

5% natives Polyacrylamidgel

Für 10 ml werden folgende Mengen benötigt:

- 1.6 ml 40% Acrylamidlösung 19:1
- 8.4 ml 1x TBE-Lösung
- Zum Starten der Polymerisation: 15 μ l 10%-APS-Lösung und 20 μ l TEMED.

- Die hergestellte Lösung wird in eine Minigel-Apparatur gegossen. Man läßt 30–45 min polymerisieren.
- Das Gel läuft bei konstant 70 V ca. 1:10 h.

10% natives Polyacrylamidgel

Für 10 ml werden folgende Mengen benötigt:

- 3.2 ml 40% Acrylamidlösung 19:1
- 6.8 ml 1x TBE-Lösung
- Zum Starten der Polymerisation: 15 μ l 10%-APS-Lösung und 20 μ l TEMED.
- Die hergestellte Lösung wird in eine Minigel-Apparatur gegossen. Man läßt 30–45 min polymerisieren.

Anfärben von Polyacrylamidgelen mit Ethidiumbromid

Die Gele werden unter leichtem Schütteln (Schüttler: 150 rpm) in 1x TBE-Lösung mit EtBr (pro 100 ml werden 5 μ l EtBr-Lösung (1% in H₂O) zugesetzt) für ca 15-30 min angefärbt.

6.1.32 Konzentrationsbestimmung mit UV-Spektroskopie

Die Konzentrationsbestimmungen wurden mit einem Hewlett-Packard 8453 UV-Spektrometer durchgeführt.

Bestimmung der Konzentration von langen Nukleinsäuren (> 25 nt)

- Für den Nullabgleich wird in eine Küvette (1 cm Schichtdicke, 1 ml Volumen) 500 μ l Wasser gefüllt und ein Referenzspektrum gemessen.
- Ein Aliquot, ca. 1-2 μ l der RNA- oder DNA-Stammlösung, wird zu den 500 μ l Wasser in der Küvette (Schichtdicke 1 cm) gegeben. Man schüttelt kurz und mißt dann die Absorption bei 260 nm. Sollte die Absorption außerhalb des Bereichs von 0.1–1.0 liegen, ist die Lösung entsprechend zu verdünnen bzw. ein kleineres oder größeres Aliquot zu verwenden.

- Zur Berechnung der Konzentration von DNA und großer RNA, in denen die Verteilung der Nukleotide annähernd gleich ist, werden folgende Standardwerte für die Konzentration bei einer Absorption von 1 bei $\lambda=260$ nm verwendet [379]: dsDNA 50 $\mu\text{g/ml}$, ssDNA 33 $\mu\text{g/ml}$ und für RNA 40 $\mu\text{g/ml}$. Die Konzentration der Nukleinsäuren in $\mu\text{g/ml}$ berechnet sich dann wie folgt:

$$c(\text{Nukleinsäure}) = c(\text{Standard}) \cdot A_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \quad (6.1)$$

Für die Masse in mg ergibt sich:

$$m(\text{Nukleinsäure}) = c(\text{Nukleinsäure}) \cdot \text{Volumen der Stammlsg.} \quad (6.2)$$

Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden (< 25 nt)

Bei kürzeren Oligonukleotiden gelten die obigen Werte nicht mehr [380]. Die Berechnung erfolgt über das Lambert-Beer-Gesetz. Zuerst muß der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{Oligo,260}$ des Oligonukleotids bei der Wellenlänge $\lambda=260$ nm berechnet werden. Dieser setzt sich aus der Summe der molaren Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleotide im Oligonukleotid zusammen. Für die Berechnung für die einzelnen Nukleotide (A: Adenosin, C: Cytosin, G: Guanosin und U: Uridin) wurden folgende Werte [381] verwendet : $\epsilon_A = 15.02 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_C = 7.07 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_G = 12.08 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_U = 9.66 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

$$\epsilon_{Oligo,260} = n_A \cdot \epsilon_A + n_C \cdot \epsilon_C + n_G \cdot \epsilon_G + n_U \cdot \epsilon_U \quad (6.3)$$

n bezeichnet die Anzahl des jeweiligen Nukleotids im Oligomer. Über das Lambert-Beer-Gesetz wird aus der gemessenen Absorption und der bekannten Schichtdicke l die Konzentration in mM^{-1} des Oligonukleotids bestimmt werden:

$$c(Oligo) = \frac{A_{260}}{\epsilon_{Oligo,260} \cdot l} \quad (6.4)$$

Für die Masse des gelösten Oligonukleotids ergibt sich schließlich:

$$m(Oligo) = c(Oligo) \cdot V(\text{Küvette}) \cdot M(Oligo) \quad (6.5)$$

Bestimmung der Reinheit über das Verhältnis A_{260}/A_{280}

Über das Verhältnis der Absorption bei $\lambda=260$ nm und $\lambda=280$ nm kann man die Reinheit der Nukleinsäure abschätzen. Für reine RNA ohne Proteinverunreinigungen findet man einen Wert von 2.0, für DNA liegt er bei 1.8. Die Bestimmung der Reinheit erfolgt in gepufferter Lösung von 1–3 mM Na_2HPO_4 bei pH 8.0–8.5 [382].

Berechnung des Molekulargewichts von Oligonukleotiden

Die molare Masse der mittels T7-Polymerase synthetisierten RNA-Oligonukleotide wurde nach folgender Formel berechnet:

$$M(\text{Oligo}) = (A_n \cdot 329.21\text{g/mol}) + (U_n \cdot 306.17\text{g/mol}) + (C_n \cdot 305.18\text{g/mol}) \\ + (G_n \cdot 345.21\text{g/mol}) + 177.96\text{g/mol}$$

X_n gibt dabei die Anzahl des jeweiligen Nukleotids im Oligonukleotid an. Durch Addition von 177.96 g/mol am Ende wird die Triphosphatgruppe am 5'-Ende berücksichtigt

6.1.33 Verwendete Chemikalien

Alle Chemikalien entsprachen der Qualität p.a. oder Biochemica (d.h. auf mikrobiologische Verunreinigungen getestet) und wurden von den Firmen AppliChem, Boehringer-Ingelheim, Fermentas, Fluka, Merck, New England Biolabs, Roche, Roth, Sigma-Aldrich und Stratagene bezogen.

6.1.34 Verwendete Lösungen

Alle Lösungen wurden entweder mit autoklaviertem Wasser oder nach dem Ansetzen autoklaviert. Der pH-Wert wurde - soweit möglich - mit den entsprechenden Säuren der gelösten Salze eingestellt.

10x Phosphorylierungspuffer

Für 100 ml Lösung werden folgende Mengen benötigt:
800 mM TRIS, entspricht 9.69 g ($M=121.14$ g/mol)
200 mM KCl, entspricht 1.49 g ($M=74.56$ g/mol)
200 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, entspricht 4.06 g ($M=203.30$ g/mol)
Mit Salzsäure auf pH 8.3 einstellen und autoklavieren.

10x T7-Transkriptionspuffer I

Für 100 ml Lösung werden folgende Menge benötigt:
400 mM TRIS, entspricht 4.84 g ($M=121.14$ g/mol)
10 mM Spermidin, entspricht 145 mg ($M=145.25$ g/mol)
0.1 % Triton X-100 (v/v)
Mit Salzsäure auf pH 7.5 einstellen.

10x T7-Transkriptionspuffer²

Für 100 ml benötigt man:

400 mM Tris-HCl, entspricht 6.3 g ($M=157.60$ g/mol)

10 mM Spermidin, entspricht 145 mg ($M=145.25$ g/mol)

50 mM DTT, entspricht 771 mg ($M=154.25$ g/mol)

0.1 % Triton X-100 (v/v)

Mit Salzsäure auf pH 8.0 einstellen.

2 % BSA-Lösung

20 mg BSA werden in Wasser gelöst und auf 1 ml aufgefüllt.

10 M Ammoniumacetatlösung, pH 6.8

100 ml Lösung: 77.08 g ($M=77.08$ g/mol) Ammoniumacetat werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

0.5 M EDTA-Lösung (pH 8.0)

18.16 g EDTA-Na ($M=372.24$ g/mol) werden in 80 ml Wasser unter Rühren suspendiert. Dann gibt man ca. 2 g NaOH-Perlen ($M=40.00$ g/mol) hinzu, bis der pH 8.0 erreicht ist. Anschließend füllt man mit Wasser auf 100 ml auf.

6.1.35 Verwendete Geräte

Zentrifugen

Beckmann-Coulter Avanti J-20 (bis 20000 rpm) und J-30I (bis 30000 rpm) mit den folgenden Rotoren: JLA 8.1000, 9.1000 (1 l), JLA 16.250 (250 ml), JA 25.50 Ti und JA 30.50 Ti (50 ml).

Eppendorf Centrifuge 5415D (bis 16100 g, 13200 rpm) für Reaktionsgefäße von 1.5-2 ml

Qualitron Tischzentrifuge (bis 7000 rpm) für Reaktionsgefäße von 1.5-2 ml

Heraeus Biofuge primo (bis 10000 rpm) für Gefäße von 10-50 ml

Eppendorf Centrifuge 5804 (bis 9000 rpm) für Gefäße von 10-50 ml

Stromversorgungen für Gelelektrophorese

Bio-Rad PowerPac 1000 bzw. 3000 (1000 bzw. 3000 V max.)

GIBCO BRL PS9009 (bis 3000 V)

Schüttler für Kulturen

B. Braun Biotech International Certomat R mit zugehörigen Thermostat Certomat H
Infors Multitron HT

Trocknung

Christ Alpha 2-4 mit Vacuubrand RC 4 bzw. RC 5 Pumpe
Eppendorf Concentrator 5301

PCR

HYBAID PCRSprint

UV-Messung

Beckman DU-70 Spectrophotometer
Hewlett-Packard 8453 inkl. Temperatur-Controller 89090A

Erwärmen

NeoLab Heizblock neoBlock 1 2-2503
Gebrüder Liebisch Heizblock Typ SON-DA

HPLC

JASCO-Anlage:

- MD-2010Plus, Multiwellenlängen Detektor inkl. analytischer und präparativer Meßzelle
- PU-2080Plus, HPLC-Pumpe
- LG-2080-O4, Quarternärer Gradientenmischer
- DG-2080-54, on-line Entgaser
- AS-2055Plus, Auto-Sampler
- Säulenofen der Firma Jetstream
- Advantec SF-3120 Super Fraction Collector

pH-Messung

Knick pH-Meter 766 Calimatic mit Mettler Toledo Elektrode InLab 423 pH, Elektrolyt 9811, pH 0..14, 0..80 °C

6.1.36 Quelltexte für Protokolle/Programme

PCR-Protokoll

HYBAID PCRSprint

Verwendetes Programm für die Durchführung der PCR:

```
STAGE 01 STEP 01  
TEMP 95.0  
TIME 0:15:00
```

```
STAGE 01 STEP 02  
TEMP 04.0  
TIME 0:00:00
```

```
STAGE NUMBER 01  
NUMBER OF CYCLES 01  
HOLDTEMP 04.0
```

```
STAGE 02 STEP 01  
TEMP 95.0  
TIME 0:00:50
```

```
STAGE 02 STEP 01  
TEMP 95.0  
TIME 0:00:50
```

```
STAGE 02 STEP 03  
TEMP 72.0  
TIME 0:01:00
```

```
STAGE 02 STEP 04  
TEMP 04.0  
TIME 0:00:00
```

```
STAGE NUMBER 02  
NUMBER OF CYCLES 25  
HOLDTEMP 04.0
```

```
STAGE 03 STEP 01  
TEMP 72.0  
TIME 0:05:00
```

```
STAGE 03 STEP 02  
TEMP 04.0  
TIME 0:00:00
```

```
STAGE NUMBER 03  
NUMBER OF CYCLES 01  
HOLDTEMP 04.0
```

```
STAGE 04 STEP 01  
TEMP 04.0  
TIME 0:00:00
```

Quelltext des CGI-Skriptes rna_design.cgi zur Generierung von DNA-Sequenzen

```
#!/usr/bin/perl -w

#Erstellt fuer eine gegebene RNA-Sequenz die entsprechenden
#DNA-Sequenzen, die fuer eine Klonierung in pUC19 mit den
#Schnittstellen EcoRI und HindIII und Linearisierung an
#PstI

use CGI qw(:standard);

if (param()){
    my $rna_name = param(rna_name);
    my $rna_sequenz=param(rna_sequenz);

    #Ueberpruefung, ob RNA eingegeben wurde
    if ($rna_sequenz =~ /[ACGU\s+]/i) {
        print header();
        print "<html><head><title>RNA-Design</title>
              </head><body bgcolor=\"palegreen\">
              <p><h1>Sie haben einen Fehler bei der Eingabe der RNA-Sequenz
              gemacht! <br />
              Bitte geben Sie die Sequenz im Formular nochmal ein.</h1></p>
              <form method=\"post\" action=\"/cgi-bin/rna_design.cgi\">
              <table rules=\"none\">
              <tr>
              <th align=\"left\">Name der Sequenz</th>
              <td><input type=\"text\" name=\"rna_name\" maxlength=\"50\" />
              </td>
              </tr>
              <tr>
              <th align=\"left\" valign=\"top\">RNA-Sequenz 5'->3'</th>
              <td><textarea rows=\"10\" cols=\"50\" name=\"rna_sequenz\">
              </textarea></td>
              </tr>
              <tr>
              <td><input type=\"submit\" value=\"RNA designen\" /></td>
              <td><input type=\"reset\" value=\"Eingabe zuru̇cksetzen\" />
              </td>
              </tr>
              </table>
              </form>
              </body></html>";

    } else {
        #Entfernen von Leerzeichen aus der Sequenz.
        $rna_sequenz =~ s/\s+//g;

        #Bestimmung der Laenge, Zusammensetzung und MW der eingegebenen RNA
        my $laenge_rna_name = length $rna_sequenz;
        #Zaehlen der Basen
        my $rna_a = ($rna_sequenz =~ tr/Aa//);
        my $rna_c = ($rna_sequenz =~ tr/Cc//);
        my $rna_g = ($rna_sequenz =~ tr/Gg//);
        my $rna_u = ($rna_sequenz =~ tr/Uu//);

        #Berechnung des Molekulargewichtes
        my $mw_rna_name = (($rna_a * 329.205941) + ($rna_c * 305.181241) +
                          ($rna_g * 345.205341) + ($rna_u * 306.166001) +
                          176.967691 + 1.00794);

        #Namen fuer die DNA-Oligos
        my $oligo_top = $rna_name . '_top';
    }
}
```



```

my $oligo_bot = $rna_name . '_bot';

#Umwandeln in DNA-Sequenz 5'->3'
my $dna = $rna_sequenz;
$dna =~ tr/Uu/Tt/;
(my $dna_com = $dna) =~ tr/ACGTacgt/TGCAtgca/;
my $dna_comp = reverse $dna_com;

#Verknuepfung mit T7-Promotor
my $t7_promotor_top_5_3 = 'TAATACGACTCACTATA';
my $dna_top_t7 = $t7_promotor_top_5_3 . $dna;

#Komplement bilden
my $dna_bot_t7_3_5 = $dna_top_t7;
$dna_bot_t7_3_5 =~ tr/ACGTacgt/TGCAtgca/;

#Restriktionsschnittstellen anhaengen:
my $dna_top_5_3 = 'AATTC' . $dna_top_t7 . 'CTGCAGA';
my $dna_bot_3_5 = 'G' . $dna_bot_t7_3_5 . 'GACGTCTCGA';
my $dna_bot_5_3 = reverse $dna_bot_3_5;

#Laenge der DNA-Oligos
my $laenge_dna_top = length $dna_top_5_3;
my $laenge_dna_bot = length $dna_bot_5_3;

#DNA-Fragmente fuer die farbige Ausgabe
#mit 2 am Ende: Fuer die Transkriptionsdarstellung
#Zuerst der Top-Strand
(my $EcoRI_top = substr($dna_top_5_3, 0, 5)) =~ s/([ACGT]{3})/$1 /gi;
my $EcoRI_top2 = substr($dna_top_5_3, 0, 5);
(my $t7_top = substr($dna_top_5_3, 5, 17)) =~ s/([ACGT]{3})/$1 /gi;
my $t7_top2 = substr($dna_top_5_3, 5, 17);
(my $dna_top = $dna) =~ s/([ACGT]{3})/$1 /gi;
my $dna_top2 = $dna;
(my $PstI_top = substr($dna_top_5_3, -7, 6)) =~ s/([ACGT]{3})/$1 /gi;
my $PstI_top2 = substr($dna_top_5_3, -7, 6);
(my $HindIII_top = substr($dna_top_5_3, -1, 1)) =~ s/([ACGT]{3})/$1 /gi;
my $HindIII_top2 = substr($dna_top_5_3, -1, 1);
#Weiter mit dem Bottom-Strand
(my $EcoRI_bot = substr($dna_bot_5_3, 0, 5)) =~ s/([ACGT]{3})/$1 /gi;
my $EcoRI_bot2 = substr($dna_bot_3_5, -5, 5);
(my $PstI_bot = substr($dna_bot_5_3, 5, 6)) =~ s/([ACGT]{3})/$1 /gi;
my $PstI_bot2 = substr($dna_bot_3_5, -11, 6);
(my $dna_bot = $dna_comp) =~ s/([ACGT]{3})/$1 /gi;
(my $dna_bot2 = $dna_com) =~ s/\s+//g;
(my $t7_bot = substr($dna_bot_5_3, -18, 17)) =~ s/([ACGT]{3})/$1 /gi;
my $t7_bot2 = substr($dna_bot_3_5, 1, 17);
(my $HindIII_bot = substr($dna_bot_5_3, -1, 1)) =~ s/([ACGT]{3})/$1 /gi;
my $HindIII_bot2 = substr($dna_bot_3_5, 0, 1);

#Sequenz der transkribierten RNA
my $rna_trans = $rna_sequenz . 'C';
my $laenge_rna_trans = length $rna_trans;

#Zaehlen der Basen
my $anzahl_a = ($rna_trans =~ tr/Aa//);
my $anzahl_c = ($rna_trans =~ tr/Cc//);
my $anzahl_g = ($rna_trans =~ tr/Gg//);
my $anzahl_u = ($rna_trans =~ tr/Uu//);

#Berechnung des Molekulargewichtes
my $mw_rna_trans = (($anzahl_a * 329.205941) + ($anzahl_c * 305.181241) +
($anzahl_g * 345.205341) + ($anzahl_u * 306.166001) +
176.967691 + 1.00794);

```



```
<p>Farben:<br />
<font color="\#00CC00\" face=\"Courier New, Courier, mono\">
  T7-Promotor<br />
<font color="\#FF0000\">PstI<br />
<font color="\#333333\">RNA-Sequenz<br />
<font color="\#FF00FF\">EcoRI<br />
<font color="\#00FFFF\">HindIII<br />
</font>
</font></font>
</font>
</font></p>
</body></html>";
  }
}
else
{
  print header();
  print "<html><head><title>RNA-Design</title>
    </head><body bgcolor=\"palegreen\">
    <form method=\"post\" action=\"/cgi-bin/rna_design.cgi\">
    <table rules=\"none\">
    <tr>
    <th align=\"left\">Name der Sequenz</th>
    <td><input type=\"text\" name=\"rna_name\" maxlength=\"50\" />
    </td>
    </tr>
    <tr>
    <th align=\"left\" valign=\"top\">RNA-Sequenz 5\'->3\'</th>
    <td><textarea rows=\"10\" cols=\"50\" name=\"rna_sequenz\">
    </textarea></td>
    </tr>
    <tr>
    <td><input type=\"submit\" value=\"RNA designen\" /></td>
    <td><input type=\"reset\" value=\"Eingabe zur&uuml;cksetzen\" />
    </td>
    </tr>
    </table>
    </form>
    </body></html>";
}
```

6.2 Strukturaufklärung von Minigramicidin

6.2.1 NMR-Spektroskopie

Aufnahme und Prozessierung der Spektren

Die NMR-Messungen an Minigramicidin ohne Cäsiumchlorid wurden an einer ca. 4 mM Lösung in Benzol- d_6 und Aceton- d_6 im Verhältnis 10:1 bei einer Temperatur von 300 K durchgeführt.

Der Komplex wurde in einer ca. 1.5 mM, mit Cäsiumchlorid gesättigten $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OH}$ -Lösung (3:1, v/v) bei 290 K gemessen.

Alle Messungen wurden an einem 600 MHz Spektrometer (Firma Bruker, Karlsruhe) an der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen wurden auf die Aromatensignale von Benzol bei 7.15 ppm bzw. Chloroform bei 7.25 ppm kalibriert.

Die Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung der Iminoprotonen wurde anhand einer Temperaturreihe von eindimensionalen Protonenspektren von 278 bis 293 K in 5 K-Schritten ermittelt.

Die NMR-Daten wurden mit Hilfe des Programms XWINNMR, Version 3.1 (Bruker, Karlsruhe) prozessiert.

Die folgende Tabelle 6.2 auf der nächsten Seite faßt die zur Datenaufnahme und -prozessierung verwendeten Parameter der zweidimensionalen NMR-Experimente an Minigramicidin zusammen.

Zuordnung

Die Signale der Spektren wurden mit Hilfe des Programms Felix 2000 (Accelrys Inc., San Diego, CA) unter Verwendung des Assignment-Moduls und Anwendung etablierter Verfahren [325, 326] zugeordnet.

6.2.2 Strukturrechnung

Die Strukturrechnung erfolgt mit dem Programm X-PLOR (Version 98.1) von Axel T. Brünger [328] mit Modifikationen und Protokollen von Michael Nilges, EMBL, Heidelberg.

Experiment	TD1 ^a TD2 ^a	τ_m [ms] ^b	NS ^c	SI1 ^d SI2 ^d	W1 ^e W2 ^e
Dimer					
DQF-COSY	1024 4096	-	24	2048 4096	QSINE, SSB = 3 QSINE, SSB = 2
TOCSY	512 2048	100 ms	24	1024 4096	EM, lb = 2.0 QSINE, SSB = 2
NOESY	512 2048	40, 80, 150 ms	32	1024 4096	EM, lb = 2.0 QSINE, SSB = 2
Monomer					
DQF-COSY	1024 4096	-	32	2048 4096	EM, lb = 1.5 QSINE, SSB = 2
TOCSY	512 2048	80 ms	40	2048 4096	QSINE, SSB = 2.3 QSINE, SSB = 2
NOESY	512 2048	70, 150, 300 ms	32	2048 4096	QSINE, SSB = 2 QSINE, SSB = 2

Tabelle 6.2: Aufnahme- und Prozessierungsparameter der Messungen von Minigramicidin. Alle Messungen wurden mit einer spektralen Weite von 9090.9 Hz in beiden Dimensionen aufgenommen. Die Temperatur lag bei 300 K für das Dimer und 290 K für das Monomer. a) Aufgenommene Punkte (real), b) Mischzeit, c) Anzahl der Scans pro Inkrement, d) Prozessierte Punkte (real), e) angewandte Prozessierungsfunktionen mit Parametern (EM = e-Funktion, lb = line broadening, Faktor für EM, QSINE = quadratische Kosinusfunktion). Die Spektrometerfrequenz lag bei 600.13 MHz.

Da Minigramicidin mehrere D-Aminosäuren sowie weitere Nicht-Aminosäuren enthält, wurden die Topologie- und Parameterdateien für den Succinatlinker und den Ethanolaminrest angepaßt. Basierend auf den Standard-Kraftfeldern die für NMR-Rechnungen von X-PLOR bereitgestellt werden, wurden für die D-Aminosäuren die Einträge der normalen Aminosäuren übernommen und die Definition der Chiralität in der Topologie-datei invertiert.

Für den Succinatlinker und den Ethanolaminrest wurden zuerst mit dem Programm INSIGHT 2000 (Accelrys Inc., San Diego, CA) die entsprechenden PDB-Dateien der Strukturen erzeugt. Aus diesen wurden mit dem Programm XPLO2D [383–386] die Topologie- und Parameterdateien generiert. Diese wurden dann in die schon vorhandenen Dateien eingefügt.

Da das Minigramicidin aus zwei zueinander symmetrischen kovalent verknüpften Monomeren besteht, mußten für die Erzeugung der zur Strukturrechnung nötigen Strukturdateien (PSF, PDB) der Gesamtstruktur besondere sogenannte Patch-Residues erstellt werden, die eine umgekehrte Verknüpfung der Aminosäuren in C-N-Richtung

und eine Verknüpfung des Succinatlinkers und des Ethanolamins mit den Aminosäuren erlauben.

Für die Auswertung der Strukturen und Anfertigung der Abbildungen wurden die Programme MOLMOL, Version 2K.1 von R. Konradi [337], AQUA und PROCHECK-NMR von R.Laskowski [339] verwendet. Zusätzlich wurden die Ramachandran-Abbildungen für die D-Aminosäuren durch Auslesen der Rückgratwinkel mit Hilfe des Programms INSIGHT 2000 (Accelrys Inc., San Diego, CA) aus den PDB-Dateien und Auswertung mit dem Programm Origin 6.1 (OriginLab Corporation, Northampton, MA) generiert.

Verwendete NOE- und Kopplungsrestraints

Die folgenden Abschnitte listen die für die Strukturrechnungen verwendeten Restraints auf. Es sind jeweils nur die einfachen Sätze angegeben. Aufgrund der Symmetrie des Minigramicidins wurden die Dateien für die tatsächlichen Rechnungen verdoppelt.

NOE-Restraints für das Dimer

```

assign (resi 1 and name H11 and segid "A") (resi 1 and name H21 and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 1 and name H11 and segid "A") (resi 1 and name HN and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 1 and name H12 and segid "A") (resi 1 and name H21 and segid "A") 2.00 1.80 0.75
assign (resi 1 and name H12 and segid "A") (resi 1 and name H22 and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 1 and name H12 and segid "A") (resi 1 and name HN and segid "A") 3.25 1.80 0.75
assign (resi 1 and name H12 and segid "B") (resi 3 and name HA and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 1 and name H21 and segid "A") (resi 1 and name H11 and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 1 and name H21 and segid "A") (resi 1 and name H12 and segid "A") 2.00 1.80 0.75
assign (resi 1 and name H22 and segid "A") (resi 1 and name H12 and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 1 and name HN and segid "A") (resi 1 and name HN and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 1 and name H21 and segid "A") (resi 2 and name HA and segid "A") 4.25 1.80 0.75
assign (resi 1 and name H21 and segid "B") (resi 3 and name HA and segid "A") 4.25 1.80 0.75
assign (resi 1 and name HN and segid "A") (resi 1 and name H11 and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 1 and name HN and segid "A") (resi 1 and name H12 and segid "A") 3.25 1.80 0.75
assign (resi 1 and name HN and segid "A") (resi 1 and name H22 and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 1 and name HN and segid "A") (resi 1 and name H21 and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 1 and name HN and segid "A") (resi 2 and name HA and segid "A") 2.00 1.80 0.75
assign (resi 1 and name HN and segid "B") (resi 3 and name HD2* and segid "A") 5.75 1.80 0.75
assign (resi 1 and name HN and segid "B") (resi 4 and name HN and segid "A") 4.25 1.80 0.75
assign (resi 2 and name HA and segid "A") (resi 1 and name H21 and segid "A") 4.25 1.80 0.75
assign (resi 2 and name HA and segid "A") (resi 1 and name HN and segid "A") 2.00 1.80 0.75
assign (resi 2 and name HA and segid "A") (resi 2 and name HB1 and segid "A") 3.25 1.80 0.75
assign (resi 2 and name HA and segid "A") (resi 2 and name HB2 and segid "A") 3.25 1.80 0.75
assign (resi 2 and name HA and segid "A") (resi 2 and name HE3 and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 2 and name HA and segid "A") (resi 2 and name HN and segid "A") 3.25 1.80 0.75
assign (resi 2 and name HA and segid "A") (resi 3 and name HA and segid "A") 4.50 1.80 0.50
assign (resi 2 and name HA and segid "A") (resi 3 and name HN and segid "A") 4.25 1.80 0.75
assign (resi 2 and name HA and segid "B") (resi 4 and name HB1 and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 2 and name HB1 and segid "A") (resi 2 and name HA and segid "A") 3.25 1.80 0.75
assign (resi 2 and name HB1 and segid "A") (resi 2 and name HE3 and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 2 and name HB1 and segid "A") (resi 2 and name HN and segid "A") 3.25 1.80 0.75
assign (resi 2 and name HB2 and segid "A") (resi 2 and name HA and segid "A") 3.25 1.80 0.75
assign (resi 2 and name HB2 and segid "A") (resi 2 and name HE3 and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 2 and name HB2 and segid "A") (resi 2 and name HN and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 2 and name HD1 and segid "A") (resi 2 and name HA and segid "A") 4.25 1.80 0.75
assign (resi 2 and name HD1 and segid "A") (resi 2 and name HB1 and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 2 and name HD1 and segid "A") (resi 2 and name HE2 and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 2 and name HD1 and segid "A") (resi 2 and name HE1 and segid "A") 3.25 1.80 0.75
assign (resi 2 and name HD1 and segid "A") (resi 3 and name HA and segid "A") 4.25 1.80 0.75
assign (resi 2 and name HD1 and segid "B") (resi 4 and name HN and segid "A") 4.25 1.80 0.75
assign (resi 2 and name HE3 and segid "A") (resi 2 and name HA and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 2 and name HE3 and segid "A") (resi 2 and name HB1 and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 2 and name HE3 and segid "A") (resi 2 and name HE2 and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 2 and name HE3 and segid "A") (resi 2 and name HZ3 and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 2 and name HE3 and segid "B") (resi 4 and name HB1 and segid "A") 3.50 1.80 0.50
assign (resi 2 and name HE3 and segid "B") (resi 4 and name HN and segid "A") 4.50 1.80 0.50
assign (resi 2 and name HE3 and segid "B") (resi 5 and name HA and segid "A") 4.25 1.80 0.75
assign (resi 2 and name HE3 and segid "B") (resi 5 and name HB1 and segid "A") 4.25 1.80 0.75
assign (resi 2 and name HE3 and segid "B") (resi 5 and name HB2 and segid "A") 3.50 1.80 0.50

```


Wasserstoffbrücken-Restraints für das Dimer

```

assign (resid 3 and name O and segid "A") (resid 4 and name N and segid "B") 3.3 3.3 0.0
assign (resid 3 and name O and segid "A") (resid 4 and name HN and segid "B") 2.4 2.4 0.0
assign (resid 3 and name O and segid "B") (resid 4 and name N and segid "A") 3.3 3.3 0.0
assign (resid 3 and name O and segid "B") (resid 4 and name HN and segid "A") 2.4 2.4 0.0
assign (resid 5 and name O and segid "A") (resid 6 and name N and segid "B") 3.3 3.3 0.0
assign (resid 5 and name O and segid "A") (resid 6 and name HN and segid "B") 2.4 2.4 0.0
assign (resid 5 and name O and segid "B") (resid 6 and name N and segid "A") 3.3 3.3 0.0
assign (resid 5 and name O and segid "B") (resid 6 and name HN and segid "A") 2.4 2.4 0.0
assign (resid 7 and name O and segid "A") (resid 8 and name N and segid "B") 3.3 3.3 0.0
assign (resid 7 and name O and segid "A") (resid 8 and name HN and segid "B") 2.4 2.4 0.0
assign (resid 7 and name O and segid "B") (resid 8 and name N and segid "A") 3.3 3.3 0.0
assign (resid 7 and name O and segid "B") (resid 8 and name HN and segid "A") 2.4 2.4 0.0
assign (resid 9 and name O and segid "A") (resid 10 and name N and segid "B") 3.3 3.3 0.0
assign (resid 9 and name O and segid "A") (resid 10 and name HN and segid "B") 2.4 2.4 0.0
assign (resid 9 and name O and segid "B") (resid 10 and name N and segid "A") 3.3 3.3 0.0
assign (resid 9 and name O and segid "B") (resid 10 and name HN and segid "A") 2.4 2.4 0.0
assign (resid 11 and name O and segid "A") (resid 12 and name N and segid "B") 3.3 3.3 0.0
assign (resid 11 and name O and segid "A") (resid 12 and name HN and segid "B") 2.4 2.4 0.0
assign (resid 11 and name O and segid "B") (resid 12 and name N and segid "A") 3.3 3.3 0.0
assign (resid 11 and name O and segid "B") (resid 12 and name HN and segid "A") 2.4 2.4 0.0
assign (resid 6 and name O and segid "A") (resid 3 and name N and segid "B") 3.3 3.3 0.0
assign (resid 6 and name O and segid "A") (resid 3 and name HN and segid "B") 2.4 2.4 0.0
assign (resid 6 and name O and segid "B") (resid 3 and name N and segid "A") 3.3 3.3 0.0
assign (resid 6 and name O and segid "B") (resid 3 and name HN and segid "A") 2.4 2.4 0.0
assign (resid 8 and name O and segid "A") (resid 5 and name N and segid "B") 3.3 3.3 0.0
assign (resid 8 and name O and segid "A") (resid 5 and name HN and segid "B") 2.4 2.4 0.0
assign (resid 8 and name O and segid "B") (resid 5 and name N and segid "A") 3.3 3.3 0.0
assign (resid 8 and name O and segid "B") (resid 5 and name HN and segid "A") 2.4 2.4 0.0
assign (resid 10 and name O and segid "A") (resid 7 and name N and segid "B") 3.3 3.3 0.0
assign (resid 10 and name O and segid "A") (resid 7 and name HN and segid "B") 2.4 2.4 0.0
assign (resid 10 and name O and segid "B") (resid 7 and name N and segid "A") 3.3 3.3 0.0
assign (resid 10 and name O and segid "B") (resid 7 and name HN and segid "A") 2.4 2.4 0.0
assign (resid 12 and name O and segid "A") (resid 9 and name N and segid "B") 3.3 3.3 0.0
assign (resid 12 and name O and segid "A") (resid 9 and name HN and segid "B") 2.4 2.4 0.0
assign (resid 12 and name O and segid "B") (resid 9 and name N and segid "A") 3.3 3.3 0.0
assign (resid 12 and name O and segid "B") (resid 9 and name HN and segid "A") 2.4 2.4 0.0

```

NOE-Restraints für das Monomer

```

assign (resi 1 and name H1*) (resi 1 and name H22) 3.65 2.15 1.25
assign (resi 1 and name H1*) (resi 7 and name HB1) 3.65 2.15 1.25
assign (resi 1 and name H1*) (resi 7 and name HB2) 4.25 1.85 1.85
assign (resi 1 and name H1*) (resi 7 and name HD2*) 5.75 1.85 1.85
assign (resi 1 and name H21) (resi 1 and name H22) 2.15 0.65 0.65
assign (resi 1 and name H21) (resi 7 and name HB1) 2.75 1.25 1.25
assign (resi 1 and name H21) (resi 7 and name HB2) 2.75 1.25 1.25
assign (resi 1 and name H21) (resi 7 and name HD1*) 4.25 2.75 1.25
assign (resi 1 and name H21) (resi 7 and name HD2*) 4.25 2.75 1.25
assign (resi 1 and name H22) (resi 1 and name H21) 2.15 0.65 0.65
assign (resi 1 and name HN) (resi 1 and name H1*) 3.65 2.15 1.25
assign (resi 1 and name HN) (resi 1 and name H21) 2.75 1.25 1.25
assign (resi 1 and name HN) (resi 1 and name H22) 2.15 0.65 0.65
assign (resi 1 and name HN) (resi 2 and name HA) 2.15 0.65 0.65
assign (resi 1 and name HN) (resi 2 and name HB2) 2.75 1.25 1.25
assign (resi 2 and name HA) (resi 1 and name H21) 3.65 1.85 1.85
assign (resi 2 and name HA) (resi 2 and name HB1) 2.15 0.65 0.65
assign (resi 2 and name HA) (resi 2 and name HB2) 2.15 0.65 0.65
assign (resi 2 and name HD1) (resi 2 and name HA) 2.75 1.25 1.25
assign (resi 2 and name HD1) (resi 2 and name HB1) 2.75 1.25 1.25
assign (resi 2 and name HE1) (resi 2 and name HD1) 2.15 0.65 0.65

```

assign (resi 2 and name HE1)	(resi 2 and name HZ2)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 2 and name HN)	(resi 2 and name HA)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 2 and name HN)	(resi 2 and name HB1)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 2 and name HN)	(resi 2 and name HB2)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 2 and name HN)	(resi 2 and name HD1)	3.35	1.85	1.85
assign (resi 2 and name HN)	(resi 3 and name HB2)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 2 and name HN)	(resi 8 and name HA)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 2 and name HN)	(resi 9 and name HB)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 2 and name HN)	(resi 9 and name HG2*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 3 and name HA)	(resi 3 and name HB1)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 3 and name HA)	(resi 3 and name HB2)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 3 and name HA)	(resi 9 and name HB)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 3 and name HB1)	(resi 3 and name HB2)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 3 and name HB2)	(resi 3 and name HA)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 3 and name HB2)	(resi 3 and name HB1)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 3 and name HN)	(resi 2 and name HN)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 3 and name HN)	(resi 3 and name HA)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 3 and name HN)	(resi 4 and name HA)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 3 and name HN)	(resi 4 and name HB*)	3.65	2.15	1.25
assign (resi 4 and name HA)	(resi 10 and name HG1*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 4 and name HA)	(resi 4 and name HB*)	3.03	0.63	0.63
assign (resi 4 and name HB*)	(resi 4 and name HA)	3.65	2.15	1.25
assign (resi 4 and name HD1)	(resi 4 and name HA)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 4 and name HD1)	(resi 4 and name HB*)	3.65	2.15	1.25
assign (resi 4 and name HE1)	(resi 4 and name HB*)	4.25	1.85	1.85
assign (resi 4 and name HE1)	(resi 4 and name HD1)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 4 and name HE1)	(resi 4 and name HZ2)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 4 and name HN)	(resi 10 and name HA)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 4 and name HN)	(resi 10 and name HG2*)	4.85	3.35	1.85
assign (resi 4 and name HN)	(resi 11 and name HB)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 4 and name HN)	(resi 11 and name HN)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 4 and name HN)	(resi 4 and name HA)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 4 and name HN)	(resi 4 and name HB*)	3.03	0.63	0.63
assign (resi 4 and name HN)	(resi 5 and name HA)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 4 and name HN)	(resi 5 and name HB2)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 4 and name HN)	(resi 5 and name HD1*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 4 and name HN)	(resi 5 and name HD2*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 5 and name HA)	(resi 11 and name HB)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 5 and name HA)	(resi 11 and name HG*)	4.85	3.35	1.25
assign (resi 5 and name HA)	(resi 5 and name HD1*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 5 and name HA)	(resi 5 and name HD2*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 5 and name HB1)	(resi 5 and name HA)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 5 and name HB1)	(resi 5 and name HB2)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 5 and name HB2)	(resi 5 and name HB1)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 5 and name HD1*)	(resi 11 and name HG*)	7.35	5.85	1.25
assign (resi 5 and name HD1*)	(resi 12 and name HB*)	4.85	3.35	1.85
assign (resi 5 and name HD1*)	(resi 6 and name HB1)	4.85	3.35	1.85
assign (resi 5 and name HD1*)	(resi 6 and name HB2)	4.85	3.35	1.85
assign (resi 5 and name HD2*)	(resi 5 and name HB1)	3.63	0.63	0.63
assign (resi 5 and name HN)	(resi 5 and name HA)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 5 and name HN)	(resi 5 and name HB1)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 5 and name HN)	(resi 5 and name HB2)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 5 and name HN)	(resi 5 and name HD1*)	4.85	3.35	1.85
assign (resi 5 and name HN)	(resi 6 and name HA)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 5 and name HN)	(resi 6 and name HB1)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 5 and name HN)	(resi 6 and name HB2)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 6 and name HA)	(resi 6 and name HB1)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 6 and name HA)	(resi 6 and name HB2)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 6 and name HB1)	(resi 12 and name HB*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 6 and name HB1)	(resi 6 and name HB2)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 6 and name HB2)	(resi 12 and name HB*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 6 and name HB2)	(resi 6 and name HB1)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 6 and name HD1)	(resi 6 and name HA)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 6 and name HD1)	(resi 6 and name HB1)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 6 and name HD1)	(resi 6 and name HB2)	2.75	1.25	1.25

assign (resi 6 and name HE1)	(resi 6 and name HD1)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 6 and name HE1)	(resi 6 and name HZ2)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 6 and name HE3)	(resi 6 and name HA)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 6 and name HE3)	(resi 6 and name HB1)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 6 and name HE3)	(resi 6 and name HB2)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 6 and name HH2)	(resi 6 and name HZ2)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 6 and name HN)	(resi 12 and name HA)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 6 and name HN)	(resi 12 and name HB*)	4.85	3.35	1.25
assign (resi 6 and name HN)	(resi 12 and name HB*)	4.85	3.35	1.85
assign (resi 6 and name HN)	(resi 13 and name H21)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 6 and name HN)	(resi 13 and name H21)	2.75	1.25	1.50
assign (resi 6 and name HN)	(resi 13 and name H22)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 6 and name HN)	(resi 13 and name H22)	2.75	1.25	1.50
assign (resi 6 and name HN)	(resi 6 and name HA)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 6 and name HN)	(resi 6 and name HB1)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 6 and name HN)	(resi 6 and name HB2)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 6 and name HN)	(resi 6 and name HD1)	3.35	1.85	1.85
assign (resi 6 and name HN)	(resi 7 and name HA)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 6 and name HN)	(resi 7 and name HB1)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 6 and name HN)	(resi 7 and name HD1*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 7 and name HA)	(resi 13 and name H21)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 7 and name HA)	(resi 13 and name H21)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 7 and name HA)	(resi 13 and name H22)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 7 and name HA)	(resi 13 and name H22)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 7 and name HA)	(resi 6 and name HA)	3.05	1.25	1.25
assign (resi 7 and name HA)	(resi 6 and name HB1)	3.35	1.85	1.85
assign (resi 7 and name HA)	(resi 6 and name HB2)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 7 and name HA)	(resi 7 and name HB1)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 7 and name HA)	(resi 7 and name HB2)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 7 and name HA)	(resi 7 and name HD1*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 7 and name HA)	(resi 7 and name HD2*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 7 and name HB1)	(resi 1 and name H1*)	3.65	2.15	1.25
assign (resi 7 and name HB1)	(resi 1 and name H21)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 7 and name HB1)	(resi 7 and name HB2)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 7 and name HB1)	(resi 7 and name HG)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 7 and name HB2)	(resi 7 and name HB1)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 7 and name HD1*)	(resi 1 and name H21)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 7 and name HD2*)	(resi 1 and name H21)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 7 and name HN)	(resi 1 and name H21)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 7 and name HN)	(resi 1 and name H22)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 7 and name HN)	(resi 7 and name HA)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 7 and name HN)	(resi 7 and name HB1)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 7 and name HN)	(resi 7 and name HB2)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 7 and name HN)	(resi 8 and name HA)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 8 and name HA)	(resi 7 and name HB1)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 8 and name HA)	(resi 8 and name HB1)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 8 and name HA)	(resi 8 and name HB2)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 8 and name HB2)	(resi 8 and name HB1)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 8 and name HD1)	(resi 8 and name HB1)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 8 and name HD1)	(resi 8 and name HB2)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 8 and name HE1)	(resi 8 and name HD1)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 8 and name HE1)	(resi 8 and name HH2)	3.35	1.85	1.85
assign (resi 8 and name HE1)	(resi 8 and name HZ2)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 8 and name HN)	(resi 10 and name HG1*)	4.85	3.35	1.85
assign (resi 8 and name HN)	(resi 10 and name HG2*)	4.85	3.35	1.85
assign (resi 8 and name HN)	(resi 13 and name H21)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 8 and name HN)	(resi 13 and name H21)	2.75	1.25	1.50
assign (resi 8 and name HN)	(resi 14 and name HB*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 8 and name HN)	(resi 8 and name HA)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 8 and name HN)	(resi 8 and name HB1)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 8 and name HN)	(resi 8 and name HB2)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 8 and name HN)	(resi 9 and name HA)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 8 and name HN)	(resi 9 and name HG2*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 9 and name HA)	(resi 10 and name HA)	3.35	1.85	1.85
assign (resi 9 and name HA)	(resi 14 and name HB*)	4.85	3.35	1.85

assign (resi 9 and name HA) (resi 8 and name HB1)	3.35	1.85	1.85
assign (resi 9 and name HA) (resi 8 and name HB1)	3.35	1.85	1.85
assign (resi 9 and name HA) (resi 8 and name HB2)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 9 and name HA) (resi 9 and name HB)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 9 and name HA) (resi 9 and name HG1*)	3.63	1.63	0.63
assign (resi 9 and name HA) (resi 9 and name HG2*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 9 and name HB) (resi 9 and name HG1*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 9 and name HB) (resi 9 and name HG2*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 9 and name HN) (resi 10 and name HA)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 9 and name HN) (resi 3 and name HA)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 9 and name HN) (resi 3 and name HA)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 9 and name HN) (resi 4 and name HB*)	3.65	2.15	1.25
assign (resi 9 and name HN) (resi 9 and name HA)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 9 and name HN) (resi 9 and name HB)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 9 and name HN) (resi 9 and name HG1*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 9 and name HN) (resi 9 and name HG2*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 10 and name HA) (resi 10 and name HB)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 10 and name HA) (resi 11 and name HA)	3.35	1.85	1.85
assign (resi 10 and name HA) (resi 4 and name HB*)	3.65	2.15	1.25
assign (resi 10 and name HA) (resi 9 and name HG2*)	4.85	3.35	1.85
assign (resi 10 and name HA) (resi 9 and name HG2*)	4.85	3.35	1.85
assign (resi 10 and name HG1*) (resi 10 and name HA)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 10 and name HG1*) (resi 9 and name HG2*)	5.75	4.25	1.25
assign (resi 10 and name HG2*) (resi 10 and name HA)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 10 and name HN) (resi 10 and name HA)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 10 and name HN) (resi 10 and name HB)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 10 and name HN) (resi 10 and name HG1*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 10 and name HN) (resi 10 and name HG2*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 10 and name HN) (resi 11 and name HA)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 10 and name HN) (resi 9 and name HN)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 11 and name HA) (resi 11 and name HB)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 11 and name HA) (resi 11 and name HG*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 11 and name HB) (resi 10 and name HG2*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 11 and name HB) (resi 11 and name HG*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 11 and name HB) (resi 5 and name HD1*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 11 and name HB) (resi 5 and name HD2*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 11 and name HG*) (resi 5 and name HD1*)	7.35	5.85	1.25
assign (resi 11 and name HN) (resi 11 and name HA)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 11 and name HN) (resi 11 and name HB)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 11 and name HN) (resi 11 and name HG*)	4.85	3.35	1.25
assign (resi 11 and name HN) (resi 12 and name HA)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 11 and name HN) (resi 12 and name HB*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 11 and name HN) (resi 12 and name HB*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 11 and name HN) (resi 5 and name HA)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 11 and name HN) (resi 5 and name HB2)	3.35	1.85	1.85
assign (resi 11 and name HN) (resi 5 and name HD1*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 11 and name HN) (resi 5 and name HD2*)	4.25	1.85	1.85
assign (resi 11 and name HN) (resi 6 and name HB1)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 11 and name HN) (resi 6 and name HB2)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 12 and name HA) (resi 12 and name HB*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 12 and name HA) (resi 6 and name HB1)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 12 and name HA) (resi 6 and name HB2)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 12 and name HB*) (resi 11 and name HG*)	6.35	4.85	1.85
assign (resi 12 and name HB*) (resi 18 and name HB1)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 12 and name HB*) (resi 5 and name HD1*)	6.35	1.85	1.85
assign (resi 12 and name HB*) (resi 7 and name HB1)	5.15	2.10	2.10
assign (resi 12 and name HN) (resi 11 and name HN)	3.35	1.85	1.85
assign (resi 12 and name HN) (resi 12 and name HA)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 12 and name HN) (resi 12 and name HB*)	4.25	2.75	1.25
assign (resi 12 and name HN) (resi 13 and name H21)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 12 and name HN) (resi 13 and name H22)	2.15	0.65	0.65
assign (resi 12 and name HN) (resi 14 and name HN)	3.35	1.85	1.85
assign (resi 12 and name HN) (resi 18 and name HB1)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 12 and name HN) (resi 18 and name HB2)	2.75	1.25	1.25
assign (resi 12 and name HN) (resi 18 and name HN)	2.75	1.25	1.25

```

assign (resi 12 and name HN) (resi 7 and name HA) 2.75 1.25 1.25
assign (resi 12 and name HN) (resi 7 and name HD1*) 4.85 3.35 1.85
assign (resi 13 and name H21) (resi 19 and name HD2*) 4.25 2.75 1.25
assign (resi 13 and name H21) (resi 7 and name HD1*) 4.25 2.75 1.25
assign (resi 13 and name H21) (resi 7 and name HD1*) 4.25 2.75 1.25
assign (resi 13 and name H22) (resi 7 and name HD2*) 4.25 2.75 1.50

```

Kopplungskonstanten-Restraints für das Monomer

```

assign (resid 2 and name HN) (resid 2 and name N)
      (resid 2 and name CA) (resid 2 and name HA)      8.91      0.50

assign (resid 3 and name HN) (resid 3 and name N)
      (resid 3 and name CA) (resid 3 and name HA)      9.59      0.50

assign (resid 4 and name HN) (resid 4 and name N)
      (resid 4 and name CA) (resid 4 and name HA)      9.25      0.50

assign (resid 5 and name HN) (resid 5 and name N)
      (resid 5 and name CA) (resid 5 and name HA)      9.40      0.50

assign (resid 6 and name HN) (resid 6 and name N)
      (resid 6 and name CA) (resid 6 and name HA)      8.69      0.50

assign (resid 7 and name HN) (resid 7 and name N)
      (resid 7 and name CA) (resid 7 and name HA)      9.69      0.50

assign (resid 8 and name HN) (resid 8 and name N)
      (resid 8 and name CA) (resid 8 and name HA)      9.89      0.50

assign (resid 9 and name HN) (resid 9 and name N)
      (resid 9 and name CA) (resid 9 and name HA)      9.42      0.50

assign (resid 10 and name HN) (resid 10 and name N)
      (resid 10 and name CA) (resid 10 and name HA)      9.56      0.50

assign (resid 11 and name HN) (resid 11 and name N)
      (resid 11 and name CA) (resid 11 and name HA)      9.38      0.50

assign (resid 12 and name HN) (resid 12 and name N)
      (resid 12 and name CA) (resid 12 and name HA)      9.69      0.50

```

Verwendete Protokolle für die Strukturrechnungen

Simulated Annealing Protokoll (sa.inp)

```

remarks xplor file simulated annealing for a proteine

{*****}
{*** reading data      ***}
{*****}

@read_all_global.dat

evaluate( $iniseed = 283745)

evaluate( $init_t      = 2000) { initial simulated annealing temperature }

```

```

evaluate( $high_steps = 6500)
evaluate( $cool1_steps = 5000)
evaluate( $cool2_steps = 2000)
evaluate( $coup_steps = 4000)
evaluate( $final1_t = 1000) { K }
evaluate( $final2_t = 100) { K }
evaluate( $tempstep = 50) { K }

structure @@minigrami_A.psf end
structure @@minigrami_B.psf end

coor@minigrami_A.pdb
coor@minigrami_B.pdb

parameter @@$file_paramete end

parameter
  bond      ( name sg)( name sg) 0.0 TOKEN
  angle ( all)( name sg)( name sg) 0.0 TOKEN
end

@@read_experimental_data.xplor { reads experimental data }

{*****}
{*** setting parameters ***}
{*****}

flags exclude * include bonds angle impr vdw end
if( $flag_diheangl = 1) then flags include dihe end end if
if( $flag_restrain = 1) then flags include noe end end if
if( $flag_dihedral = 1) then flags include cdih end end if
if( $flag_relaxate = 1) then flags include rela end end if

vector do( fbeta = 10)( all) { friction coefficient for MD heatbath, in 1/ps }
vector do( mass = 100)( all)

evaluate( $kcdih = 5)
restraints dihedral scale = $kcdih end {initial weight - will be modified later}

{*****}
{*** simulated annealing main loop ***}
{*****}

evaluate ($count = $ini_count)
while ($count < $end_count ) loop main

  evaluate( $count = $count + 1)
  evaluate( $nreassign = 0)
  coor @@$file_startpdb
  evaluate( $seed = $count * $iniseed)
  set seed $seed end

  @sa_1_randomchain.xplor

  evaluate( $cpu1 = $cpu)

  evaluate( $ncycle = ( $init_t-$final1_t) / $tempstep)
  evaluate( $nstep = int( $cool1_steps / $ncycle))

  @setup_swapnew.xplor

  vector ident( store2)( store1)
  parameter
    improper( store2)( store2)( all)( all) 0.0 TOKEN TOKEN
    improper( all)( all)( store2)( store2) 0.0 TOKEN TOKEN

```

```

end

@@sa_l_initial_values.xplor

parameter
  angle( store2)( all)( store2) $ini_flt TOKEN
  angle( all)   ( all)( store2) $ini_flt TOKEN
end

parameter
  nbonds
  atom
  cutnb   = 12
  tolerance = 3.5
  repel   = 1.2
  wmin    = 0.5
  rexp    = 2
  irexp   = 2
  rcon    = 1.
  nbxmod  = 4
end
end

@@sa_l_reduced.xplor { defines store1 }

constraints
  interaction( all)( not store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 dihe 1.0 vdw 0.0 elec 0 end
  interaction( store1)( store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 dihe 1.0 vdw 0.1 elec 0 end
end

{ 1 ===== initial minimization }

evaluate( $filename = $file_strucpdb + "start_" + encode($count) + ".pdb")
@@print_coorheader.xplor

if( $flag_compare = 1) then @compare_structures.xplor end if
restraints dihedral scale=5. end
noe potential * soft scale * 1.0 asymptote * 2.0 end
minimize powell nstep=50 drop=10. nprint=10 end
if( $flag_compare = 1) then @compare_structures.xplor end if

{ 2 ===== high temperature dynamics }

@sa_l_hightemp.xplor

{ 3 ===== cooling 1 }

@sa_l_cool1.xplor

{ 4 ===== cooling 2 }

@sa_l_cool2.xplor

{ 5 ===== using coupling restraints }

if( $flag_coupling = 1) then @sa_l_coupling.xplor end if
{increases coupling force constant}

{ 6 ===== final minimization }

if( $flag_restrain = 1)
then
  flags exclude * include noe end
  evaluate ($swap = 1.001)
  @swap15v.xplor

```

```

    flags include bonds angle impr vdw end
    if( $flag_diheangl = 1) then flags include dihe end end if
    if( $flag_dihedral = 1) then flags include cdih end end if
    if( $flag_relaxate = 1) then flags include rela end end if
    if( $flag_coupling = 1) then flags include coup end end if
end if
minimize powell nstep=200 drop=10.0 nprint=25 end

if( $flag_compare = 1) then @compare_structures.xplor end if

{ 7 ===== write out the final structure(s) }

evaluate( $filename = $file_structpdb + encode($count) + ".pdb")
@@print_coorheader.xplor
write coordinates sele =( all) output = $filename end

end loop main

stop

```

Einlesen der Parameter und Dateien (read_all_global.dat)

```

remark file for global parameters for xplor md run for peptides

evaluate( $file_topology = "minigrami.top")
evaluate( $file_paramete = "minigrami.param")
evaluate( $file_sequence = "")
evaluate( $file_disulfid = "")
evaluate( $file_pepbonds = "minigrami.link")
evaluate( $file_structpsf = "minigrami.psf")
evaluate( $file_startpdb = "minigrami_start.pdb")
evaluate( $file_structlis = "../str/")
evaluate( $file_structpdb = "../str/minimono_")

evaluate( $flag_diheangl = 0)      { * dihedral angle from topology file *}
evaluate( $flag_disulfid = 0)     { * disulfid bridges *}
evaluate( $flag_restrain = 1)     { * noe and other distance restraints *}
evaluate( $flag_ambivale = 0)    { * ambivalent distance restraints *}
evaluate( $flag_relaxate = 0)    { * relaxation matrix approach *}
evaluate( $flag_dihedral = 0)    { * dihedral angle restraints *}
evaluate( $flag_coupling = 1)    { * couplings at karplus curve fitting *}
evaluate( $flag_compare = 0)     { * compare structure with other *}

evaluate( $file_restrain = "../rst/noes_minimonomer.upl")
evaluate( $file_ambivale = "../rst/")
evaluate( $file_relaxate = "../rst/")
evaluate( $file_dihedral = "../rst/")
evaluate( $file_coupling = "../rst/j_minimono.upl")
evaluate( $file_compare = "../rst/")

evaluate( $start_compare = 1) { start count for comparing }
evaluate( $end_compare = 99) { end count for comparing }
evaluate( $ini_count = 0) { starting count }
evaluate( $end_count = 100) { final count }

```

Randomisierung der Struktur (sa_l_randomchain.xplor)

```

remarks xplor file randomize chain coordinates for a proteine

{*****}

```

```

{*** setting parameters ***}
{*****}

set message off echo off end

vector do( store1 = 0)( all)
vector do( store2 = 0)( all)

{*****}
{*** loop throu all alpha carbons ***}
{*****}

for $id in id (name ca) loop pept

  vector show element( resid)( id $id)
  evaluate( $res = $result)

  vector show element( segid)( id $id)
  evaluate( $seg = $result)

  vector do( store2 = 1)( byres( id $id))

  evaluate( $phi = random() * 360 - 180)
  evaluate( $psi = random() * 360 - 180)

{*** all atoms up to the present ca are held fixed for phi rotation ***}

vector do( store1 = 1)(( store2 and( name n or name hn or name ht* or name ca)))

{*** rotate phi ***}

  coor
  rotate sele = ( attribute store1 = 0)
  center( head( store2 and name ca))
  axis( head( store2 and name ca)
        head( store2 and name ca)
        tail( store2 and name n)) $phi
  end

{*** fix the sidechain of the current residue for psi rotation ***}

  vector do( store1 = 1)(( store2 and not( name c or name o or name ot#)))

{*** rotate psi ***}

  coor
  rotate sele = ( attribute store1 = 0 and segid $seg)
  center( head( store2 and name c))
  axis( head( store2 and name c)
        tail( store2 and name ca)) $psi
  end

{*** fix all of current residue ***}

  vector do( store1 = 1)( store2)
  vector do( store2 = 0)( byres( id $id))

end loop pept

set message on echo on end

```

Definition der enantiotopen Protonen für das Swap-Modul (setup_swapnew.xplor)

remarks xplor file setting up hydrogens fo exchange for a proteine

```
{*****}
{*** setting up hydrogens vor exchange      ***}
{*****}

vector do( q = 0)( all)
vector do( store1 = 0)( all)
vector do( store1 = store1 + 1)((resn dle and name cd*)
  or (resn val and name cg*)
  or (resn dl1 and name cd*)
  or (resn va1 and name cg*))

set echo off message off end
for $id in id
  ((resn dle and name hb1)
  or (resn dl1 and name hb1)
  or (resn eta and name h11)
  or (resn eta and name h21)
  or (resn et1 and name h11)
  or (resn et1 and name h21)
  or (resn suc and name h21)
  or (resn suc and name h31)
  or (resn trp and name hb1)
  or (resn tr1 and name hb1))

loop meth
  vector show element( resid)( id $id)
  eval( $resid = $result)

  vector show element( name)( id $id)
  eval( $name = $result - "1" + "%")

  coor sele =( resid $resid and name $name) end
  if( $select = 2) then
    vector do( store1 = store1 + 1)( resid $resid and name $name)
  end if
end loop meth

set echo on message on end
```

Definition der Kraftkonstanten für die Rechnungen (sa_l_initial_values.xplor)

remarks xplor file setting starting parameters for sa of a proteine

```
{*****}
{*** setting initial parameters      ***}
{*****}

evaluate( $ini_rad = 0.9)   evaluate( $fin_rad = 0.78)
evaluate( $ini_con = 0.003) evaluate( $fin_con = 4.0)
evaluate( $iniflt = 5)     evaluate( $finflt = 500)
evaluate( $ini_ang = 1.0)  evaluate( $fin_ang = 1.0)
evaluate( $ini_imp = 1.0)  evaluate( $fin_imp = 1.0)
evaluate( $ini_dih = 1.0)  evaluate( $fin_dih = 1.0)
evaluate( $ini_amb = 1.0)  evaluate( $fin_amb = 50.0)
evaluate( $ini_cen = 1.0)  evaluate( $fin_cen = 10.0)
```



```

evaluate( $ini_bor = 1.0)   evaluate( $fin_bor = 40.0)

evaluate( $bath = $init_t)

evaluate( $k_vdw = $ini_con)
evaluate( $k_vdwfact = ( $fin_con / $ini_con)^( 1 / $ncycle))

evaluate( $radius = $ini_rad)
evaluate( $radfact = ( $fin_rad / $ini_rad)^( 1 / $ncycle))

evaluate( $kflt = $iniflt)
evaluate( $flt_fac = ( $finflt / $iniflt)^( 1 / $ncycle))

evaluate( $k_ang = $ini_ang)
evaluate( $ang_fac = ( $fin_ang / $ini_ang)^( 1 / $ncycle))

evaluate( $k_imp = $ini_imp)
evaluate( $imp_fac = ( $fin_imp / $ini_imp)^( 1 / $ncycle))

evaluate( $k_dih = $ini_dih)
evaluate( $dih_fac = ( $fin_dih / $ini_dih)^( 1 / $ncycle))

evaluate( $k_amb = $ini_amb)
evaluate( $amb_fac = ( $fin_amb / $ini_amb)^( 1 / $ncycle))

evaluate( $k_cen = $ini_cen)
evaluate( $cen_fac = ( $fin_cen / $ini_cen)^( 1 / $ncycle))

evaluate( $k_bor = $ini_bor)
evaluate( $bor_fac = ( $fin_bor / $ini_bor)^( 1 / $ncycle))

```

Hochtemperaturphase (sa_l_hightemp.xplor)

```

remarks xplor file high tmperature phase for a proteine

{*****}
{*** reading data          ***}
{*****}

@read_all_global.dat

{*****}
{*** setting parameters   ***}
{*****}

evaluate( $nstep1 = int( $high_steps / 5.0))

vector do( vx = maxwell( $init_t))( all)
vector do( vy = maxwell( $init_t))( all)
vector do( vz = maxwell( $init_t))( all)

{*****}
{*** main cycle           ***}
{*****}

for $knoe in (3.125 6.25 12.5 25 50) loop anne
  noe scale dist $knoe scale ambi $ini_amb scale hbond $ini_amb end

  if( $flag_restrain = 1)
  then
    display SWAP
    energy end
    flags exclude * include noe end

```

```

evaluate( $swap = 1.001)
@swap15v.xplor
flags include bonds angle impr vdw end
if( $flag_diheangl = 1) then flags include dihe end end if
if( $flag_dihedral = 1) then flags include cdih end end if
if( $flag_relaxate = 1) then flags include rela end end if
display SWAP
energy end
end if

evaluate( $kvdw = $knoe * 0.002)
constraints
  interaction( all)( not store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 vdw 0.0 elec 0 end
  interaction( store1)( store1) weights * 1 angl 1.0 impr 1.0 vdw $kvdw elec 0 end
end

dynamics verlet
  nstep      = $nstep1
  timestep   = 0.005
  iasvel     = current
  firstt     = $init_t
  tcoupling  = true
  tbath      = $init_t
  nprint     = 50
  iprfreq    = 0
  ntrfreq    = 9999
end

if( $flag_compare = 1) then @compare_structures.xplor end if

{*****}
{*** abort conditions          ***}
{*****}

evaluate( $critical = $temp / $init_t)
if( $critical > 1.2) then
  evaluate( $nreassign = $nreassign + 1)
  mini powell nstep 100 end
  vector do( vx = maxwell( $init_t))( all)
  vector do( vy = maxwell( $init_t))( all)
  vector do( vz = maxwell( $init_t))( all)
end if
end loop anne

```

Erste Abkühlphase (sa_l_cool1.xplor)

```

remarks xplor file first cooling phase for a proteine

{*****}
{*** reading data              ***}
{*****}

@read_all_global.dat

{*****}
{*** setting parameter         ***}
{*****}

vector do( vx=maxwell( $init_t))( all)
vector do( vy=maxwell( $init_t))( all)
vector do( vz=maxwell( $init_t))( all)

evaluate ($swap = 0.05)

```

```

restraints dihedral  scale=200.  end

parameter            { parameters for the repulsive energy term }
  nbonds
    repel      = 1.  { initial value for repel - modified later }
    rexp       = 2
    irexp      = 2
    rcon       = 1.
    nbxmod     = 3
    wmin       = 0.01
    cutnb      = 4.5
    ctonnb     = 2.99
    ctofnb     = 3.
    tolerance  = 0.5
  end
end

{*****}
{*** cooling cycle                               ***}
{*****}

evaluate( $ncycle = ( $init_t - $final_t ) / $tempstep)
evaluate( $nstep = int( $cool1_steps / $ncycle))

evaluate ( $i_cool = 0)
while ( $i_cool < $ncycle) loop cool
  evaluate( $i_cool = $i_cool + 1)

  evaluate( $bath = $bath - $tempstep)
  evaluate( $k_vdw = min( $fin_con, $k_vdw * $k_vdwfact))
  evaluate( $radius = max( $fin_rad, $radius * $radfact))
  evaluate( $k_flt = $k_flt * $flt_fac)
  evaluate( $k_ang = $k_ang * $ang_fac)
  evaluate( $k_imp = $k_imp * $imp_fac)
  evaluate( $k_amb = $k_amb * $amb_fac)
  evaluate( $k_cen = $k_cen * $cen_fac)

  if( $flag_restrain = 1)
  then
    flags exclude * include noe end
    @swap15v.xplor
    flags include bonds angle impr vdw end
    if( $flag_diheangl = 1) then flags include dihe end end if
    if( $flag_dihedral = 1) then flags include cdih end end if
    if( $flag_relaxate = 1) then flags include rela end end if
  end if

  parameter
    angle( store2)( all)( store2) $k_flt TOKEN
    angle(  all)( all)( store2) $k_flt TOKEN
    nbonds repel = $radius end
  end

  constraints
    interaction( all)( all) weights * 1 vdw $k_vdw end
  end
  noe scale dist $knoe scale ambi $k_amb scale hbond $k_amb end

  dynamics verlet
    nstep = $nstep
    time = 0.005
    iasvel = current
    firstt = $bath
    tcoup = true

```

```

    tbath = $bath
    nprint = $nstep
    iprfrq = 0
    ntrfrq = 99999
end

if( $flag_compare = 1) then @compare_structures.xplor end if

{*****}
{*** abort conditions          ***}
{*****}

evaluate( $critical = $temp / $bath)
if( $critical > 1.2) then
    evaluate( $nreassign = $nreassign + 1)
    mini powell nstep 100 end
    vector do( vx=maxwell( $bath))( all)
    vector do( vy=maxwell( $bath))( all)
    vector do( vz=maxwell( $bath))( all)
end if

end loop cool

```

Zweite Abkühlphase (sa_l_cool2.xplor)

```

remarks xplor file second cooling phase for a proteine

{*****}
{*** reading data              ***}
{*****}

@read_all_global.dat

{*****}
{*** setting parameter         ***}
{*****}

constraints interaction( all)( all) weights * 1. vdw 4. end end

{*****}
{*** cooling cycle              ***}
{*****}

evaluate( $ncycle = ( $bath - $final2_t) / $tempstep)
evaluate( $nstep = int( $cool2_steps / $ncycle))

evaluate( $i_cool = 0)
while( $i_cool < $ncycle) loop cool
    evaluate( $i_cool = $i_cool + 1)

    evaluate( $bath = $bath - $tempstep)

    if( $flag_restrain = 1)
    then
        flags exclude * include noe end
        @swap15v.xplor
        flags include bonds angle impr vdw end
        if( $flag_diheangl = 1) then flags include dihe end end if
        if( $flag_dihedral = 1) then flags include cdih end end if
        if( $flag_relaxate = 1) then flags include rela end end if
    end if
end loop cool

```

```

dynamics verlet
  nstep = $nstep
  time = 0.005
  iasvel = current
  firstt = $bath
  tcoup = true
  tbath = $bath
  nprint = $nstep
  iprfreq = 0
  ntrfreq = 9999
end

if( $flag_compare = 1) then @compare_structures.xplor end if

{*****}
{*** abort conditions ***}
{*****}

evaluate( $critical = $temp / $bath)
if( $critical > 1.2) then
  evaluate( $nreassign = $nreassign + 1)
  mini powell nstep 100 end
vector do( vx = maxwell( $bath))( all)
vector do( vy = maxwell( $bath))( all)
vector do( vz = maxwell( $bath))( all)
end if

end loop cool

```

Einbindung der Kopplungskonstanten (sa_l_coupling.xplor)

```

remarks xplor file high temperature phase for a proteine

{*****}
{*** reading data ***}
{*****}

@read_all_global.dat

{*****}
{*** setting parameters ***}
{*****}

evaluate( $nstep1 = int( $coup_steps / 4.0))

vector do( vx = maxwell( $final2_t))( all)
vector do( vy = maxwell( $final2_t))( all)
vector do( vz = maxwell( $final2_t))( all)

{*****}
{*** main cycle ***}
{*****}

for $kcou in (0.3125 0.625 1.25 2.5) loop anne
  coup class standard force = $kcou end

  if( $flag_restrain = 1)
  then
    flags exclude * include noe end
    evaluate ($swap = 1.001)
    @swap15v.xplor
    flags include bonds angle impr vdw end
    if( $flag_diheangl = 1) then flags include dihe end end if
  end if
end loop

```

```
    if( $flag_dihedral = 1) then flags include cdih end end if
    if( $flag_relaxate = 1) then flags include rela end end if
    if( $flag_coupling = 1) then flags include coup end end if
end if

dynamics verlet
  nstep      = $nstep1
  timestep   = 0.005
  iasvel     = current
  firstt     = $final2_t
  tcoupling  = true
  tbath      = $final2_t
  nprint     = 50
  iprfreq    = 0
  ntrfreq    = 9999
end

{*****}
{*** abort conditions          ***}
{*****}

evaluate( $critical = $temp / $final2_t)
if( $critical > 1.2) then
  evaluate( $nreassign = $nreassign + 1)
  mini powell nstep 100 end
  vector do( vx = maxwell( $final2_t))( all)
  vector do( vy = maxwell( $final2_t))( all)
  vector do( vz = maxwell( $final2_t))( all)
end if
end loop anne
```

6.3 Experimentelle Daten des molekularen Schalters

6.3.1 NMR-Spektroskopie

Aufnahme und Prozessierung der Spektren

Die NMR-Messungen der Verbindung **13** wurden an einer ca. 10 mM Lösung, die für **16** an einer ca. 2 mM Lösung in CDCl₃ bei einer Temperatur von 293 K durchgeführt.

Alle Messungen wurden an 800 und 600 MHz Spektrometern (Firma Bruker, Karlsruhe) am MPI in Göttingen und an der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen wurden auf das Signal von Chloroform bei 7.25 ppm kalibriert.

Die NMR-Daten wurden mit Hilfe des Programms XWINNMR, Version 3.1 (Bruker, Karlsruhe) prozessiert.

Die folgende Tabelle 6.3 auf der nächsten Seite faßt die zur Datenaufnahme und -prozessierung verwendeten Parameter der zweidimensionalen NMR-Experimente an den molekularen Schaltern **13** und **16** zusammen.

Experiment	B ₀ [MHz]	SWH [Hz]	TD1 ^a TD2 ^a	τ_m [ms] ^b	NS ^c	SI1 ^d SI2 ^d	W1 ^e W2 ^e
13							
DQF-COSY	600	4807.22	1024 8192	–	12	2048 8192	QSINE, SSB = 2 QSINE, SSB = 3.5
DQF-COSY	800	2790.18	1024 8192	–	16	2048 16384	QSINE, SSB = 2 QSINE, SSB = 3.5
TOCSY	600	4807.22	512 4096	100, 150	8	1024 4096	QSINE, SSB = 2 QSINE, SSB = 2.5
ROESY	600	4807.22	512 4096	100, 200, 300	16	1024 4096	QSINE, SSB = 2 QSINE, SSB = 3.5
16							
DQF-COSY	600	7246.37	512 2048	-	48	1024 4096	QSINE, SSB = 2 QSINE, SSB = 2
ROESY	600	7246.37	512 2048	400	40	2048 4096	QSINE, SSB = 2 QSINE, SSB = 2

Tabelle 6.3: Aufnahme- und Prozessierungsparameter der Messungen der molekularen Schalter **13** und **16**. Alle Messungen wurden bei einer Temperatur von 293 K durchgeführt. a) Aufgenommene Punkte (real), b) Mischzeit, c) Anzahl der Scans pro Inkrement, d) Prozessierte Punkte (real), e) angewandte Prozessierungsfunktionen mit Parametern (EM = e-Funktion, QSINE = quadratische Kosinusfunktion). Die Spektrometerfrequenzen lagen bei 600 und 800 MHz.

Zuordnung

Die Zuordnung der Signale wurde von Dr. Michael Karle aus dem Arbeitskreis von Prof. Koert in Marburg mit dem Programm XWINNMR 3.2 durch Kombination der DQF-COSY-, TOCSY- und ROESY-Spektren durchgeführt. In der folgenden Tabelle 6.4 sind die Zuordnungen für die Protonen in den Dekalingerüsten von **13** und **16** aufgelistet.

Proton	$^1\text{H}\delta[\text{ppm}]\mathbf{13}$	$^1\text{H}\delta[\text{ppm}]\mathbf{16}$
1 ax	2.033	1.575
1 äq	1.560	1.879
1' ax	1.971	1.285
1' äq	1.793	1.744
2	1.461	1.460
2'	1.489	1.845
3	1.563	1.264
3'	1.707	1.703
4 ax	1.921	1.647
4 äq	1.377	1.340
4' ax	1.564	2.127
4' äq	1.601	1.417
4a	1.853	1.496
4a'	1.511	–
5 ax	1.599	1.685
5 äq	1.504	1.889
5' ax	1.588	1.240
5' äq	1.750	1.771
6	3.443	4.795
6'	3.324	3.140
7	3.647	4.915
7'	3.433	3.225
8 ax	1.617	1.917
8 äq	1.606	1.490
8' ax	1.806	1.320
8' äq	1.433	1.725
8a	1.925	2.044
8a'	1.562	–

Tabelle 6.4: Zuordnung der Dekalinprotonen von **13** und **16**.

6.3.2 Strukturrechnung

Die Strukturrechnung erfolgte mit dem InsightII, Version 2000.1 und dem Modul Discover 2 (Accelrys Incl., San Diego, CA). Es wurde das in Insight enthaltene *cvff*-Kraftfeld im Vakuum genutzt. Die entsprechenden Topologie- und Parameter-Dateien sind schon in Insight II/Discover implementiert. Die *MD*-Rechnung wurde mit Starttemperaturen von 1500 K begonnen und dann auf 298 K abgekühlt. Dann wurde die *restraints* aktiviert und eine finale Minimierung durchgeführt. Es wurden jeweils Ensembles von 100 Strukturen berechnet und davon die zehn energetisch niedrigsten weiter analysiert.

Die Auswertung der gerechneten Strukturen erfolgte mit dem Programm Insight, Version 2000.1.

Für die Rechnungen verwendetes *MD*-Protokoll

```
! INPUT FILE FOR DISCOVER GENERATED BY INSIGHT
!
! Beispielfile fuer Simulated Annealing
! bei 1500 K (10*1ps) und Abkuehlung auf 200 K
!
!
! overlap = 0.1
! timtmp = 0.050000
! cutoff = 10000.000000
! cutdis = 9999.000000
! swtdis = 1.5
!
! begin simulation
! * add-automatic bond torsion valence out-of-plane
! scale 1-4 parameters by 0.500000
! set dielectric= 1*r
!
! initialize dynamics
! * for 1000 iterations
! * at 1500.000 K
! * steps of 1.000
! * no morse
! * no cross
! * write history file every 500 steps
!
! Dynamik bei 1500 K fuer 1 ps
!
! ifile = 1
loop resume dynamics
! * for 500 iterations
! * no morse
! * no cross
!
```

```
!           Abkuehlung auf 298 K
!
  resume dynamics
*   for 500 iterations
*   at 298 K
*   no morse
*   no cross
!
!           Minimierung der eingefrorenen Struktur

  constrain using "abr22.rstrnt"
!
  Minimize
*   no morse
*   no cross
*   for 500 iterations
*   using steep descents
*   until the maximum derivative is less than 1.000000000 kcal/A
!
  Minimize
*   no morse
*   no cross
*   for 3000 iterations
*   using conjugate gradients
*   until the maximum derivative is less than 0.100000000 kcal/A
!
  Minimize
*   no cross
*   for 3000 iterations
*   using conjugate gradients
*   until the maximum derivative is less than 0.010000000 kcal/A
  log energy summary
  log noe_dist violations
  log dihedral violations
  log hbonds
!
!           Archivierung der ermittelten Struktur
!
  archive as file number ifile
!
!           Wiedererhitzen auf 1500 K
!
  Minimize
*   no morse
*   no cross
*   using steep descents
*   until the maximum derivative is less than 1
!

  resume dynamics
*   for 1000 iterations
*   at 1500 K
*   no morse
```

```

*   no cross
!
  ifile = ifile + 1
  if ifile .le. 100 then loop
!
  end

```

Verwendete ROE- und Dihedralwinkelrestraints

Die folgenden Abschnitte listen die für die Strukturrechnungen verwendeten Restraints für die Verbindungen **13** und **16** auf.

ROE-Restraints für 13

```

!BIOSYM restraint 1
#NOE_distance
1:CYHX_1J:H31      1:CYHX_1J:H4      1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:CYHX_1J:H31      1:METH_1M:H12      1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:CYHX_1J:H31      1:CYHX_1J:H2      1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:CYHX_1J:H32      1:CYHX_1J:H2      1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:CYHX_1J:H1       1:CYHX_1J:H2      1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:CYHX_1J:H62      1:CYHX_1J:H1      1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:CYHX_1J:H62      1:CYHX_1J:H4      1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:METH_10:H1       1:CYHX_1J:H32     1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:METH_10:H1       1:METH_1N:H12     1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:METH_1P:H1       1:METH_1M:H11     1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:METH_1P:H1       1:METH_1N:H11     1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:METH_1P:H1       1:CYHX_1J:H5      1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:CYHX_1:H31       1:CYHX_1:H2       1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:METH_1AB:H11     1:CYHX_1:H61      1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:METH_1AB:H11     1:METH_1AD:H1     1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:METH_1AB:H12     1:METH_1AE:H1     1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:METH_1AC:H12     1:METH_1AD:H1     1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:CYHX_1:H4        1:CYHX_1:H32     1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:CYHX_1:H4        1:CYHX_1:H31     1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:CYHX_1:H5        1:CYHX_1:H62     1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:CYHX_1:H5        1:CYHX_1:H61     1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0

```

ROE- und Dihedralwinkel-Restraints für 16

```

!BIOSYM restraint 1
#NOE_distance
1:CYHX_1:H4        1:CYHX_1:H31     1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:CYHX_1:H4        1:CYHX_1:H2      1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:CYHX_1:H4        1:CYHX_1:H62     1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:CYHX_1:H5        1:CYHX_1:H61     1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:CYHX_1:H5        1:METH_1AB:H12   1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:CYHX_1:H5        1:CYHX_1:H32     1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:METH_1AD:H1      1:METH_1AB:H12   1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0
1:METH_1AD:H1      1:METH_1AE:H1    1.80   2.50   0.000   1.000   50.000   1000.0

```

6.3 Experimentelle Daten des molekularen Schalters

```
1:METH_1P:H1 1:METH_1N:H12 1.80 2.50 0.000 1.000 50.000 1000.0
1:METH_1P:H1 1:METH_1N:H11 1.80 2.50 0.000 1.000 50.000 1000.0
1:METH_10:H1 1:METH_1M:H11 1.80 2.50 0.000 1.000 50.000 1000.0
1:METH_10:H1 1:METH_1M:H12 1.80 2.50 0.000 1.000 50.000 1000.0
!1:CYHX_1J:H1 1:CYHX_1J:H32 1.80 2.50 0.000 1.000 50.000 1000.0
#3J_dihedral
1:CYHX_1J:H1 1:CYHX_1J:C1 1:CYHX_1J:C2 1:CYHX_1J:H2 0 0 50.00 50.00 1000.000 180.00
1:METH_1P:H1 1:METH_1P:C1 1:METH_10:C1 1:METH_10:H1 0 0 50.00 50.00 1000.000 60.00
1:CYHX_1:H5 1:CYHX_1:C5 1:CYHX_1:C4 1:CYHX_1:H4 0 0 50.00 50.00 1000.000 180.00
```


Literaturverzeichnis

- [1] Jamie H. Cate, Marat M. Yusupov, Gulnara Zh Yusupova, Thomas N. Earnest, and Harry F. Noller. X-ray Crystal Structures of 70S Ribosome Functional Complexes. *Science*, 285:2095–2104, 1999.
- [2] Roderick MacKinnon. Kaliumkanäle und die atomare Basis der selektiven Ionenleitung (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.*, 116:4363–4376, 2004.
- [3] Peter Agre. Aquaporin-Wasserkanäle (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.*, 116:4377–4390, 2004.
- [4] Monika M. Golas, Bjoern Sander, Cindy L. Will, Reinhard Lührmann, and Holger Stark. Molecular Architecture of the Multiprotein Splicing Factor SF3b. *Science*, 300:980–984, 2003.
- [5] Monika M. Golas, Bjoern Sander, Cindy L. Will, Reinhard Lührmann, and Holger Stark. Major Conformational Change in the Complex SF3b upon Integration into the Spliceosomal U11/U12 di-snRNP as Revealed by Electron Cryomicroscopy. *Molecular Cell*, 17:869–883, 2005.
- [6] M. Giel-Pietraszuk and J. Barciszewski. The Ribosome and the Spliceosome Are The True Ribozymes. *Polish J. Chem.*, 75:1807–1816, 2001.
- [7] James M. Ogle, Andrew P. Carter, and V. Ramakrishnan. Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends in Biochemical Sciences*, 28:259–266, 2003.
- [8] Daniel N. Wilson and Knud H. Nierhaus. Das Ribosom unter der Lupe. *Angew. Chem.*, 115:3586–3610, 2003.
- [9] Konstantin Pervushin, Roland Riek, Gerhard Wider, and Kurt Wüthrich. Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:12366–12371, 1997.
- [10] Jocelyne Flaux, Eric B. Bertelsen, Arthur L. Horwich, and Kurt Wüthrich. NMR analysis of a 900K GroEL-GroES complex. *Nature*, 418:207–211, 2002.
- [11] David M. LeMaster and Frederic M. Richards. NMR Sequential Assignment of Escherichia coli Thioredoxin Utilizing Random Fractional Deuteriation. *Biochemistry*, 27:142–150, 1988.

- [12] Bernd Reif, Mirko Hennig, and Christian Griesinger. Direct Measurement of Angles Between Bond Vectors in High-Resolution NMR. *Science*, 276:1230–1233, 1997.
- [13] Wolfgang Peti, Jens Meiler, Rafael Brüschweiler, and Christian Griesinger. Model-free analysis of protein backbone motion from residual dipolar couplings. *J. Am. Chem. Soc.*, 124:5822–5833, 2002.
- [14] Jens Meiler, Wolfgang Peti, and Christian Griesinger. Dipolar couplings in multiple alignments suggest alpha helical motion in ubiquitin. *J. Am. Chem. Soc.*, 125:8072–8073, 2003.
- [15] Jens Meiler and David Baker. Rapid protein fold determination using unassigned NMR data. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100:15404–15409, 2003.
- [16] S. Bartoschek, J. A. Vorholt, R. K. Thauer, B. H. Geierstanger, and C. Griesinger. N-Carboxymethanofuran (carbamate) formation from methanofuran and CO₂ in methanogenic archaea - Thermodynamics and kinetics of the spontaneous reaction. *European Journal of Biochemistry*, 267:3130–3138, 2000.
- [17] Thomas A. Steitz and Peter B. Moore. RNA, the first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme. *Trends in Biochemical Sciences*, 28:411–418, 2003.
- [18] Thomas Tuschl. RNA Interference and Small Interfering RNAs. *ChemBioChem*, 2:239–245, 2001.
- [19] Reuven Agami. RNAi and related mechanism and their potential use for therapy. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6:829–834, 2002.
- [20] Ahmet M. Denli and Gregory J. Hannon. RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends in Biochemical Sciences*, 28:196–201, 2003.
- [21] Lisa J. Scherer and John J. Rossi. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nature Biotechnology*, 21:1457–1465, 2003.
- [22] Thomas R. Cech. The Chemistry of Self-Splicing RNA and RNA Enzymes. *Science*, 236:1532–1539, 1987.
- [23] Francois Michel and Jean-Luc Ferat. STRUCTURE AND ACTIVITIES OF GROUP II INTRONS. *Annu. Rev. Biochem.*, 64:435–461, 1995.
- [24] Yasuomi Takagi, Masaki Warashina, Wojciech J. Stec, Koichi Yoshinore, and Kazunari Taira. Recent advances in the elucidation of the mechanisms of action of ribozymes. *Nucleic Acids Research*, 29:1815–1835, 2001.
- [25] Charles C. Query. A Glimpse of the Catalytic Core of a Group II Intron. *Structure*, 10:444–446, 2002.
- [26] Phillip A. Sharp. Split Genes and RNA Splicing. *Cell*, 77:805–815, 1994.
- [27] A. V. Philips and T. A. Cooper. RNA processing and human disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57:235–249, 2000.

- [28] Douglas L. Black. Protein Diversity from Alternative Splicing: A Challenge for Bioinformatics and Post-Genome Biology. *Cell*, 103:367–370, 2000.
- [29] Edward Brody and John Abelson. The "Spliceosome": Yeast Pre-Messenger RNA Associates with a 40S Complex in a Splicing-Dependent Reaction. *Science*, 228:963–967, 1985.
- [30] Miroslav Dundr and Tom Misteli. Nucleolomics: An Inventory of the Nucleolus. *Molecular Cell*, 9:5–7, 2002.
- [31] Melpomeni Platani and Angus I. Lamond. Nuclear Organisation and Subnuclear Bodies. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 34:1–22, 2003.
- [32] Nina Schaffert, Markus Hossbach, Rainer Heintzmann, Tilman Achsel, and Reinhard Lührmann. RNAi knockdown of hPrp31 leads to an accumulation of U4/U6 di-snRNPs in Cajal bodies. *The EMBO Journal*, 23:3000–3009, 2004.
- [33] Joseph G. Gall. The centennial of the Cajal body. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4:975–980, 2003.
- [34] Robin Reed. Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Current Opinion in Cell Biology*, 15:326–331, 2003.
- [35] Melissa J. Moore, Charles C. Query, and Phillip A. Sharp. Splicing of Precursors to mRNAs by the Spliceosome. In Raymond F. Gesteland and John F. Atkins, editors, *The RNA World*, pages 303–359. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1993.
- [36] Christopher B. Burge, Thomas Tuschl, and Phillip A. Sharp. Splicing of Precursors to mRNAs by the Spliceosome. In Raymond F. Gesteland, Thomas R. Cech, and John F. Atkins, editors, *The RNA World, Second Edition*, pages 525–560. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999.
- [37] Abhijit A. Patel and Joan A. Steitz. Splicing Double: Insights from the Second Spliceosome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4:960–970, 2003.
- [38] Erik J. Sontheimer, Sengen Sun, and Joseph A. Piccirilli. Metal ion catalysis during splicing of pre-messenger RNA. *Nature*, 388:801–805, 1997.
- [39] Peter M. Gordon, Erik J. Sontheimer, and Joseph A. Piccirilli. Metal ion catalysis during exon-ligation step of nuclear pre-mRNA splicing: Extending the parallels between the spliceosome and group II introns. *RNA*, 6:199–205, 2000.
- [40] Shyue-Lee Yean, Gerald Wuenschell, John Termini, and Ren-Jang Lin. Metal-ion coordination by U6 small nuclear RNA contributes to catalysis in the spliceosome. *Nature*, 408:881–884, 2000.
- [41] Erik J. Sontheimer. The spliceosome shows its metal. *Nature Structural Biology*, 8:11–13, 2001.
- [42] Tommaso Villa, Jeffrey A. Pleiss, and Christine Guthrie. Spliceosomal snRNAs: Mg²⁺-Dependent Chemistry at the Catalytic Core? *Cell*, 109:149–152, 2002.

- [43] Anna Huppler, Laura J. Nikstad, Anne M. Allmann, David A. Brow, and Samuel E. Butcher. Metal binding and base ionization in the U6 RNA intramolecular stem-loop structure. *Nature Structural Biology*, 9:431–435, 2002.
- [44] Saba Valadkhan and James L. Manley. Intrinsic metal binding by a spliceosomal RNA. *Nature Structural Biology*, 9:498–499, 2002.
- [45] Thomas R. Cech. The Generality of Self-Splicing RNA: Relationship to Nuclear mRNA Splicing. *Cell*, 44:207–210, 1986.
- [46] Peter L. Adams, Mary R. Stahley, Anne B. Kosek, Jimin Wang, and Scott A. Strobel. Crystal structure of a self-splicing group I intron with both exons. *Nature*, 430:45–50, 2004.
- [47] Alan M. Weiner. mRNA Splicing and Autocatalytic Introns: Distant Cousins or the Products of Chemical Determinism? *Cell*, 72:161–164, 1993.
- [48] Claudia Schneider, Cindy L. Will, Jürgen Brosius, Mikko J. Frilander, and Reinhard Lührmann. Identification of an evolutionarily divergent U11 small nuclear ribonucleoprotein particle in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:9584–9589, 2004.
- [49] James R. Roesser. Both U2 snRNA and U12 snRNA are required for accurate splicing of exon 5 of the rat calcitonin/CGRP gene. *RNA*, 10:1243–1250, 2004.
- [50] C. Guthrie and B. Patterson. Spliceosomal snRNAs. *Annu. Rev. Genet.*, 22:387–419, 1988.
- [51] Yi-Tao Yu, Elizabeth C. Scharl, Christine M. Smith, and Joan A. Steitz. The Growing World of Small Nuclear Ribonucleoproteins. In Raymond F. Gesteland, Thomas R. Cech, and John F. Atkins, editors, *The RNA World, Second Edition*, pages 487–560. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999.
- [52] Zhaolan Zhou, Lawrence J. Licklider, Steven P. Gygi, and Robin Reed. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature*, 419:182–185, 2002.
- [53] Melissa S. Jurica and Melissa J. Moore. Pre-mRNA Splicing: Awash in a Sea of Proteins. *Molecular Cell*, 12:5–14, 2003.
- [54] Melissa S. Jurica, Duncan Sousa, Melissa J. Moore, and Nikolaus Grigorieff. Three-dimensional structure of C complex spliceosomes by electron microscopy. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11:265–269, 2004.
- [55] Daniel Boehringer, Evgeny M. Makarov, Bjoern Sander, Olga V. Makarova, Berthold Kastner, Reinhard Lührmann, and Holger Stark. Three-dimensional structure of a pre-catalytic human spliceosomal complex B. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11:463–468, 2004.
- [56] Cindy L. Will and Reinhard Lührmann. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 13:290–301, 2001.
- [57] Iain W. Mattaj and Kiyoshi Nagai. Recruiting proteins to the RNA world. *Nature Structural Biology*, 2:518–522, 1997.

- [58] Christian Kambach, Stefan Walke, and Kiyoshi Nagai. Structure and assembly of the spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles. *Current Opinion in Structural Biology*, 9:222–230, 1999.
- [59] Kiyoshi Nagai, Y. Muto, D. A. Pomeranz Krummel, C. Kambach, T. Ignjatovic, S. Walke, and A. Kuglstatter. Structure and Assembly of the Spliceosomal snRNPs. *Biochemical Society Transactions*, 29(Part 2):15–26, 2001.
- [60] Edouard Bertrand and Remy Bordonne. Assembly and Traffic of Small Nuclear RNPs. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 34:79–97, 2003.
- [61] Jeongsik Yong, Lili Wan, and Gideon Dreyfuss. Why do cells need an assembly machine for RNA-protein complexes? *Trends in Cell Biology*, 15:226–232, 2004.
- [62] Gunter Meister, Christian Eggert, and Utz Fischer. SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. *Trends in Cell Biology*, 12:472–478, 2002.
- [63] Sergey Paushkin, Amelie K. Gubitz, Severine Massenet, and Gideon Dreyfuss. The SMN complex, an assemblyosome of ribonucleoproteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 14:305–312, 2002.
- [64] Livio Pellizzoni, Jeongsik Yong, and Gideon Dreyfuss. Essential Role of the SMN Complex in the Specificity of sn RNP Assembly. *Science*, 298:1775–1779, 2002.
- [65] Andrew E. Mayes, Loredane Verdone, Pierre Legrain, and Jean D. Beggs. Characterization of Sm-like proteins in yeast and their association with U6 snRNA. *The EMBO Journal*, 18:4321–4331, 1999.
- [66] Christian Kambach, Stefan Walke, Robert Young, Johanna M. Avis, Eric de la Fortelle, Veronica A. Raker, Reinhard Lührmann, Jade Li, and Kiyoshi Nagai. Crystal Structures of Two Sm Protein Complexes and Their Implications for the Assembly of the Spliceosomal snRNPs. *Cell*, 96:375–387, 1999.
- [67] Scott W. Stevens and John Abelson. Purification of the yeast U4/U6*U5 small nuclear ribonucleoprotein particle and identification of its proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:7226–7231, 1999.
- [68] Alexander Gottschalk, Gitte Neubauer, Josette Banroques, Matthias Mann, Reinhard Lührmann, and Patrizia Fabrizio. Identification by mass spectrometry and functional analysis of novel proteins of the yeast [U4/U6.U5] tri-snRNP. *The EMBO Journal*, 18:4535–4548, 1999.
- [69] Olga V. Makarova, Evgeny M. Makarova, and Reinhard Lührmann. The 65 and 110 kDa SR-related proteins of the U4/U6.U5 tri-snRNP are essential for the assembly of mature spliceosomes. *The EMBO Journal*, 20:2553–2563, 2001.
- [70] Olga V. Makarova, Evgeny M. Makarova, Sunbin Liu, Hans-Peter Vornlocher, and Reinhard Lührmann. Protein 61K, encoded by a gene (PRPF31) linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa, is required for U4/U6.U5 tri-snRNP formation and pre-mRNA splicing. *The EMBO Journal*, 21:1148–1157, 2002.

- [71] Claudia Schneider, Cindy L. Will, Olga V. Makarova, Evgeny M. Makarova, and Reinhard Lührmann. Human U4/U6.U5 and U4atac/U6atac.U5 Tri-snRNPs Exhibit Similar Protein Compositions. *Molecular and Cellular Biology*, 22:3219–3229, 2002.
- [72] Stephanie Nottrott, Henning Urlaub, and Reinhard Lührmann. Hierarchical, clustered protein interactions with U4/U6 snRNA: a biochemical role for U4/U6 proteins. *The EMBO Journal*, 21:5527–5538, 2002.
- [73] Richard A. Padgett. mRNA Splicing: Role of snRNAs. *Encyclopedia of Life Sciences*, pages 1–7, 2001.
- [74] Peter Bringmann, Bernd Appel, Jutta Rinke, Rolf Reuter, Hubert Theissen, and Reinhard Lührmann. Evidence for the existence of snRNAs U4 and U6 in a single ribonucleoprotein complex and for their association by intermolecular base pairing. *The EMBO Journal*, 3:1357–1363, 1984.
- [75] Carl Hashimoto and Joan A. Steitz. U4 and U6 RNAs coexist in a single small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nucleic Acids Research*, 12:3283–3293, 1984.
- [76] Jutta Rinke, Bernd Appel, Martin Digweed, and Reinhard Lührmann. Localization of a Base-paired Interaction between Small Nuclear RNAs U4 and U6 in intact U4/U6 Ribonucleoprotein Particles by Psoralen Cross-linking. *J. Mol. Biol.*, 185:721–731, 1985.
- [77] Albrecht Bindereif, Thorsten Wolff, and Michael R. Green. Discrete domains of human U6 snRNA required for the assembly of U4/U6 snRNP and splicing complexes. *The EMBO Journal*, 9:251–255, 1990.
- [78] Pierre Vankan, Caroline McGuigan, and Iain W. Mattaj. Domains of U4 and U6 snRNAs required for snRNP assembly and splicing complementation in *Xenopus* oocytes. *The EMBO Journal*, 9:3397–3404, 1990.
- [79] Berthold Kastner, Montserrat Bach, and Reinhard Lührmann. Electron Microscopy of U4/U6 snRNP Reveals a Y-shaped U4 and U6 RNA Containing Domain Protruding from the U4 Core RNP. *The Journal of Cell Biology*, 112:1065–1072, 1991.
- [80] Stephanie Nottrott, Klaus Hartmuth, Patrizia Fabrizio, Henning Urlaub, Ivan Vidovic, Ralf Ficner, and Reinhard Lührmann. Functional interaction of a novel 15.5kD [U4/U6.U5] tri-snRNP protein with the 5' stem-loop of U4 snRNA. *The EMBO Journal*, 18:6119–6133, 1999.
- [81] Ivan Vidovic, Stephanie Nottrott, Klaus Hartmuth, Reinhard Lührmann, and Ralf Ficner. Crystal Structure of the Splicesomal 15.5kD Protein Bound to a U4 snRNA Fragment. *Molecular Cell*, 6:1331–1342, 2000.
- [82] David A. Brow and Regina M. Vidaver. An element in human U6 RNA destabilizes the U4/U6 spliceosomal RNA complex. *RNA*, 1:122–131, 1995.
- [83] Andrea Ghetti, Mahshid Company, and John Abelson. Specificity of Prp24 binding to RNA: A role for Prp24 in the dynamic interaction of U4 and U6 snRNAs. *RNA*, 1:132–145, 1995.

-
- [84] Pratima L. Raghunathan and Christine Guthrie. A Spliceosomal Recycling Factor That Reanneals U4 and U6 Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles. *Science*, 279:857–860, 1998.
- [85] Ulrich Reidt, Klaus Reutert, Timann Achsel, Dierk Ingelfinger, Reinhard Lührmann, and Ralf Ficner. Crystal Structure of the Human U4/U6 Small Nuclear Ribonucleoprotein Particle-specific SnuCyp-20, a Nuclear Cyclophilin. *The Journal of Biological Chemistry*, 275:7439–7442, 2000.
- [86] William H. Gmeiner. The Structure and Dynamics of the U4/U6 snRNP: Implications for Pre-mRNA Splicing and Use as a Model System to Investigate the RNA-Mediated Effects of 5FUra. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 19:853–862, 2002.
- [87] Stephen D. Rader and Christine Guthrie. A conserved Lsm-interaction motif in Prp24 required for efficient U4/U6 di-snRNP formation. *RNA*, 8:1378–1392, 2002.
- [88] Jesus de la Cruz, Dieter Kressler, and Patrick Linder. Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *TIBS*, 24:192–198, 1999.
- [89] Ivo Fierro-Monti and Michael B. Mathews. Proteins binding to duplexed RNA: one motif, multiple functions. *TIBS*, 25:241–246, 2000.
- [90] Claudio W. Pikielny, Brian C. Rymond, and Michael Rosbash. Electrophoresis of ribonucleoproteins reveals an ordered assembly pathway of yeast splicing complexes. *Nature*, 324:341–345, 1986.
- [91] Timothy W. Nilsen. The spliceosome: No assembly required? *Molecular Cell*, 9:8–9, 2002.
- [92] Melissa S. Jurica, Lawrence J. Licklider, Steven P. Gygi, Nikolaus Grigorieff, and Melissa J. Moore. Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis. *RNA*, 8:426–439, 2002.
- [93] Zhaolan Zhou, Jeonggu Sim, Jack Griffith, and Robin Reed. Purification and electron microscopic visualization of functional human spliceosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99:12203–12207, 2002.
- [94] Ohad Medalia, Dieter Typke, Reiner Hegerl, Mina Angenitzki, Joseph Sperling, and Ruth Sperling. Cryoelectron microscopy and cryoelectron tomography of the nuclear pre-mRNA processing machine. *Journal of Structural Biology*, 138:74–84, 2002.
- [95] Maia Azubel, Sharon G. Wolf, Joseph Sperling, and Ruth Sperling. Three-Dimensional Structure of the Native Spliceosome by Cryo-Electron Microscopy. *Molecular Cell*, 15:833–839, 2004.
- [96] John Abelson. RNA Processing and the intervening sequence problem. *Ann. Rev. Biochem.*, 48:1035–1069, 1979.
- [97] C. L. Will, P. Fabrizio, and R. Lührmann. Nuclear Pre-mRNA Splicing. *Nucleic Acids and Molecular Biology*, 9:342–372, 1995.

- [98] Tom Misteli, Javier F. Caceres, and David L. Spector. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature*, 387:523–527, 1997.
- [99] Timothy W. Nilsen. RNA-RNA Interactions in Nuclear Pre-mRNA Splicing. In Robert W. Simons and Marianne Grunberg-Manago, editors, *RNA Structure and Function*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1998.
- [100] Jonathan P. Staley and Christine Guthrie. Mechanical Devices of the Spliceosome: Motors, Clocks, Springs, and Things. *Cell*, 92:315–326, 1998.
- [101] Heather L. Murray and Kevin A. Jarrell. Flipping the Switch to an Active Spliceosome. *Cell*, 96:599–602, 1999.
- [102] Timothy W. Nilsen. The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *BioEssays*, 25:1147–1149, 2003.
- [103] Rebecca L. Coppins and Scott K. Silverman. A DNA enzyme that mimics the first step of RNA splicing. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11:270–274, 2004.
- [104] David A. Brow. Allosteric Cascade of Spliceosome Activation. *Annu. Rev. Genet.*, 36:333–360, 2002.
- [105] Stephen R. Price, Philip R. Evans, and Kiyoshi Nagai. Crystal structure of the spliceosomal U2B⁷-U2A¹ protein complex bound to a fragment of U2 small nuclear RNA. *Nature*, 394:645–650, 1998.
- [106] Richard J. Grainger and Jean D. Beggs. Prp8 protein: At the heart of the spliceosome. *RNA*, 11:533–557, 2005.
- [107] Hiten D. Madhani and Christine Guthrie. A Novel Base-Pairing Interactions between U2 and U6 snRNAs Suggests a Mechanism for the Catalytic Activation of the Spliceosome. *Cell*, 71:803–817, 1992.
- [108] Saba Valadkhan and James L. Manley. A tertiary interaction detected in a human U2-U6 snRNA complex assembled in vitro resembles a genetically proven interaction in yeast. *RNA*, 6:206–219, 2000.
- [109] Saba Valadkhan and James L. Manley. Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs. *Nature*, 413:701–707, 2001.
- [110] Dipali G. Sashital, Gabriel Cornilescu, and Samuel E. Butcher. U2-U6 RNA folding reveals a group II intron-like domain and a four-helix junction. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11:1237–1242, 2004.
- [111] James G. Umen and Christine Guthrie. The second catalytic step of pre-mRNA splicing. *RNA*, 1:869–885, 1995.
- [112] Eric Westhof and Neocles Leontis. Flüchtige atomare Einblicke in eine Milliarden Jahre alte molekulare Maschine. *Angew. Chem.*, 112:1651–1655, 2000.

- [113] Craig Tuerk, Peter Gauss, Claude Thermes, Duncan R. Groebe, Margit Gayle, Nancy Guild, Gary Stormo, Yves D'Auberton-Carafa, Olke C. Uhlenbeck, Jr. Tinoco, Ignacio, Edward N. Brody, and Larry Gold. CUUCGG hairpins: Extraordinarily stable RNA secondary structures associated with various biochemical processes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:1364–1368, 1988.
- [114] Chaejoon Cheong, Gabriele Varani, Ignacio Tinoco, and Jr. Solution structure of an unusually stable RNA hairpin 5'GGAC(UUCG)GUCC. *nature*, 346:680–682, 1990.
- [115] Gabriele Varani, Chaejoo Cheong, and Jr. Tinoco, Ignacio. Structure of an Unusually Stable RNA hairpin. *Biochemistry*, 30:3280–3289, 1991.
- [116] Frederic H. T. Allain and Gabriele Varani. Divalent metal ion binding to a conserved wobble pair defining the upstream site of cleavage of group I self-splicing introns. *Nucleic Acids Research*, 23:341–350, 1995.
- [117] Stephen R. Lynch, Jeffrey G. Pelton, Ignacio Tinoco, and Jr. NMR Assignment of a 2'-Hydroxyl Proton from the UUCG Tetraloop Through Long- Range Correlations with ^{13}C . *Magnetic Resonance in Chemistry*, 34:S11–S17, 1996.
- [118] M. Abdelkafi, M. Ghomi, P. Y. Turpin, V. Baumruk, C. Herve du Penhoat, O. Lampire, P. Goyer, Namane A., C. Gouyette, T. Huynh-Dinh, and L. Bednarova. Common Structural Features of UUCG and UACG Tetraloops in Very Short Hairpins Determined by UV Absorption, Raman, IR and NMR Spectroscopies. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 14:579–593, 1997.
- [119] Eric Ennifar, A. Nikulin, S. Tishchenko, A. Serganov, N. Nevskaya, M. Garber, B. Ehresmann, C. Ehresmann, S. Nikonov, and P. Dumas. The Crystal Structure of UUCG Tetraloop. *J. Mol. Biol.*, 304:35–42, 2000.
- [120] Chaejoon Cheong and Hae-Kap Cheong. RNA Structure: Tetraloops. *Encyclopedia of Life Sciences*, pages 1–7, 2001.
- [121] Michael Zuker. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31:3406–3415, 2003.
- [122] Dierk Blechschmidt. *Synthese von ^{13}C , ^{15}N -markierten DNA und RNA-Oligonukleotiden - ein biochemischer Ansatz*. Doktorarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt, 1999.
- [123] Michael Zuker. On Findings All Supoptimal Foldings of an RNA Molecule. *Science*, 244:48–52, 1989.
- [124] Michael Zuker. Calculating nucleic acid secondary structure. *Current Opinion in structural Biology*, 10:303–310, 2000.
- [125] E. E. Rusakova, V. L. Tunitskaya, and S. N. Kochetkov. T7 RNA Polymerase. *Molecular Biology*, 33:304–317, 1999.
- [126] Srinivas S. Sastry and Barbara M. Ross. Nuclease Activity of T7 RNA Polymerase and the Heterogeneity of Transcription Elongation Complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 272:8644–8652, 1997.

- [127] William T. McAllister. Structure and Function of the Bacteriophage T7 RNA Polymerase (or, the Virtues of Simplicity). *Cellular and Molecular Biology Research*, 39:385–391, 1993.
- [128] S. N. Kochetkov, E. E. Rusakova, and V. L. Tunitskaya. Recent studies of T7 RNA polymerase mechanism. *FEBS Letters*, 440:264–267, 1998.
- [129] Graham M. T. Cheetham, David Jeruzalmi, and Thomas A. Steitz. Structural basis for initiation of transcription from an RNA polymerase-promoter complex. *Nature*, 399:80–83, 1999.
- [130] Tom Ellenberger. Unraveling the mysteries of transcription. *Nature Structural Biology*, 6:497–499, 1999.
- [131] Graham M. T. Cheetham and Thomas A. Steitz. Insights into transcription: structure and function of single-subunit DNA-dependent RNA polymerases. *Current Opinion in Structural Biology*, 10:117–123, 2000.
- [132] Y. Whitney Yin and Thomas A. Steitz. Structural Basis for the Transition from Initiation to Elongation Transcription in T7 RNA polymerase. *Science*, 298:1387–1395, 2002.
- [133] Tahir H. Tahirov, Dmitry Temiakov, Michael Anikin, Vsevolod Patlan, William T. McAllister, Dmitry G. Vassylyev, and Shigeyuki Yokoyama. Structure of a T7 RNA polymerase elongation complex at 2.9 Angstrom resolution. *Nature*, 420:43–49, 2002.
- [134] Dmitry Temiakov, Vsevolod Patlan, Michael Anikin, William T. McAllister, Shigeyuki Yokoyama, and Dmitry G. Vassylyev. Structural Basis for Substrate Selection by T7 RNA Polymerase. *Cell*, 116:381–391, 2004.
- [135] Ronny I. Drapkin and Danny F. Reinberg. RNA Synthesis. *Encyclopedia of Life Sciences*, pages 1–7, 2001.
- [136] Kevin Burgess and Dan Cook. Syntheses of Nucleoside Triphosphates. *Chem. Rev.*, 100:2047–2059, 2000.
- [137] Irene M. Lagoja and Piet Herdewijn. Chemical Synthesis of ^{13}C and ^{15}N Labeled Nucleosides. *Synthesis*, pages 301–314, 2002.
- [138] Jan Milecki. Specific labelling of nucleosides and nucleotides with ^{13}C and ^{15}N . *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 45:307–337, 2002.
- [139] Ethan S. Simon, Sven Grabowski, and George M. Whitesides. Convenient Syntheses of Cytidine 5'-Triphosphate, Guanosine 5'-Triphosphate, and Uridine 5'-Triphosphate and Their Use in the Preparation of UDP-Glucose, UDP-glucuronic Acid, and GDP-mannose. *J. Org. Chem.*, 55:1834–1841, 1990.
- [140] Edward P. Nikonowicz, Amy Sirr, Pascale Legault, Fiona M. Jucker, Leslie M. Baer, and Arthur Pardi. Preparation of ^{13}C and ^{15}N labelled RNAs for heteronuclear multidimensional NMR studies. *Nucleic Acids Research*, 20:4507–4513, 1992.

- [141] Robert T. Batey, Maki Inada, Elizabeth Kujawinski, Joseph D. Puglisi, and James R. Williamson. Preparation of isotopically labeled ribonucleotides for multidimensional NMR spectroscopy of RNA. *Nucleic Acids Research*, 20:4515–4523, 1992.
- [142] Malgorzata J. Michnicka, J. Wade Harper, and Garry C. King. Selective Isotopic Enrichment of Synthetic RNA: Application to the HIV-1 TAR Element. *Biochemistry*, 32:395–400, 1993.
- [143] Jennifer V. Hines, Stacy M. Landry, Gabriele Varani, and Jr. Tinoco, Ignacio. Carbon-Proton Scalar Couplings in RNA: 3D Heteronuclear and 2D Isotope-Edited NMR of a ^{13}C -Labeled Extra-Stable Hairpin. *J. Am. Chem. Soc.*, 116:5823–5831, 1994.
- [144] Tommy Nyholm, Michael Andäng, Graham Hotchkiss, Torleif Härd, Herbert Baumann, Sten Larsson, and Lars Ährlund Richter. A method for production of $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ double labelled RNA in *E. coli*, and subsequent in vitro synthesis of ribonucleotide 5' triphosphates. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 30:59–68, 1995.
- [145] David W. Hoffman and Jason A. Holland. Preparation of carbon-13 labeled ribonucleotides using acetate as an isotope source. *Nucleic Acids Research*, 23:3361–3362, 1995.
- [146] Robert T. Batay, John L. Battiste, and James R. Williamson. Preparation of Isotopically Enriched RNAs for Heteronuclear NMR. *Methods in Enzymology*, 261:300–322, 1995.
- [147] E. P. Nikonowicz, K. Kalurachchi, and E. DeJong. Comparison of H5 and H8 relaxation rates of a $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ labeled RNA oligonucleotide with selective protonation at C5 and C8. *FEBS Letters*, 415:109–113, 1997.
- [148] Edward P. Nikonowicz, Malgorzata Michnicka, and Eric DeJong. Improved NOE-Based Sequential Correlation of Base and 1' Proton Resonances in Labeled Nucleic Acids. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:3813–3814, 1998.
- [149] Robert T. Batey, Normand Cloutier, Hongyuan Mao, and James R. Williamson. Improved large scale culture of *Methylophilus methylotrophus* for $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ labeling and random fractional deuteration of ribonucleotides. *Nucleic Acids Research*, 24:4836–4837, 1996.
- [150] Jozef Nahalka, Ziyi Liu, Peter Gemeiner, and Peng George Wang. Nucleoside triphosphates production using recombinant *Escherichia coli* entrapped in calcium pectate gel. *Biotechnology Letters*, 24:925–930, 2002.
- [151] Thomas J. Tolbert and James R. Williamson. Preparation of Specifically Deuterated RNA for NMR Studies Using an Combination of Chemical and Enzymatic Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 118:7929–7940, 1996.
- [152] Thomas J. Tolbert and James R. Williamson. Preparation of Specifically Deuterated and ^{13}C -Labeled RNA for NMR Studies Using Enzymatic Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 119:12100–12108, 1997.
- [153] Lincoln G. Scott, Thomas J. Tolbert, and James R. Williamson. Preparation of Specifically ^2H - and ^{13}C -Labeled Ribonucleotides. *Methods in Enzymology*, 317:18–38, 2000.

- [154] Jenny A. M. T. C. Cromsigt, Jürgen Schleucher, Karin Kidd-Ljunggren, and Sybren S. Wijmenga. Synthesis of Specifically Deuterated Nucleotides for NMR Studies on RNA. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, Conversation 11:211–219, 2000.
- [155] Jenny Cromsigt, Jürgen Schleucher, Tomas Gustafsson, Jan Kihlberg, and Sybren Wijmenga. Preparation of partially $^2\text{H}/^{13}\text{C}$ -labelled RNA for NMR studies. Stereo-specific deuteration of the H5' in nucleotides. *Nucleic Acids Research*, 30:1639–1645, 2002.
- [156] Sara Flodell, Jenny Cromsigt, Jürgen Schleucher, Karin Kidd-Ljunggren, and Sybren Wijmenga. Structure Elucidation of the Hepatitis B Virus Encapsidation Signal by NMR on Selectively Labeled RNAs. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 19:627–636, 2002.
- [157] Bingzi Chen, Elizabeth R. Jamieson, and Thomas D. Tullius. A General Synthesis of Specifically Deuterated Nucleotides for Studies of DNA and RNA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12:3093–3096, 2002.
- [158] P. A. Krieg and D. A. Melton. In Vitro RNA Synthesis with SP6 RNA Polymerase. *Methods in Enzymology*, pages 397–415, 1987.
- [159] John F. Milligan, Duncan R. Groebe, Gary W. Wietherell, and Olke C. Uhlenbeck. Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Research*, 15:8783–8798, 1987.
- [160] John F. Milligan and Olke C. Uhlenbeck. Synthesis of Small RNAs Using T7 RNA Polymerase. *Methods in Enzymology*, 180:51–62, 1989.
- [161] Jacqueline R. Wyatt, Michael Chastain, and Joseph D. Puglisi. Synthesis and Purification of Large Amounts of RNA Oligonucleotides. *BioTechniques*, 11:764–769, 1991.
- [162] H. Klenow and I. Henningsen. Selective Elimination of the Exonuclease Activity of the Deoxyribonucleic Acid Polymerase from Escherichia coli B by Limited Proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 65:168–175, 1970.
- [163] Catherine M. Joyce and Nigel D. F. Grindley. Construction of a plasmid that overproduces the large proteolytic fragment (Klenow fragment) of DNA polymerase I of Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80:1830–1834, 1983.
- [164] Stephen R. Price, Nobutoshi Ito, Chris Oubridge, Johanna M. Avis, and Kiyoshi Nagai. Crystallization of RNA-Protein Complexes I. Methods for the Large-scale Preparation of RNA Suitable for Crystallographic Studies. *J. Mol. Biol.*, 249:398–408, 1995.
- [165] Stephen R. Price, Chris Oubridge, Gabriele Varani, and Kiyoshi Nagai. Preparation of RNA:protein complexes for X-ray crystallography and NMR. *RNA:Protein Interactions - A Practical Approach*, Oxford University Press:37–74, 1998.
- [166] Jeffrey A. Kern and Robert H. Davis. Application of Solution Equilibrium Analysis to in Vitro RNA Transcription. *Biotechnol. Prog.*, 13:747–756, 1997.
- [167] Philip R. Cunningham and James Ofengand. Use of Inorganic Pyrophosphatase to Improve the Yield of In Vitro Transcription Reactions Catalyzed by T7 RNA Polymerase. *BioTechniques*, 9:713–714, 1990.

- [168] Lynn E. Macdonald, Youwen Zhou, and William T. McAllister. Termination and Slippage by Bacteriophage T7 RNA Polymerase. *J. Mol. Biol.*, 232:1030–1047, 1993.
- [169] Jeffrey A. Pleiss, Maria L. Derrick, and Olke C. Uhlenbeck. T7 RNA polymerase produces 5' end heterogeneity during in vitro transcription from certain templates. *RNA*, 4:1313–1317, 1998.
- [170] Mark Helm, Herve Brule, Richard Giege, and Catherine Florentz. More mistakes by T7 RNA polymerase at the 5' ends of in vitro-transcribed RNAs. *RNA*, 5:618–621, 1999.
- [171] Tricia M. Coleman, Guocan Wang, and Faqing Huang. Superior 5' homogeneity of RNA from ATP-initiated transcription under the T7 f2.5 promoter. *Nucleic Acids Research*, 32:e14, 2004.
- [172] Simon E. Moroney and Joseph A. Piccirilli. Abortive Products and Initiating Nucleosides during Transcription by T7 RNA Polymerase. *Biochemistry*, 30:10343–10349, 1991.
- [173] Christian Cazenave and Olke C. Uhlenbeck. RNA template-directed RNA synthesis by T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:6972–6976, 1994.
- [174] Sean Moran, Rex X.-F. Ren, Charles J. Sheils, Squire Rumney IV, and Eric T. Kool. Non-hydrogen bonding 'terminator' nucleosides increase the 3'-end homogeneity of enzymatic RNA and DNA synthesis. *Nucleic Acid Research*, 24:2044–2052, 1996.
- [175] C. Kao, M. Zheng, and S. Rüdiger. A simple and efficient method to reduce non-templated nucleotide addition at the 3' terminus of RNAs transcribed by T7 RNA polymerase. *RNA*, 5:1268–1272, 1999.
- [176] Cheng Kao, Simon Rüdiger, and Minxue Zheng. A Simple and Efficient Method to Transcribe RNAs with Reduced 3' Heterogeneity. *Methods*, 23:201–205, 2001.
- [177] Robert H. Symons. Self-cleavage of RNA in the replication of small pathogens of plants and animals. *Trends in Biochemical Sciences*, 14:445–450, 1989.
- [178] Martha J. Fedor and James R. Williamson. The Catalytic Diversity of RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6:399–412, 2005.
- [179] Jennifer A. Doudna and Jon R. Lorsch. Ribozyme catalysis: not different, just worse. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12:395–402, 2005.
- [180] Olke C. Uhlenbeck. A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature*, 328:596–600, 1987.
- [181] Heike Schürer, Kathrin Lang, Jens Schuster, and Mario Mörl. A universal method to produce in vitro transcripts with homogeneous 3' ends. *Nucleic Acid Research*, 30:e56, 2002.
- [182] Scott C. Walker, Johanna M. Avis, and Graeme L. Conn. General plasmids for producing RNA in vitro transcripts with homogeneous ends. *Nucleic Acids Research*, 31:e82, 2003.

- [183] Mario Mörl, Esther Lizano, Dagmar K. Willkomm, and Roland K. Hartmann. Production of RNAs with Homogeneous 5' and 3' Ends. In A. Schön E. Westhof R. K. Hartmann, A. Bindereif, editor, *Handbook of RNA Biochemistry*, volume 1, pages 22–35. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, 2005.
- [184] Elizabeth L. Holbrook and Stephen R. Holbrook. Crystallization of Nucleic Acids. *Encyclopedia of Life Sciences*, pages 1–4, 2001.
- [185] Barbara L. Golden and Craig E. Kundrot. RNA crystallization. *Journal of Structural Biology*, 142:98–107, 2003.
- [186] Luke d Sherlin, Timothy L. Bullock, T. Amar Nissan, John J. Perona, Frederick J. Lari-viere, Olke C. Uhlenbeck, and Stephen A. Scaringe. Chemical and enzymatic synthesis of tRNAs for high-throughput crystallization. *RNA*, 7:1671–1678, 2001.
- [187] Thomas P. Shields, Emilia T. Mollova, Linda Ste. Marie, Mark R. Hansen, and Arthur Pardi. High-performance liquid chromatography purification of homogenous-length RNA produced by trans cleavage with a hammerhead ribozyme. *RNA*, 5:1259–1267, 1999.
- [188] Adrian R. Ferre-D'Amare and Jennifer A. Doudna. Use of cis- and trans-ribozymes to remove 5' and 3' heterogeneities from milligrams of in vitro transcribed RNA. *Nucleic Acids Research*, 24:977–978, 1996.
- [189] Bharat M. Chowrira, Pamela A. Pavco, and James A. McSwiggen. In Vitro and in Vivo Comparison of Hammerhead, Hairpin, and Hepatitis Delta Virus Self-processing Ribozyme Cassettes. *The Journal of Biological Chemistry*, 269:25856–25864, 1994.
- [190] Anne T. Perrotta and Michael D. Been. Cleavage of Oligoribonucleotides by a Ribozyme Derived from the Hepatitis d Virus RNA Sequence. *Biochemistry*, 31:16–21, 1992.
- [191] Michael D. Been, Anne T. Perrotta, and Sarah P. Rosenstein. Secondary Structure of the Self-Cleaving RNA of Hepatitis Delta Virus: Applications to Catalytic RNA Design. *Biochemistry*, 31:11843–11852, 1992.
- [192] Michael D. Been. Cis- and trans-acting ribozymes from a human pathogen, hepatitis delta virus. *TIBS*, 19:251–256, 1994.
- [193] Stephen W. Santoro and Gerald F. Joyce. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:4262–4266, 1997.
- [194] Stephen W. Santoro and Gerald F. Joyce. Mechanism and Utility of an RNA-Cleaving DNA Enzyme. *Biochemistry*, 37:13330–13342, 1998.
- [195] Gerald F. Joyce. RNA Cleavage by the 10-23 DNA Enzyme. *Methods in Enzymology*, 341:503–517, 2001.
- [196] Qiu-Chen He, Jing-Min Zhou, De-Min Zhou, Yuka Nakamatsu, Tadashi Baba, and Kazunari Taira. Comparison of Metal-Ion-Dependent Cleavages of RNA by a DNA Enzyme and a Hammerhead Ribozyme. *Biomacromolecules*, 3:69–83, 2002.

- [197] Phillip Ordoukhanian and Gerald F. Joyce. RNA-Cleaving DNA Enzymes with Altered Regio- or Enantioselectivity. *J. Am. Chem. Soc.*, 124:12499–12506, 2002.
- [198] Muhammad Sohail, Graeme Doran, Johann Riedemann, Val Macaulay, and Edwin M. Southern. A simple and cost-effective method for producing small interfering RNAs with high efficacy. *Nucleic Acid Research*, 31:e38, 2003.
- [199] Murray J. Cairns, Andrew King, and Lun-Quan Sun. Optimisation of the 10-23 DNAzyme-substrate pairing interactions enhanced RNA cleavage activity at purine-cytosine target sites. *Nucleic Acid Research*, 31:2883–2889, 2003.
- [200] Fei Chen, Ruijian Wang, Zhe Li, Bin Liu, Xiaoping Wang, Yanhong Sun, Dongyun Hao, and Jin Zhang. A novel replicating circular DNAzyme. *Nucleic Acids Research*, 32:2336–2341, 2004.
- [201] Scott K. Silverman. Breaking Up Is Easy To Do (If You're a DNA Enzyme that Cleaves RNA). *Chemistry & Biology*, 11:7–8, 2004.
- [202] Biji T. Kurien and R. Hal Scofield. Extraction of Nucleic Acid Fragments from Gels. *Analytical Biochemistry*, 302:1–9, 2002.
- [203] H. Peter Zassenhaus, Ronald A. Butow, and Yolanda Hannon. Rapid Electroelution of Nucleic Acids from Agarose and Acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 125:125–130, 1982.
- [204] Peter J. Lukavsky and Joseph D. Puglisi. Large-scale preparation and purification of polyacrylamide-free RNA oligonucleotides. *RNA*, 10:889–893, 2004.
- [205] Hae-Kap Cheong, Eunha Hwang, Chulhyun Lee, Byong-Seok Choi, and Chaejoon Cheong. Rapid preparation of RNA samples for NMR spectroscopy and X-ray crystallography. *Nucleic Acids Research*, 32:e84, 2004.
- [206] William J. Warren and George Vella. Principles and Methods for the Analysis and Purification of Synthetic Deoxyribonucleotides by High-Performance Liquid Chromatography. *Molecular Biotechnology*, 4:179–199, 1995.
- [207] Matthias Stoldt, Jens Wöhnert, Matthias Görlach, and Larry R. Brown. The NMR structure of Escherichia coli ribosomal protein L25 shows homology to general stress proteins and glutaminyl-tRNA synthetases. *The EMBO Journal*, 17:6377–6384, 1998.
- [208] Martin Gilar. Analysis and Purification of Synthetic Oligonucleotides by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array and Mass Spectrometry Detection. *Analytical Biochemistry*, 298:196–206, 2001.
- [209] Martin Gilar, Kenneth J. Fountain, Yeva Budman, Uwe D. Neue, Kurt R. Yardley, Paul D. Rainville, Reb J. II Russell, and John C. Gebler. Ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of oligonucleotides: Retention prediction. *Journal of Chromatography A*, 958:167–182, 2002.
- [210] Stacy L. Gelhaus, William R. LaCourse, Nathan A. Hagan, Gaya K. Amarasinghe, and Daniele Fabris. Rapid purification of RNA secondary structures. *Nucleic Acids Research*, 31:e135, 2003.

- [211] Gargi Choudhary and Csaba Horvath. Ion-Exchange Chromatography. *Methods in Enzymology*, 270:47–82, 1996.
- [212] James R. Thayer, Randy McCormick, and Nebojsa Avdalovic. High-Resolution Nucleic Acid Separations by High-Performance Liquid Chromatography. *Methods in Enzymology*, 271:147–174, 1996.
- [213] Waldo E. Cohn. The Anion-Exchange Separation of Ribonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.*, 72:1471–1478, 1950.
- [214] Walter A. Ausserer and Michael L. Biros. High-Resolution Analysis and Purification of Synthetic Oligonucleotides with Strong Anion-Exchange HPLC. *BioTechniques*, 19:136–139, 1995.
- [215] Francine Wincott, Anthony DiRenzo, Chris Shaffer, Susan Grimm, Danuta Tracz, Christopher Workman, David Sweedler, Carolyn Gonzalez, Stephen A. Scaringe, and Nassim Usman. Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes. *Nucleic Acids Research*, 23:2677–2684, 1995.
- [216] Amy C. Anderson, Stephen A. Scaringe, Brandon E. Earp, and Christin A. Frederick. HPLC purification of RNA for crystallography and NMR. *RNA*, 2:110–117, 1996.
- [217] Dionex Cooperation. High-Resolution Analysis and Purification of Oligonucleotides with the DNAPac PA-100 Column. 1997.
- [218] Maurice Gueron, Pierre Plateau, and Michel Decorps. Solvent Signal Suppression in NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 23:135–209, 1991.
- [219] K. K. Ogilvie. The alkylsilyl protecting groups: In particular, the t-butyldimethylsilyl group in nucleoside and nucleotide chemistry. In J. L. Rideout, D. W. Henry, and L. M. Beacham, editors, *Nucleosides, nucleotides and their biological applications*, pages 209–256. Academic Press, Orlando, FL., 1983.
- [220] T. Wu and K. K. Ogilvie. A study on the alkylsilyl groups in oligoribonucleotide synthesis. *J. Org. Chem.*, 55:4717–4724, 1990.
- [221] Ravi Vinayak. Oligoribonucleotides: Theory and Synthesis. In Annette M. Griffin and Hugh G. Griffin, editors, *Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends*, volume 1 of *Current Innovations in Molecular Biology Series*, pages 107–126. Horizon Scientific Press, Norfolk, 1995.
- [222] Brian S. Sproat. RNA Synthesis Using 2'-O-(Tert-Butyldimethylsilyl) Protection. In Piet Herdewijn, editor, *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*, volume 288 of *Methods in Molecular Biology*, pages 17–31. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2004.
- [223] Ferdinand Hucho. Toxine als Werkzeuge in der Neurochemie. *Angewandte Chemie*, 107:23–36, 1995.
- [224] Thomas Walz, Teruhisa Hirai, Kazuyoshi Murata, J. Bernhard Heymann, Kaoru Mitsuoka, Yoshinori Fujiyoshi, Barbara L. Smith, Peter Agre, and Andreas Engel. The three-dimensional structure of aquaporin-1. *Nature*, 387:624–627, 1997.

- [225] Daxiong Fu, Andrew Libson, Larry J. W. Miercke, Cindy Weitzman, Peter Nollert, Jolanta Krucinski, and Robert M. Stroud. Structure of a Glycerol-Conducting Channel and the Basis for Its Selectivity. *Science*, 290:481–486, 2000.
- [226] Declan A. Doyle, Joao Morais Cabral, Richard A. Pfuetzner, Anling Kuo, Jacqueline M. Gulbis, Steven L. Cohen, Brian T. Chait, and Roderick MacKinnon. The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity. *Science*, 280:69–77, 1998.
- [227] Roderick MacKinnon, Steven L. Cohen, Anling Kuo, Alice Lee, and Brian T. Chait. Structural Conservation in Prokaryotic and Eukaryotic Potassium Channels. *Science*, 280:106–109, 1998.
- [228] Amitabha Chattopadhyaya and Devaki A. Kelkar. Ion channels and D-amino acids. *J. Biosci.*, 30:147–149, 2005.
- [229] B. A. Wallace. Common structural features in gramicidin and other ion channels. *BioEssays*, 22:227–234, 2000.
- [230] Rene J. Dubos and Rollin D. Hotchkiss. The Production of Bactericidal Substances by Aerobic Sporulating Bacilli. *The Journal of Experimental Medicine*, 73:629–640, 1941.
- [231] Reinhard Sarges and Bernhard Witkop. Gramicidin A. V. The Structure of Valine- and Isoleucine-gramicidin A. *J. Am. Chem. Soc.*, 87:2011–2020, 1965.
- [232] Edward Katz and Arnold L. Demain. The Peptide Antibiotics of Bacillus: Chemistry, Biogenesis, and Possible Functions. *Bacteriological Reviews*, 41:449–474, 1977.
- [233] Nilima Sarkar, Donna Langley, and Henry Paulus. Biological function of gramicidin: Selective inhibition of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. USA*, 74:1478–1482, 1977.
- [234] Rober Fischer and Thomas Blumenthal. An interaction between gramicidin and the sigma subunit of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:1045–1048, 1982.
- [235] Aldar S. Bourinbaiar, Keith Krasinski, and William Borkowsky. Anti-HIV Effect of Gramicidin in vitro: Potential for Spermicide Use. *Life Sciences*, 54:PL5–9, 1993.
- [236] Bertil Hille. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer, Sunderland, third edition, 1992.
- [237] Olaf Sparre Andersen. Gramicidin Channels. *Ann. Rev. Physiol.*, 46:531–548, 1984.
- [238] David D. Busath. The Use of Physical Methods in Determining Gramicidin Channel Structure and Function. *Annu. Rev. Physiol.*, pages 473–501, 1993.
- [239] II Koeppe, Roger E. and Olaf S. Andersen. Engineering the Gramicidin Channel. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 25:231–258, 1996.
- [240] B. A. Wallace. Recent Advances in the High Resolution Structures of Bacterial Channels: Gramicidin A. *Journal of Structural Biology*, 121:123–141, 1998.

- [241] Denise V. Greathouse, II Koeppe, Roger E., Lyndon L. Providence, S. Shobana, and Olaf S. Andersen. Design and Characterization of Gramicidin Channels. *Methods of Enzymology*, 294:525–550, 1999.
- [242] James F. Hinton. NMR Studies of Ion-transporting Biological Channels. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 39:89–137, 1999.
- [243] G. N. Ramachandran and R. Chandrasekaran. Conformation of Peptide Chains Containing Both L- & D-Residues: Part I-Helical Structures with Alternating L- & D-Residues with Special Reference to the LD-Ribbon & the LD-Helices. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 9:1–11, 1972.
- [244] D. W. Urry. The Gramicidin A Transmembrane Channel: A Proposed $\pi(L,D)$ Helix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68:672–676, 1971.
- [245] E. Navarro, E. Fenude, and B. Celda. Solution Structure of a D,L-Alternating Oligonor-leucine as a Model of Double-Stranded Antiparallel β -Helix. *Biopolymers*, 64:198–209, 2002.
- [246] F. Colonna-Cesari, S. Premilat, F. Heitz, G. Spach, and B. Lotz. Helical Structures of Poly(D-L-peptides). A Conformational Energy Analysis. *Macromolecules*, 10:1284–1288, 1977.
- [247] B. Lotz, F. Colonna-Cesari, F. Heitz, and G. Spach. A Family of Double Helices of Alternating Poly(γ -Benzyl-D-L-Glutamate), a Stereochemical Model for Gramicidin A. *J. Mol. Biol.*, 106:915–942, 1976.
- [248] D. W. Urry, M. C. Goodall, J. D. Glickson, and D. F. Mayers. The Gramicidin A Transmembrane Channel: Characteristics of Head-to-Head Dimerized $\pi(L,D)$ Helices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68:1907–1911, 1971.
- [249] William R. Veatch, Eric T. Fossel, and Elkan R. Blout. The Conformation of Gramicidin A. *Biochemistry*, 13:5249–5256, 1974.
- [250] S. V. Sychev, N. A. Nevskaya, St Jordanov, E. N. Shepel, A. I. Miroshnikov, and V. T. Ivanov. The Solution Conformations of Gramicidin A and Its Analogs. *Bioorganic Chemistry*, 9:121–151, 1980.
- [251] William R. Veatch and Elkan R. Blout. The Aggregation of Gramicidin A in Solution. *Biochemistry*, 13:5257–5264, 1974.
- [252] B. M. Burkhardt, N. Li, D. A. Langs, W. A. Pangborn, and W. L. Duax. The conducting form of gramicidin A is a right-handed double-stranded double helix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:12950–12955, 1998.
- [253] Y. Chen, A. Tucker, and B. A. Wallace. Solution Structure of a Parallel Left-handed Double-helical Gramicidin A Determined by 2D 1H NMR. *J. Mol. Biol.*, 264:757–769, 1996.
- [254] M. C. Bano, L. Braco, and C. Abad. HPLC study on the 'history' dependence of gramicidin A conformation in phospholipid model membranes. *FEBS Letters*, 250:67–71, 1989.

- [255] Alexander S. Arseniev, Vladimir F. Bystrov, Vadim T. Ivanov, and Yuri A. Ovchinnikov. NMR solution conformation of gramicidin A double helix. *FEBS Lett.*, 165:51–56, 1984.
- [256] Alexander S. Arseniev, Igor L. Barsukov, and Vladimir F. Bystrov. NMR solution structure of gramicidin A complex with caesium cations. *FEBS Letters*, 180:33–39, 1985.
- [257] V. F. Bystrov and A. S. Arseniev. Diversity of the gramicidin A spatial structure: two-dimensional ^1H NMR Study in Solution. *Tetrahedron*, 44:925–940, 1988.
- [258] Alexei N. Nekrasov, Anatoly V. Stepanov, and Vladimir P. Timofeev. The features of the spatial structure of the gramicidin A-caesium complex. *FEBS Letters*, 371:35–38, 1995.
- [259] S. M. Pascal and T. A. Cross. Structure of an Isolated Gramicidin A Double Helical Species by High Resolution Nuclear Magnetic Resonance. *J. Mol. Biol.*, 226:1101–1109, 1992.
- [260] Zhenlu Zhang, S. M. Pascal, and T. A. Cross. A Conformational Rearrangement in Gramicidin A: From a Double-Stranded Left- Handed to a Single-Stranded Right-Handed Helix. *Biochemistry*, 31:8822–8828, 1992.
- [261] S. M. Pascal and T. A. Cross. High-resolution structure and dynamic implications for a double-helical gramicidin A conformer. *Journal of Biomolecular NMR*, 3:495–513, 1993.
- [262] Eric T. Fossel, William R. Veatch, Yuri A. Ovchinnikov, and Elkan R. Blout. A ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Study of Gramicidin A in Monomer and Dimer Forms. *Biochemistry*, 13:5264–5275, 1974.
- [263] Frederic Heitz, Annie Heitz, and Yves Trudelle. Conformations of Gramicidin A and its 9,11,13,15-Phenylalanyl Analog in Dimethyl Sulfoxide and Chloroform. *Biophysical Chemistry*, 24:149–160, 1986.
- [264] Geoffrey E. Hawkes, Lu-Yun Lian, Edward W. Randall, Keith D. Sales, and Eirian H. Curzon. The conformation of gramicidin A in dimethylsulfoxide solution. *Eur. J. Biochem.*, 166:437–445, 1987.
- [265] Benoit Roux, Rafael Brüsweiler, and Richard R. Ernst. The structure of gramicidin A in dimethylsulfoxide/acetone. *Eur. J. Biochem.*, 194:57–60, 1990.
- [266] Vladimir F. Bystrov, Alexander S. Arseniev, Igor L. Barsukov, and Andrei L. Lomize. 2D NMR of Single and Double Stranded Helices of Gramicidin A in Micelles and Solutions. *Bulletin of Magnetic Resonance*, 8:84–94, 1987.
- [267] B. A. Wallace and K. Ravikumar. The Gramicidin Pore: Crystal Structure of a Cesium Complex. *Science*, 241:182–187, 1988.

- [268] J. Antoinette Killian, Kari U. Prasad, Dorothy Hains, and Dan W. Urry. The Membrane as an Environment of Minimal Interconversion. A Circular Dichroism Study on the Solvent Dependence of the Conformational Behavior of Gramicidin in Diacylphosphatidylcholine Model Membranes. *Biochemistry*, 27:4848–4855, 1988.
- [269] B. A. Wallace, W. R. Veatch, and E. R. Blout. Conformation of Gramicidin A in Phospholipid Vesicles: Circular Dichroism Studies of Effects of Ion Binding, Chemical Modification, and Lipid Structure. *Biochemistry*, 20:5754–5760, 1981.
- [270] II Koeppe, Roger E., Denise V. Greathouse, Anthony Jude, Gayatri Saberwal, Lyndon L. Providence, and Olaf S. Andersen. Helix Sense of Gramicidin Channels as a Nonlocal Function of the Primary Sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, 269:12567–12576, 1994.
- [271] B. A. Wallace. Gramicidin A Adopts Distinctly Different Conformations in Membranes and in Organic Solvents. *Biopolymers*, 22:397–402, 1983.
- [272] A. S. Arseniev, I. L. Barsukov, V. F. Bystrov, A. L. Lomize, and Yu A. Ovchinnikov. 1H-NMR study of gramicidin A transmembrane ion channel. *FEBS Letters*, 186:168–174, 1985.
- [273] Maslennikov, I. V., Arseniev, A. S., Bystrov, and V. F. 3D-Struktur von N-Acetyl(desformyl) Gramicidin A in Micellen. *Biologische Membranen*, 5:459–474, 1988.
- [274] R. R. Ketchum, W. Hu, and T. A. Cross. High-Resolution Conformation of Gramicidin A in a Lipid Bilayer by Solid-State NMR. *Science*, 261:1457–1460, 1993.
- [275] Lomize, A. L., Orehov, V. U., Arseniev, and A. S. Verbesserung der 3D-Struktur von Gramicidin A. *Bioorganische Chemie*, 18:182–200, 1992.
- [276] J. F. Hinton. Cation-Binding Location and Hydrogen-Exchange Sites for Gramicidin in SDS Micelles Using NOESY NMR. *Journal of Magnetic Resonance B*, 112:26–31, 1996.
- [277] L. K. Nicholson and T. A. Cross. Gramicidin Cation Channel: An Experimental Determination of the Right- Handed Helix Sense and Verification of β -Type Hydrogen Bonding. *Biochemistry*, 28:9379–9385, 1989.
- [278] S. W. Chiu, L. K. Nicholson, M. T. Brennehan, S. Subramaniam, Q. Teng, J. A. McCammon, T. A. Cross, and E. Jakobsson. Molecular Dynamics computations and solid state nuclear magnetic resonance of the gramicidin cation channel. *Biophysical Journal*, 60:974–978, 1991.
- [279] F. Tian, K. C. Lee, W. Hu, and T. A. Cross. Monovalent Cation Transport: Lack of Structural Deformation upon Cation Binding. *Biochemistry*, 35:11959–11966, 1996.
- [280] T. A. Cross. Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Characterization of Gramicidin Channel Structure. *Methods of Enzymology*, pages 672–696.
- [281] Lara E. Townsley, W. Andrew Tucker, Simon Sham, and James F. Hinton. Structures of Gramicidins A, B, and C Incorporated into Sodium Dodecyl Sulfate Micelles. *Biochemistry*, 40:11676–11868, 2001.

- [282] Dan W. Urry, Tina L. Trapane, and Kari U. Prasad. Is the Gramicidin A Transmembrane Channel Single-Stranded or Double-Stranded Helix? A Simple Unequivocal Determination. *Science*, 221:1064–1067, 1983.
- [283] II Koeppe, Roger E., Lyndon L. Providence, Denise V. Greathouse, Frederic Heity, Yves Trudelle, Neil Purdie, and Olaf S. Andersen. On the Helix Sense of Gramicidin A Single Channels. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 12:49–62, 1992.
- [284] Editorial. Love that β -sheet. *Nature Structural Biology*, 5:749–750, 1998.
- [285] O. S. Andersen, H. J. Apell, and et al. Gramicidin channel controversy - the structure in a lipid environment. *Nature structural biology*, 6:609, 1999.
- [286] T. A. Cross, A. Arseniev, B. A. Cornell, and et al. Gramicidin channel controversy - revisited. *Nature Structural Biology*, 6:610–611, 1999.
- [287] Brian M. Burkhart and William L. Duax. Gramicidin channel controversy - reply. *Nature Structural Biology*, 6:611–612, 1999.
- [288] F. Kovacs, J. Quine, and T. A. Cross. Validation of the single-stranded channel conformation of gramicidin A by solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:7910–7915, 1999.
- [289] F. Tian and T. A. Cross. Cation Transport: An Example of Structural Based Selectivity. *J. Mol. Biol.*, 285:1993–2003, 1999.
- [290] Riqiang Fu, Myriam Cotten, and Timothy A. Cross. Inter- and intramolecular distance measurements by solid-state MAS NMR: Determination of gramicidin A channel dimer structure in hydrated phospholipid bilayers. *Journal of Biomolecular NMR*, 16:261–268, 2000.
- [291] E. Bamberg, H. J. Apell, H. Alpes, E. Gross, J. L. Morell, J. F. Harbaugh, K. Janko, and P. Läuger. Ion channels formed by chemical analogs of gramicidin A. *Faseb*, 37:2633–2638, 1978.
- [292] Charles J. Stankovich and Stuart L. Schreiber. Molecular Design of Transmembrane Ion Channels. *Chemtracts - Organic Chemistry*, 4:1–20, 1991.
- [293] E. Bamberg, H. Alpes, H. J. Apell, R. Bradley, B. Härter, M. J. Quelle, and D. W. Urry. Formation of Ionic Channels in Black Lipid Membranes by Succinic Derivatives of Gramicidin A. *J. Membrane Biol.*, 50:257–270, 1979.
- [294] H. J. Apell, E. Bamberg, and H. Alpes. Dicarboxylic Acid Analogs of Gramicidin A: Dimerization Kinetics and Single Channel Properties. *J. Membrane Biol.*, 50:271–285, 1979.
- [295] D. W. Urry, C. M. Venkatachalam, A. Spisni, R. J. Bradley, T. L. Trapane, and K. U. Prasad. The Malonyl Gramicidin Channel: NMR-Derived Rate Constants and Comparison of Calculated and Experimental Single-Channel Currents. *J. Membrane Biol.*, 55:29–51, 1980.

- [296] D. Lelievre, Y. Trudelle, F. Heity, and G. Spach. Synthesis and characterization of retro gramicidin A-D-Ala-gramicidin A, a 31-residue-long gramicidin analogue. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 33:379–385, 1989.
- [297] Charles J. Stankovic, Stefan H. Heinemann, Jose M. Delfino, Frederick J. Sigworth, and Stuart L. Schreiber. Transmembrane Channels Based on Tartaric Acid-Gramicidin A Hybrids. *Science*, 244:813–817, 1989.
- [298] Charles J. Stankovic, Stefan H. Heinemann, and Stuart L. Schreiber. Immobilizing the Gate of a Tartaric Acid-Gramicidin A Hybrid Channel Molecule by Rational Design. *J. Am. Chem. Soc.*, 112:3702–3704, 1990.
- [299] J. Barsukov, A. L. Lomize, A. S. Arseniev, and V. F. Bystrov. 3D-Struktur von Succinyl-bis(desformyl) Gramicidin A in Micellen. NMR- Analyse der Konformationen. *Biologische Membranen*, 4:171–193, 1987.
- [300] G. Andrew Woolley, Anna S. I. Jaikaran, Zhihua Zhang, and Shuyun Peng. Design of Regulated Ion Channels Using Measurements of Cis-Trans Isomerization in Single Molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, 117:4448–4454, 1995.
- [301] Linda Lien, Dominic C. J. Jaikaran, Zhihua Zhang, and G. Andrew Woolley. Photomodulated Blocking of Gramicidin Ion Channels. *J. Am. Chem. Soc.*, 118:12222–12223, 1996.
- [302] Vitali Borisenko, Darcy C. Burns, Zhihua Zhang, and G. Andrew Woolley. Optical Switching on Ion-Dipole Interactions in a Gramicidin Channel Analogue. *J. Am. Chem. Soc.*, 122:6364–6370, 2000.
- [303] Anna Schrey, Andrea Vescovi, Andrea Knoll, Corry Rickert, and Ulrich Koert. Synthese eines membranständigen THF-Gramicidin-Kationenkanals und Funktionsstudie. *Angew. Chem.*, 112:928–931, 2000.
- [304] Hans-Dieter Arndt, Andrea Knoll, and Ulrich Koert. Synthesis of Minigramicidin Ion Channels and Test of Their Hydrophobic Match with the Membrane. *ChemBioChem*, pages 221–223, 2001.
- [305] Hans-Dieter Arndt, Andrea Knoll, Dirk Bockelmann, Christian Griesinger, and Ulrich Koert. Cs⁺-induzierte Konformationsumwandlung von D-L-Peptid-Ionenkanälen und Selektivitätserhöhung durch Ether-delta-Aminosäuren. *Konferenz*, 2001.
- [306] Hans-Dieter Arndt, Andrea Vescovi, Anna Schrey, Jochen R. Pfeifer, and Ulrich Koert. Solution phase synthesis and purification of the minigramicidin ion channels and a succinyl-linked gramicidin. *Tetrahedron*, 58:2789–2801, 2002.
- [307] H.-D. Arndt, D. Bockelmann, A. Knoll, S. Lamberth, and C. Griesinger. Cation Control in Functional Helical Programming: Structure of a D,L-Peptide Ion Channel. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41:4062–4065, 2002.
- [308] Hans-Dieter Arndt. *Oligo-Pyrrolidine und Cyclohexyl-d-Aminosäuren - Potentielle chemische Nukleasen und Sekundärstruktur-bildende Baueinheiten für ionenselektive Kationenkanäle*. Doktorarbeit, Humboldt-Universität, Berlin, 2002.

- [309] Erwin Neher and Bert Sakmann. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260:799–801, 1976.
- [310] Witold K. Subczynski, Anna Wisniewska, Jun-Jie Yin, James S. Hyde, and Akihiro Kusumi. Hydrophobic Barriers of Lipid Bilayer Membranes Formed by Reduction of Water Penetration by Alkyl Chain Unsaturation and Cholesterol. *Biochemistry*, 33:7670–7681, 1994.
- [311] B. A. Lewis and D. M. Engelman. Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles. *J. Mol. Biol.*, 166:211–217, 1983.
- [312] Thad A. Harroun, William T. Heller, Thomas M. Weiss, Lin Yang, and Huey W. Huang. Experimental Evidence for Hydrophobic Matching and Membrane-Mediated Interactions in Lipid Bilayers Containing Gramicidin. *Biophys. J.*, 76:937–945, 1999.
- [313] Thad A. Harroun, William T. Heller, Thomas M. Weiss, Lin Yang, and Huey W. Huang. Theoretical Analysis of Hydrophobic Matching and Membrane-Mediated Interactions in Lipid Bilayers Containing Gramicidin. *Biophys. J.*, 76:3176–3185, 1999.
- [314] Fabrice Dumas, Maria Chantal Lebrun, and Jean-Francois Tocanne. Is the protein/lipid hydrophobic matching principle relevant to membrane organization and functions? *FEBS Lett.*, 458:271–277, 1999.
- [315] J. Antoinette Killian. Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1376:401–416, 1998.
- [316] Tamir Gil, John Hjort Ipsen, Ole G. Mouritsen, Mads C. Sabra, Maria M. Speretto, and Martin J. Zuckermann. Theoretical analysis of protein organization in lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1376:245–266, 1998.
- [317] J. A. Lundbaek, P. Birn, J. Girshman, A. J. Hansen, and O. S. Andersen. Membrane Stiffness and Channel Function. *Biochemistry*, 35:3825–3820, 1996.
- [318] Niloufar Mobashery, Claus Nielsen, and Olaf S. Andersen. The conformational preference of gramicidin channels is a function of lipid bilayer thickness. *FEBS Letters*, 412:15–20, 1997.
- [319] Denise V. Greathouse, James F. Hinton, Kyung S. Kim, and II Koeppe, Roger E. Gramicidin A/Short-Chain Phospholipid Dispersions: Chain Length Dependence of Gramicidin Conformation and Lipid Organization. *Biochemistry*, 33:4291–4299, 1994.
- [320] W. P. Aue, E. Bartholdi, and R. R. Ernst. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *The Journal of Chemical Physics*, 64:2229–2246, 1976.
- [321] L. Braunschweiler and R. R. Ernst. Coherence Transfer by Isotropic Mixing: Application to Proton Correlation Spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, 53:521–528, 1983.
- [322] Anil Kumar, R. R. Ernst, and K. Wüthrich. A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 95:1–6, 1980.

- [323] D. J. States, R. A. Haberkorn, and D. J. Ruben. A Two-Dimensional Nuclear Overhauser Experiment with Pure Absorption Phase in Four Quadrants. *Journal of Magnetic Resonance*, 48:286–292, 1982.
- [324] Dominique Marion, Mitsuhiro Ikura, Rolf Tschudin, and Ad Bax. Rapid Recording of 2D NMR Spectra without Phase Cycling. Application to the Study of Hydrogen Exchange in Proteins. *Journal of Magnetic Resonance*, 85:393–399, 1989.
- [325] Kurt Wüthrich. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. John Wiley & Sons, New York, 1986.
- [326] Vladimir J. Basus. Proton Nuclear Magnetic Resonance Assignments. *Methods in Enzymology*, 177:132–149, 1989.
- [327] C. Mark Fletcher, David N. M. Jones, Robert Diamond, and David Neuhaus. Treatment of NOE constraints involving equivalent or nonstereoassigned protons in calculations of biomolecular structures. *Journal of Biomolecular NMR*, 8:292–310, 1996.
- [328] A. T. Brünger. *X-PLOR Version 3.1, A System for X-ray Crystallography and NMR*. Yale University Press, New Haven, London, 1992.
- [329] S. Kirkpatrick, C. D. Gelatt, and M. P. Vecchi. Optimization by Simulated Annealing. *Science*, 220:671–680, 1983.
- [330] Axel T. Brünger, Paul D. Adams, and Luke M. Rice. New applications of simulated annealing in X-ray crystallography and solution NMR. *Current Biology*, 5:325–336, 1997.
- [331] Axel T. Brünger, Paul D. Adams, and Luke M. Rice. Annealing in crystallography: a powerful optimization tool. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 72:135–155, 1999.
- [332] A. R. Leach. A Survey of Methods for Searching the Conformational Space of Small and Medium-Sized Molecules. In Kenny B. Lipkowitz and Donald B. Boyd, editors, *Reviews in Computational Chemistry*, volume 2 of *Reviews in Computational Chemistry*, pages 1–55. 1991.
- [333] A. R. Leach. *Molecular Modelling, Principles and Applications*. Addison Wesley Longman, Essex, Singapore, 1996.
- [334] M. J. D. Powell. Restart procedures for the conjugate gradient method. *Mathematical Programming*, 12:241–254, 1977.
- [335] Robert Morrison and Dennis Hare. Determining Stereo-specific ^1H Nuclear Magnetic Resonance Assignments from Distance Geometry Calculations. *Journal of Molecular Biology*, 204:483–487, 1988.
- [336] Rutger H. A. Folmer, Cornelis W. Hilbers, Ruud N. H. Konings, and Michael Nilges. Floating stereospecific assignment revisited: Application to an 18 kDa protein and comparison with J-coupling data. *Journal of Biomolecular NMR*, 9:245–258, 1997.

- [337] R. Koradi, M. Billeter, and K. Wüthrich. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics*, 14:51–55, 1996.
- [338] Declan A. Doyle, Joao Morais Cabral, Richard A. Pfuetzner, Anling Kuo, Jacqueline M. Gulbis, Steven L. Cohen, Brian T. Chait, and Roderick MacKinnon. The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity. *Science*, 280:69–77, 1998.
- [339] Roman A. Laskowski, J. Antoon C. Rullmann, Malcolm W. MacArthur, Robert Kaptein, and Janet M. Thornton. AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *Journal of Biomolecular NMR*, 8:477–486, 1996.
- [340] R. Gratia and H. Kessler. Molecular Dynamics Study on Microheterogeneity and Preferential Solvation in Methanol/Chloroform Mixtures. *J. Phys. Chem. B*, 102:2027–2031, 1998.
- [341] Niels H. Andersen, Jonathan W. Neidigh, Scott M. Harris, Gregory M. Lee, Zhihong Liu, and Hui Tong. Extracting Information from the Temperature Gradients of Polypeptide NH Chemical Shifts. 1. The Importance of Conformational Averaging. *J. Am. Chem. Soc.*, 119:8547–8561, 1997.
- [342] Tomasz Cierpicki and Jacek Otlewski. Amide proton temperature coefficients as hydrogen bond indicators in proteins. *Journal of Biomolecular NMR*, 21:249–261, 2001.
- [343] Max Schulz. The end of the road for silicon? *Nature*, 399:729–730, 1999.
- [344] T. Ross Kelly, Michael C. Bowyer, K. Vijaya Bhaskar, David Bebbington, Alberto Garcia, Fengrui Lang, Min H. Kim, and Michael P. Jette. A Molecular Brake. *J. Am. Chem. Soc.*, 116:3657–3658, 1994.
- [345] Vincenzo Balzani, Alberto Credi, Francisco M. Raymo, and J. Fraser Stoddart. Artificial Molecular Machines. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39:3348–3391, 2000.
- [346] T. Ross Kelly, Imanol Tellitu, and Jose Perez Sestelo. In Search of Molecular Ratchets. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 36:1866–1868, 1997.
- [347] Nagatoshi Koumura, Edzard M. Geertsema, Marc B. van Gelder, Auke Meetsma, and Ben L. Feringa. Second Generation Light-Driven Molecular Motors. Unidirectional Rotation Controlled by a Single Stereogenic Center with Near-Perfect Photoequilibria and Acceleration of the Speed of Rotation by Structural Modification. *J. Am. Chem. Soc.*, 124:5037–5051, 2002.
- [348] Ben L. Feringa. *Molecular Switches*. Wiley-VCH, Weinheim, 2001.
- [349] Michael Karle, Dirk Bockelmann, Dirk Schumann, Christian Griesinger, and Ulrich Koert. Konformative Kupplung zweier Konformationsschalter. *Angew. Chem.*, 42:4684–4687, 2003.
- [350] Michael Karle. *Stereoselektive Synthese gekoppelter und photoaktiver Konformationsschalter*. Doktorarbeit, Philipps-Universität, Marburg, 2003.

- [351] Vincenzo Balzani, Alberto Credi, Gunter Mattersteig, Owen A. Matthews, Francisco M. Raymo, J. Fraser Stoddart, Margherita Venturi, Andrew J. P. White, and David J. Williams. Switching of Pseudorotaxanes and Catenanes Incorporating a Tetrathiafulvalene Unit by Redox and Chemical Inputs. *J. Org. Chem.*, 65:1924–1936, 2000.
- [352] Kobi Hasharoni, Haim Levanon, Scott R. Greenfield, David J. Gosztola, Walter A. Svec, and Michael R. Wasielewski. Radical Pair and Triplet State Dynamics of a Photosynthetic Reaction-Center Model Embedded in Isotropic Media and Liquid Crystals. *J. Am. Chem. Soc.*, 118:10228–10235, 1996.
- [353] Donatella Carbonera, Marilena Di Valentin, Carlo Corvaja, Giancarlo Agostini, Giovanni Giacometti, Paul A. Liddell, Darius Kuciauskas, Ana L. Moore, Thomas A. Moore, and Devens Gust. EPR Investigation of Photoinduced Radical Pair Formation and Decay to a Triplet State in a Carotene-Porphyrin-Fullerene Triad. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:4398–4405, 1998.
- [354] David Gosztola, Mark P. Niemczyk, and Michael R. Wasielewski. Picosecond Molecular Switch Based on Bidirectional Inhibition of Photoinduced Electron Transfer Using Photogenerated Electric Fields. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:5118–5119, 1998.
- [355] Seiji Shinkal, Masato Ikeda, Atsushi Sugasaki, and Masayuki Takeuchi. Positive Allosteric Systems Designed on Dynamic Supramolecular Scaffolds: Toward Switching and Amplification of Guest Affinity and Selectivity. *Accounts of Chemical Research*, 34:494–503, 2001.
- [356] Izuo Aoki, Toru Sakaki, and Seiji Shinkal. A New Metal Sensory System Based on Intramolecular Fluorescence Quenching on the Ionophoric Calix[4]arene Ring. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, pages 730–732, 1992.
- [357] A. Prasanna de Silva and R. A. D. Dayasiri Rupasinghe. A New Class of Fluorescent pH Indicators based on Photo-induced Electron Transfer. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, pages 1669–1670, 1985.
- [358] Jean-Pierre Sauvage and Christiane Dietrich-Buchecker. *Molecular Catenanes, Rotaxanes and Knots*. Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- [359] Sylvain L. Gilat, Stephen H. Kawai, and Jean-Marie Lehn. Light-Triggered Molecular Devices: Photochemical Switching Of optical and Electrochemical Properties in Molecular Wire Type Diarylethene Species. *Chem. Eur. J.*, 1:275–284, 1995.
- [360] Albrecht Mannschreck. Photoisomerisierung und Sehvorgang. *Chemie in unserer Zeit*, 2:149–153, 1968.
- [361] Michinori Takeshita and Masahiro Irie. Photoresponsive Cesium Ion Tweezers with a Photochromic Dithienylethene. *Tetrahedron Letters*, 39:613–616, 1998.
- [362] Michinori Takeshita and Masahiro Irie. Photoresponsive Tweezers for Alkali Metal Ions. Photochromic Diarylethenes Having Two Crown Ether Moieties. *J. Org. Chem.*, 63:6643–6649, 1998.

- [363] Stephen H. Kawai. Photochromic Bis(monoaza-crown ether)s. Alkali-metal Cation Complexing Properties of Novel Diarylethenes. *Tetrahedron Letters*, 39:4445–4448, 1998.
- [364] Michinori Takeshita, Kingo Uchida, and Masahiro Irie. Novel saccharide tweezers with a diarylethene photoswitch. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, pages 1807–1808, 1996.
- [365] Chagit Denekamp and Ben L. Feringa. Optically Active Diarylethenes for Multimode Photoswitching Between Liquid-Crystalline Phases. *Advanced Materials*, 10:1080–1082, 1998.
- [366] Kenji Matsuda and Masahiro Irie. A Diarylethene with Two Nitronyl Nitroxides: Photoswitching of Intramolecular Magnetic Interaction. *J. Am. Chem. Soc.*, 122:7195–7201, 2000.
- [367] U. Koert, R. Krauss, H.-G. Weinig, Heumann. C, C. Ziemer, C. Mügge, M. Seydack, and J. Bendig. 2,3,6,7-Tetrasubstituted Decalins: Biconformational Transducers for Molecular Signal Transduction. *Eur. J. Org. Chem.*, pages 575–586, 2001.
- [368] H.-G. Weinig, R. Krauss, M. Seydack, J. Bendig, and U. Koert. Molecular Signal Transduction by Conformational Transmission: Use of Tetrasubstituted Perhydroanthracenes as Transducers. *Chem. Eur. J.*, 7:2075–2088, 2001.
- [369] J. Berninger, R. Krauss, H.-G. Weinig, U. Koert, B. Ziemer, and K. Harms. 2,3,6,7-Tetrasubstituted Perhydroanthracenes: Stereoselective Synthesis and Biconformational Studies. *Eur. J. Org. Chem.*, pages 875–884, 1999.
- [370] M. Vogler, U. Koert, D. Dorsch, J. Gleitz, and P. Raddatz. Synthesis of Dianhydroxitole-based Benzamidines as Factor Xa Inhibitors using Cross Couplings, Phenyl Ether and Amidine Formations as Key Steps. *Synlett*, pages 1683–1687, 2003.
- [371] Frederick R. Jensen, C. Hackett Bushweller, and Barbara H. Beck. Conformational Preferences in Monosubstituted Cyclohexanes Determined by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 91:344–351, 1969.
- [372] F. A. L. Anet and A. J. R Bourn. Nuclear Magnetic Resonance Line-Shape and Double-Resonance Studies of Ring Inversion in Cyclohexane-d₁₁. *J. Am. Chem. Soc.*, 89:760–768, 1967.
- [373] Don K. Dalling, David M. Grant, and LeRoy F. Johnson. Conformational Inversion Rates in the Dimethylcyclohexanes and in Some cis-Decalins. *J. Am. Chem. Soc.*, 93:3678–3682, 1971.
- [374] Steven V. Ley and Patrick Michel. A New Route to Butane-1,2-diacetals and the Development of Alternative Substitution Patterns to Facilitate Differential Protection of the Products. *Synlett*, pages 1793–1795, 2001.
- [375] Aksel A. Bothner-By, Richard L. Stephens, and Ju-mee Lee. Structure Determination of a Tetrasaccharide: Transient Nuclear Overhauser Effects in the Rotating Frame. *J. Am. Chem. Soc.*, 106:811–813, 1984.

- [376] Ad Bax and Donald G. Davis. MLEV-17-Based Two-Dimensional Homonuclear Magnetization Transfer Spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, 65:355–360, 1985.
- [377] Ad Bax and Donald G. Davis. Practical Aspects of Two-Dimensional Transverse NOE Spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, 63:207–213, 1985.
- [378] Harold Booth. Applications of ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy to the conformational analysis of cyclic compounds. *Progress in NMR Spectroscopy*, 5:149–381, 1969.
- [379] Philippe Sauer, Markus Müller, and Jie Kang. Quantitation of DNA. *QiagenNews*, pages 23–26, 1998.
- [380] Gary Kallansrud and Brian Ward. A Comparison of Measured and Calculated Single- and Double-Stranded Oligodeoxynucleotide Extinction Coefficients. *Analytical Biochemistry*, 236:134–138, 1996.
- [381] Michael J. Cavaluzzi and Philip N. Borer. Revised UV extinction coefficients for nucleoside-5'-monophosphates and unpaired DNA and RNA. *Nucleic Acids Research*, 32:e13, 2004.
- [382] William W. Wilfinger, M. Mackey, and P. Chomczynski. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques*, 22:474–479, 1997.
- [383] Gerard J. Kleywegt. Dictionaries for Heteros. *CCP4/ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography*, 31:45–50, 1995.
- [384] Gerard J. Kleywegt. Making the most of your search model. *CCP4/ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography*, 32:32–36, 1996.
- [385] Gerard J. Kleywegt and T. A. Jones. Model-building and refinement practice. *Methods in Enzymology*, 277:208–230, 1997.
- [386] G. J. Kleywegt, K. Henrik, E. J. Dodson, and D. M. F. van Aalten. Pound-wise but penny-foolish: How well do micromolecules fare in macromolecular refinement ? *Structure*, 11:1051–1059, 2003.

Veröffentlichungen

- [2] H. Weber, B. A. Vick, E. Farmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10473–10478.
- [3] a) EPC = enantiomerically pure compounds. Übersicht: T. K. Sarkar, B. K. Ghorai, *J. Indian. Chem. Soc.* **1999**, *76*, 693–706; b) G. Helmchen, A. Goeke, G. Lauer, M. Urmann, J. Fries, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1079–1080; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 1024–1025; c) K. Weinges, U. Lernhardt, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 751–754; d) F.-P. Montforts, I. Gesing-Zibulak, W. Grammenos, M. Schneider, K. Laumen, *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 1852–1859; e) T. Kitahara, T. Nishi, K. Mori, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 6999–7006; f) J. S. U. H. S. Park, S. Gupta, J. K. Cha, *Synth. Commun.* **1997**, *27*, 2931–2941; g) H. Stadtmüller, A. Vaupel, C. E. Tucker, T. Stüdemann, P. Knochel, *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 1204–1220; h) G. J. Roth, S. Kirschbaum, H. J. Bestmann, *Synlett* **1997**, 618–620; i) T. K. Sarkar, B. Mukherjee, S. K. Gosh, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3243–3254; j) C. Fehr, J. Galindo, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 581–585; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 569–573.
- [4] L. Crombie, K. M. Mistry, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 1981–1991, zit. Lit..
- [5] a) P. A. Grieco, N. Abood, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 6008–6010.
- [6] a) C. B. Chapleo, M. A. Finch, T. V. Lee, S. M. Roberts, R. F. Newton, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 676–677; b) C. B. Chapleo, M. A. W. Finch, S. M. Roberts, G. T. Wooley, R. F. Newton, D. W. Selby, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1980**, 1847–1852.
- [7] P. Sennhenn, B. Gabler, G. Helmchen, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8595–8598.
- [8] S. Kudis, G. Helmchen, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3210–3212; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3047–3050.
- [9] a) R. F. Newton, D. P. Reynolds, J. Davies, P. B. Kay, S. M. Roberts, T. W. Wallace, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1983**, 683–685; b) C. B. Chapleo, M. A. Finch, T. V. Lee, S. M. Roberts, R. Newton, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1980**, 2084–2087.
- [10] C. Marschner, J. Baumgartner, H. Griengl, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5224–5235.
- [11] a) S. K. Johansen, H. T. Korno, I. Lundt, *Synthesis* **1999**, 171–177; b) S. K. Johansen, I. Lundt, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1999**, 3615–3622.
- [12] P. Knochel, R. Singer, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2117–2188.
- [13] P. Knochel, T.-S. Chou, C. Jubert, D. Rajgopal, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 588–599.
- [14] E. W. Weiler, T. Albrecht, B. Groth, Z.-Q. Xia, M. Luxem, H. Liss, L. Andert, P. Spengler, *Phytochemistry* **1993**, *32*, 591–600.
- [15] Anmerkung in der Druckfahne (13. September 2002): Eine weitere Synthese von enantiomerenreinem 12-ODPA wurde kürzlich veröffentlicht: Y. Kobayashi, M. Matsumi, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4361–4364.

Kationenkontrolle bei der Funktionsprogrammierung von Helices: Strukturen eines D,L-Peptid-Ionenkanals**

Hans-Dieter Arndt, Dirk Bockelmann, Andrea Knoll, Stefanie Lamberth, Christian Griesinger* und Ulrich Koert*

Moleküle, die sich kontrolliert in helicale Strukturen falten, eignen sich hervorragend zur Erzeugung von Funktionseinheiten. Helices dienen dazu, Information zu speichern und zu prozessieren (DNS-Doppelhelix),^[1] bilden die Grundlage für steife Materialien (Tripelhelix des Kollagens),^[2] vermitteln Transportprozesse (β -Helix der D,L-Peptide)^[3] und können dazu verwandt werden, photo-, elektro- oder transportaktive Gruppen dreidimensional anzuordnen.^[4] Die Entwicklung synthetischer Verbindungen mit einem vorhersagbaren Faltungsverhalten („programmiertes Falten“) wird aktuell erforscht,^[5] wobei sich der überwiegende Teil der Arbeiten auf die Beschreibung der Strukturen beschränkt.

Unser Interesse an der funktionalen Faltung von künstlichen Ionenkanälen^[6] führte uns dazu, D,L-Peptide als Strukturtemplate für Ether- δ -peptide einzusetzen, um so Ionenkanäle mit neuartigen Funktionen zu generieren.^[7] Ausgangspunkt dafür war der Ionenkanal, der vom D,L-Peptid Gramicidin A (gA) gebildet wird (Abbildung 1a).^[3] gA selbst kann eine Vielzahl von Konformationen einnehmen, deren Besetzung vom umgebenden Medium bestimmt wird. In organischen Lösungsmitteln bildet gA bevorzugt dimere Doppelhelices, die sich in ihrer Händigkeit und Topologie unterscheiden.^[8] Wenn diese Doppelhelices Kationen binden, erweitert sich der Durchmesser der Helix.^[9] Nur in membranartiger Umgebung bildet gA aus zwei rechtsgängigen, einzelsträngig vorliegenden β -Helices ein einzigartiges, Kopf-an-Kopf-assoziiertes Dimer.^[10] Diese Konformation mit 6.3 Aminosäuren pro Windung gilt allgemein als die ionenkanalaktive Spezies.^[11a-c] Da es aber bislang nicht

[*] Prof. Dr. C. Griesinger, Dipl.-Chem. D. Bockelmann, Dr. S. Lamberth
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)
Fax: (+49) 551-201-2201
E-mail: cig@nmr.mpibpc.mpg.de

Prof. Dr. U. Koert
Philipps-Universität Marburg
Fachbereich Chemie
Hans-Meerwein-Straße, 35032 Marburg (Deutschland)
Fax: (+49) 6421-282-5677
E-mail: koert@chemie.uni-marburg.de
Dr. H.-D. Arndt, Dr. A. Knoll
Humboldt-Universität zu Berlin
Institut für Chemie
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Volkswagen-Stiftung, der Max-Planck-Gesellschaft, der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie sowie der Pinguin-Stiftung unterstützt. Wir danken Dr. Clemens Mügge für NMR-spektroskopische Unterstützung sowie Dipl.-Chem. Jochen Pfeifer und MSc Lo'ay Al-Momani für CD-spektroskopische Messungen.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

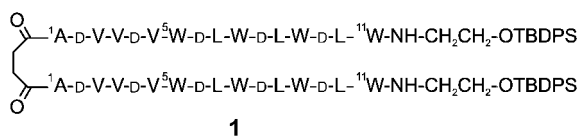
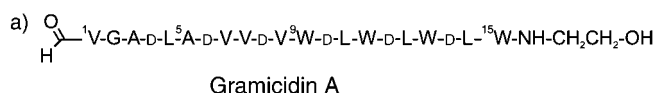


Abbildung 1. a) Primärsequenz von gA und **1**. b) Repräsentative Stromspur von **1** in planaren Lipiddoppelschichten (1M CsCl, 120 mV, Sojalecithin). Für Einzelheiten siehe Hintergrundinformationen.

gelungen ist, diese $\beta^{6,3}$ -Helix in isotroper Lösung oder durch Einkristallstrukturanalyse zu untersuchen, wurde ihre Bedeutung auch kontrovers diskutiert.^[11d]

Wir konnten zeigen, dass das synthetische 22mer „Mini-gramicidin“ **1** (Abbildung 1a) in Phospholipiddoppelschichten als Ionenkanal aktiv ist (Abbildung 1b), wobei die Aktivität stark von der Membrandicke abhängt.^[12a] Voruntersuchungen ergaben außerdem, dass **1** einen eingeschränkteren Konformationsraum aufweist als gA.^[12b] Mit dem Ziel, die Aktivkonformation von **1** besser zu verstehen, unternahmen wir Strukturuntersuchungen in An- und Abwesenheit von Cs^+ -Ionen.

Die Verbindung **1** setzt sich aus den terminalen 11mer-Peptiden von gA zusammen, die durch ein Succinatmolekül kovalent Kopf-an-Kopf-verknüpft sind. Diese Verknüpfung verhindert das Auftreten des lateralen Dissoziationsgleichgewichts,^[12b] das bei gA Strukturuntersuchungen erschwert.^[13,14] Die terminalen *tert*-Butyldiphenylsilyl(TBDPS)-Gruppen in **1** erhöhen die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, was die Strukturuntersuchungen erleichtert. Einzelkanalstrommessungen an planaren Lipiddoppelschichten zeigten, dass **1** hochaktive Cs^+ -Kanäle bildet ($[\mathbf{1}] = 10^{-14}$ M in der wässrigen Badlösung, siehe Hintergrundinformationen). Es wurde nur eine Art von Ionenkanälen beobachtet, was darauf hinweist, dass eine einzige Aktivkonformation in der Membran vorliegt (Abbildung 1b).

Die Struktur von **1** in Abwesenheit von Metallionen wurde in $[\text{D}_6]\text{Benzol}/[\text{D}_6]\text{Aceton}$ 10:1 und in $\text{CDCl}_3/[\text{D}_3]\text{MeOH}$ 1:1 durch NMR-Spektroskopie bestimmt. Beide Lösungsmittelgemische imitieren die Polarität einer Zellmembranumgebung,^[15] und in beiden Medien lag das Peptid in derselben, hochsymmetrischen Struktur **A** vor: Ein Peptid-Dimer bildet eine linksgängige β -Doppelhelix der Ganghöhe 5.7 mit einer Länge von etwa 38 Å (Abbildung 2), wobei das Succinatmolekül eine antiperiplanare Konformation aufweist. Eine entsprechende Sekundärstruktur nimmt gA nur in Gegenwart von CaCl_2 ein.^[8g]

Bei Zugabe von Cs^+ -Salzen wandelt sich die gesamte Struktur in eine neue Spezies um. Nach Sättigung mit CsI liegt das Peptid **1** in $\text{CDCl}_3/[\text{D}_3]\text{MeOH}$ 1:1 oder 3:1 als Monomer in der Konformation **B** vor (Abbildung 3). Hierbei bildet sich eine rechtsgängige β -Helix mit ca. 6.3 Aminosäuren pro

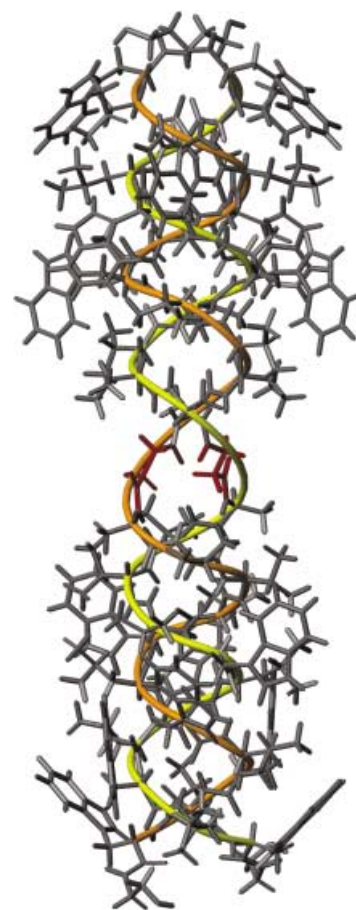


Abbildung 2. Gemittelte Struktur **A** (PDB-Referenzcode 1 KQE; berechnet aus den 16 energetisch günstigsten Strukturen) von **1** in $[\text{D}_6]\text{Benzol}/[\text{D}_6]\text{Aceton}$ 10:1. Die TBDPS-Endgruppen konnten wegen Signalüberlagerungen nicht berücksichtigt werden. Das verbindende Succinatmolekül ist rot dargestellt. Alle NMR-Spektren wurden bei 600 MHz aufgenommen (Bruker AMX). Die Zuordnung erfolgte mit Felix 2000 (Accelrys, San Diego, CA) durch die kombinierte Auswertung von DQF-COSY-, NOESY- und TOCSY-Experimenten nach dem üblichen Verfahren.^[16] H-H-Abstände wurden den NOESY-Spektren bei einer Mischzeit von 150 und 300 ms entnommen. Insgesamt wurden 688 NOE-Kreuzsignale ausgewertet (330 Aminosäurerest-interne, 138 sequenzielle und 220 von mittlerer Reichweite). Für jede Aminosäure konnten $^3J(\text{H}^N, \text{H}^\alpha)$ Kopplungskonstanten bestimmt werden, die alle im für β -Faltblätter typischen Bereich lagen. Die H-H-Abstände und $\text{H}^N, \text{H}^\alpha$ -Kopplungskonstanten dienen als Parameter für eine Strukturrechnung durch „simulated annealing“^[17] mit dem Programm X-PLOR.^[18] Die mittlere Standardabweichung der Rückgratatomkoordinaten in den so erhaltenen 16 Strukturen mit minimaler Energie betrug 0.61 Å.

Windung und einer Länge von etwa 17 Å. Das Succinatmolekül verknüpft die beiden Einfachhelices symmetrisch (C_2 -Achse) und antiklinal (gemittelte Struktur).

Die Struktur **B** besitzt alle Merkmale der wahrscheinlichen Aktivkonformation von gA – im Gegensatz zur Cs^+ -freien β -Doppelhelix **A**. Der Porendurchmesser steigt von 1.2 Å im Dimer **A** auf 4.5 Å in der monomeren $\beta^{6,3}$ -Helix **B**, weit genug, um Cs^+ -Ionen aufzunehmen. Die Struktur **B** enthält einen durchgehenden Kanal, welcher dem Kopf-an-Kopf-Dimer von gA in membranähnlicher Umgebung gleicht.^[11] In der Struktur **B** fügen sich die Amidcarbonylgruppen des Succinatmoleküls in das Gesamtmuster der Carbonylfunktionen des Peptids ein. Sie vervollständigen somit die Koor-

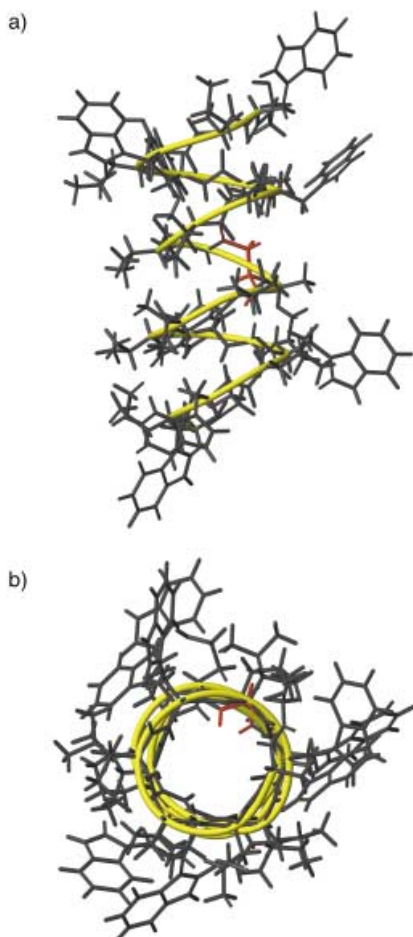


Abbildung 3. Gemittelte Struktur **B** von **1** in $\text{CDCl}_3/[\text{D}_3]\text{MeOH}$ 3:1 gesättigt mit CsI. a) Seitenansicht, b) Aufsicht. Die Struktur wurde wie für **A** beschrieben (Abbildung 2) bestimmt. In diesem Fall wurden 213 NOE-Kreuzsignale ausgewertet (97 Aminosäurerest-interne, 51 sequenzielle und 65 von mittlerer Reichweite). Die mittlere Standardabweichung der Rückgratatomkoordinaten der zehn Strukturen mit minimaler Energie lag bei 0.91 Å.

dinationsumgebung der Cs^+ -Ionen, die vermutlich symmetrische Positionen besetzen.^[19]

Die Konformationsumwandlung von **A** nach **B** ließ sich durch NMR-Titration mit CsI in $\text{CDCl}_3/[\text{D}_3]\text{MeOH}$ 1:1 verfolgen (Abbildung 4 a, siehe Hintergrundinformationen). Verschiedene Modellrechnungen (1–2 Ionen, kein Aggregat oder das Peptid als Dimer, Trimer oder Tetramer) nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ergaben, dass nur das in Abbildung 4 b gezeigte Szenario die Daten sinnvoll wiedergibt: Das Dimer **A** dissoziiert in zwei Monomere **C** (K_D). Ein Monomer **C** bindet nacheinander zwei Cs^+ -Ionen (K_1 , K_2). Es gelang wegen der starken Kopplung von K_D und K_1 nicht, einen verlässlichen Wert für K_D aus den Daten zu erhalten. Mit einem Näherungswert von $K_D = 0.00126 \text{ M}^{-0.5}$ (98% Dimer bei $[\text{Cs}^+] = 0$) erhielten wir für die Bindungskonstanten Werte von $K_1 = (63 \pm 5) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ und $K_2 = 36 \pm 20 \text{ M}^{-1}$ (siehe Hintergrundinformationen). Das erste Cs^+ -Ion bindet wesentlich fester als das zweite ($\Delta G_1 = -28 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta G_2 = -9 \text{ kJ mol}^{-1}$). Dies zeigt an, dass für die Konformationsumwandlung vor der Bindung des ersten Cs^+ -Ions weniger Energie aufgebracht werden muss als für die Überwindung

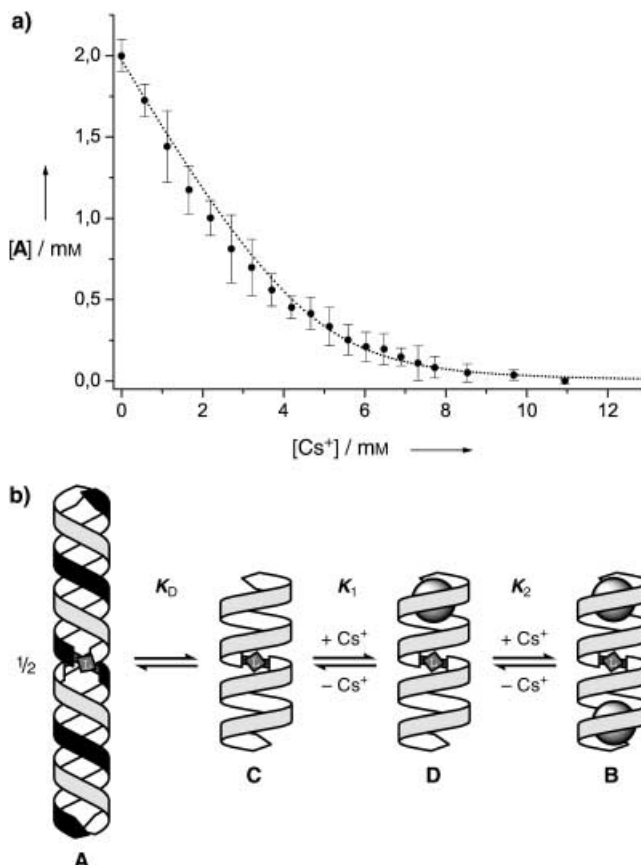


Abbildung 4. a) NMR-Titration von **1** mit CsI in $\text{CDCl}_3/[\text{D}_3]\text{MeOH}$ 1:1, die angepasste Funktion ist gepunktet dargestellt; b) schematische Darstellung der Konformationsgleichgewichte für die Umwandlung von **A** nach **B** über das angenommene Monomer **C** und den 1:1-Komplex **D** bei Cs^+ -Zugabe.

der Coulomb-Abstoßung, die bei der Bindung des zweiten Ions auftritt.

Um diese Befunde mit denen für gA vergleichen zu können,^[8f,12b] wurden die Sekundärstrukturen von **1** durch Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie charakterisiert (Abbildung 5). In organischen Lösungsmitteln wie CH_3CN oder $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ werden zwei *negative* Cotton-Effekte bei $\lambda = 228$ und 208 nm beobachtet (Abbildung 5 a, Spektren c und d),^[12b] was mit der linksgängigen, parallelen β -Doppelhelix **A** im Einklang steht.^[12b,20] Für den Cs^+ -Komplex **B** wird dagegen in $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ oder MeOH ein *positiver* Cotton-Effekt bei $\lambda = 230 \text{ nm}$ beobachtet (Abbildung 5 a; Spektren a und b), was die Rechtsgängigkeit der β -Helix anzeigt. Allerdings unterscheiden sich die CD-Spektren von **B** deutlich vom Spektrum von **1** in DMPC-Vesikeln,^[20] welches wiederum mit dem von gA in diesem Lipidmedium nahezu übereinstimmt (Abbildung 5 b) und üblicherweise der rechtsgängigen $\beta^{6.3}$ -Helix zugeordnet wird.^[8f] Letzteren Helix Typ haben wir jedoch zweifelsfrei für den Komplex **B** in organischen Lösungsmitteln nachgewiesen. Wir können diese Unstimmigkeit zum jetzigen Zeitpunkt nicht erklären, vermuten jedoch, dass die voneinander abweichenden CD-Spektren ihre Ursache in lokal unterschiedlichen Konformationen haben, welche die globale Struktur nicht beeinflussen (Manuskript in Vorbereitung).

Um herauszufinden, ob die Konformationsumwandlungen von **1** mit dem Transportprozess in der Membran korrelieren,

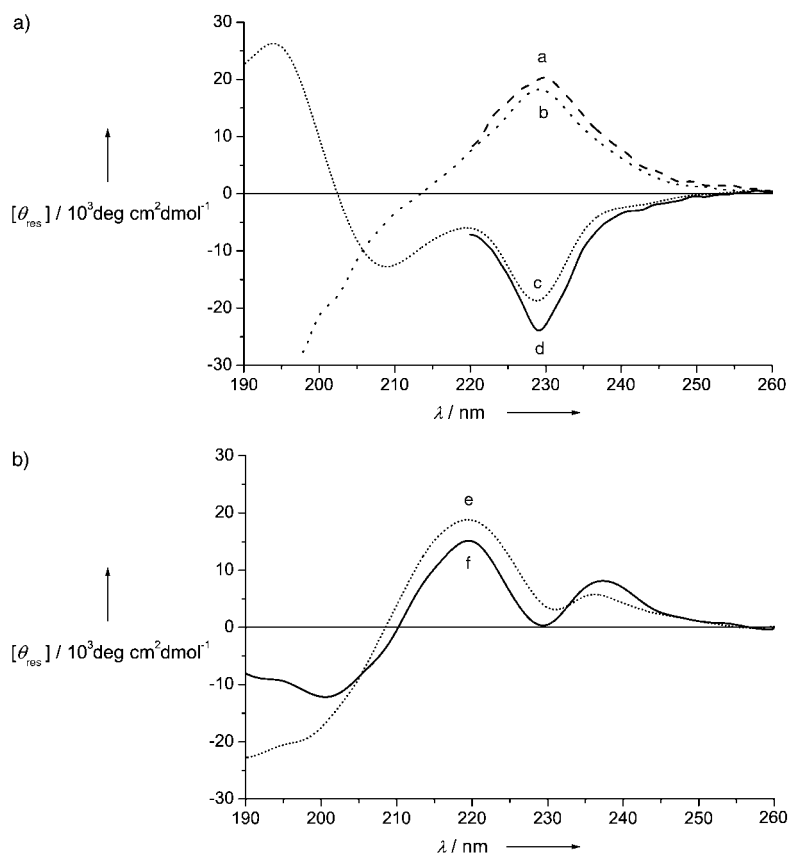


Abbildung 5. a) CD-Spektren von **1** in organischen Lösungsmitteln ($T=22^\circ\text{C}$, $[\mathbf{1}]=10^{-5}\text{M}$). Spektrum a: $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:1, gesättigt mit CsCl (---); Spektrum b: 50 mM CsCl in MeOH (- - -); Spektrum c: CH_3CN (••••); Spektrum d: $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:1 (—); b) CD-Spektren von 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin-(DMPC)-Vesikeln^[20] ($T=22^\circ\text{C}$, $[\text{gA}]$ oder $[\mathbf{1}]=10^{-5}\text{M}$). Spektrum e: gA (••••); Spektrum f: **1** (—). Die Form der Spektren a und d war bei $[\mathbf{1}]=10^{-3}\text{M}$ unverändert (nicht gezeigt). $[\theta_{\text{res}}]$ =Mittlere molare Elliptizität pro Amidcarbonylgruppe.

untersuchten wir die Ionenkanalleitfähigkeit Λ in Abhängigkeit von der Cs^+ -Konzentration in der Badlösung (Abbildung 6 a).^[21] Die so gewonnenen Daten zeigen drei Besonderheiten: 1) Selbst bei sehr niedrigen Cs^+ -Konzentrationen konnte Einzelkanalleitfähigkeit nachgewiesen werden. 2) Im mittleren Konzentrationsbereich (10–100 mM) wächst die Leitfähigkeit Λ supralinear an. 3) Bei ca. 1.5M durchläuft Λ ein Maximum. Diese Merkmale weisen auf einen Transportvorgang mit mehreren Bindungsstellen hin.^[21b] Ein Kinetikmodell mit zwei symmetrischen Bindungsstellen und vier Zuständen^[22] gab die Daten sehr gut wieder (Abbildung 6 b). Die scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten ergeben sich ($\pm 30\%$) daraus zu $A=5.2 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $B=4.9 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, $K=5.1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$, $D=4.4 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $E=5.4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$. Offensichtlich wird also ein doppelt besetzter Zustand von **1** während des Transportprozesses populiert, gerade bei höheren Cs^+ -Konzentrationen.

Wir konnten hiermit zeigen, dass das Minigramicidin **1** in unpolaren Medien ein stabförmiges, doppelhelicales Aggregat **A** bildet, dessen Deaggregation in die kanalaktive Konformation entweder durch den Einbau in eine Membranumgebung oder durch das Binden von Cs^+ -Ionen ausgelöst wird. Letzteres gestattete es uns, die rechtsgängige β -Helix der *D,L*-Peptide zum ersten Mal in Lösung zu charakterisieren. Die Struktur **B** sollte der Aktivkonformation (im von zwei Cs^+ -Ionen besetzten Zustand) des Ionenkanals **1** in der Membran sehr ähnlich sein.

Eingegangen am 9. Januar 2002,
veränderte Fassung am 29. Juli 2002 [Z18500]

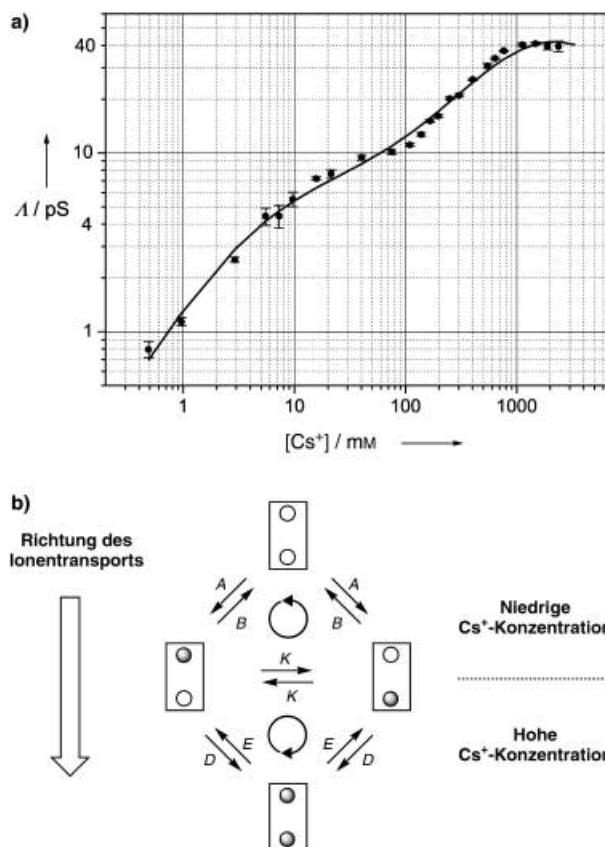


Abbildung 6. a) Konzentrationsabhängigkeit der Cs^+ -Einzelkanalleitfähigkeit von **1** bei $T=22^\circ\text{C}$ in Sojalecithin ($n > 50$). b) Kinetisches Modell mit zwei symmetrischen Bindungsstellen und vier Zuständen, das die Konzentrationsabhängigkeit der Leitfähigkeit wiedergibt.^[22]

- [1] *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, 2. Aufl. (Hrsg.: G. M. Blackburn, M. J. Gait), Oxford University Press, Oxford, **1996**.
- [2] D. R. Eyre, *Science* **1980**, *207*, 1315–1322.
- [3] *Gramicidin And Related Ion Channel-Forming Peptides* (Hrsg.: D. J. Chadwick, G. Cardew), Wiley, Chichester, **1999b**) (Novartis Foundation Symposium 225); R. E. Koeppe II, O. S. Andersen, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, *25*, 231–258; c) P. Läuger, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 939–959; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 905–925.
- [4] a) T. Katz, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1997–1999; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1921–1923; b) J.-C. Meillon, N. Voyer, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1004–1006; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 967–969; c) U. Koert, M. M. Harding, J.-M. Lehn, *Nature* **1990**, *346*, 339–342.
- [5] a) D. Seebach, J. L. Matthews, *Chem. Commun.* **1997**, 2015–2022; b) S. H. Gellman, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173–180; c) V. Berl, I. Huc, R. G. Khoury, M. J. Krische, J.-M. Lehn, *Nature* **2000**, *407*, 720–723; bersichtsartikel: d) A. E. Rowan, R. J. M. Nolte, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 65; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 63; e) R. P. Cheng, S. H. Gellman, W. F. DeGrado, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219–3232; f) D. Seebach, M. Albert, P. I. Arvidsson, M. Rueping, J. V. Schreiber, *Chimia* **2001**, *55*, 345–353.
- [6] Übersichtsartikel: a) Y. Kobuke in *Advances in Supramolecular Chemistry, Vol. 4* (Hrsg.: G. W. Gokel), JAI, Greenwich, **1997**, S. 163–210; b) N. Voyer, *Top. Curr. Chem.* **1996**, *184*, 1–37; c) G. W. Gokel, O. Murillo, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 425–432; neuere Beiträge: d) B. Baumeister, N. Sakai, S. Matile, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2031–2034; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1955–1958; e) N. Yoshino, A. Satake, Y. Kobuke, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 471–473; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 457–459, sowie Zitate in Lit. [7b].
- [7] a) H.-D. Arndt, A. Knoll, U. Koert, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2137–2140; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2076–2078; b) A. Schrey, A. Vescovi, A. Knoll, C. Rickert, U. Koert, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 928–931; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 900–902.
- [8] a) W. R. Veatch, E. T. Fossel, E. R. Blout, *Biochemistry* **1974**, *13*, 5249–5257; b) V. F. Bystrov, A. S. Arseniev, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 925–949; c) D. A. Langs, *Science* **1988**, *241*, 182–187; d) Z. Zhang, S. M. Pascal, T. A. Cross, *Biochemistry* **1992**, *31*, 8822–8828; e) S. M. Pascal, T. A. Cross, *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 1101–1109; f) S. M. Pascal, T. A. Cross, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 495–513; g) Y. Chen, A. Tucker, B. A. Wallace, *J. Mol. Biol.* **1996**, *264*, 757–769; h) D. A. Doyle, B. A. Wallace, *J. Mol. Biol.* **1997**, *266*, 963–977.
- [9] a) A. S. Arseniev, I. L. Barsukov, V. F. Bystrov, *FEBS Lett.* **1985**, *180*, 33–39; b) A. N. Nekrasov, A. V. Stepanov, V. P. Timofeev, *FEBS Lett.* **1995**, *371*, 35–38; c) V. F. Bystrov, A. S. Arseniev, I. L. Barsukov, A. L. Lomize, *Bull. Magn. Reson.* **1987**, *8*, 84–94.
- [10] a) A. S. Arseniev, I. L. Barsukov, V. F. Bystrov, A. L. Lomize, Y. A. Ovchinnikov, *FEBS Lett.* **1985**, *186*, 168–174; b) R. R. Ketchum, W. Hu, T. A. Cross, *Science* **1993**, *261*, 1457–1460; c) F. Tian, T. A. Cross, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 1993–2003; d) R. Fu, M. Cotton, T. A. Cross, *J. Biomol. NMR* **2000**, *16*, 261–268.
- [11] a) F. Kovacs, J. Quine, T. A. Cross, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 7910–7915; b) O. S. Andersen, H.-J. Apell, E. Bamberg, D. D. Busath, R. E. Koeppe II, F. J. Sigworth, G. Szabo, D. W. Urry, A. Woolley, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 609; c) T. A. Cross, A. S. Arseniev, B. A. Cornell, J. H. Davis, J. A. Kilian, R. E. Koeppe II, L. K. Nicholson, F. Separovic, B. A. Wallace, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 610–611; d) B. M. Burkhart, W. L. Duax, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 611–612.
- [12] a) H.-D. Arndt, A. Knoll, U. Koert, *ChemBioChem* **2001**, 221–223; b) H.-D. Arndt, A. Vescovi, A. Schrey, J. R. Pfeifer, U. Koert, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 2789–2801.
- [13] a) M. C. Goodall, *Arch. Biochem. Biophys.* **1973**, *157*, 514; b) D. W. Urry, C. M. Venkatachalam, A. Spisni, R. J. Bradley, T. L. Trapane, K. U. Prasad, *J. Membr. Biol.* **1980**, *55*, 29–51; c) C. J. Stankovic, S. H. Heinemann, J. M. Delfino, F. J. Sigworth, S. L. Schreiber, *Science* **1989**, *244*, 813–817; d) D. Lelievre, Y. Trudelle, F. Heitz, G. Spach, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1989**, *33*, 379–385; e) C. J. Stankovic, S. H. Heinemann, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3702–3704; f) S. Crouzy, T. B. Woolf, B. Roux, *Biophys. J.* **1994**, *67*, 1370–1386.
- [14] I. L. Barsukov, A. L. Lomize, A. S. Arseniev, V. F. Bystrov, *Biol. Membr. (USSR)* **1987**, *4*, 171–193.
- [15] R. Gratias, H. Kessler, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 2027–2031.
- [16] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1986**.
- [17] M. Nilges, S. I. O'Donoghue, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1998**, *32*, 107–139.
- [18] A. T. Brünger, *X-PLOR: A System for X-ray Crystallography and NMR*, Yale University Press, New Haven, **1992**.
- [19] Die symmetrische Struktur **B** weist auf eine gerade Zahl gebundener Cs⁺-Ionen hin. Die NMR-Titration von **1** mit CsI zeigt zwei Cs⁺-Ionen an, wie auch das ESI-Massenspektrum, das vom [1+2Cs]²⁺-Ion dominiert wird. Wahrscheinlich sind die Cs⁺-Ionen im unteren bzw. oberen Drittel der Kanalpore gebunden. Da wir jedoch die genaue Position der Cs⁺-Ionen im Konformer **B** bislang nicht NMR-spektroskopisch eingrenzen konnten, wurden diese in der Strukturrechnung nicht berücksichtigt.
- [20] a) J. A. Killian, K. U. Prasad, D. Hains, D. W. Urry, *Biochemistry* **1988**, *27*, 4848–4855; b) D. V. Greathouse, J. F. Hinton, K. S. Kim, R. E. Koeppe II, *Biochemistry* **1994**, *33*, 4291–4299.
- [21] a) B. W. Urban, S. B. Hladky, D. A. Haydon, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **1978**, *37*, 2628–2632; b) B. Hille, *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2. Aufl., Sinauer, Sunderland, **1992**.
- [22] S. B. Hladky, D. A. Haydon in *Current Topics in Membranes and Transport, Vol. 21* (Hrsg.: F. Bronner), Academic Press, New York, **1984**, S. 327–372.

Nichtinvasive Transformation von Proteinen in optische pH-Sensoren durch Austausch von Tryptophan gegen Aminotryptophan**


Nediljko Budisa,* Marina Rubini, Jae H. Bae, Elisabeth Weyher, Waltraud Wenger, Ralph Golbik, Robert Huber und Luis Moroder

Unter den genkodierten natürlichen Aminosäuren kommt Tryptophan in Proteinen nur selten vor (ca. 1.2%),^[1] nimmt jedoch wegen der Beteiligung an vielfältigen spezifischen inter- und intramolekularen Wechselwirkungen eine besondere Stellung ein.^[2] Tryptophan ist hauptsächlich für die UV-Absorption und Fluoreszenz von Proteinen verantwortlich^[3] und wurde frühzeitig als nützliche intrinsische Sonde für Struktur- und Funktionsuntersuchungen von Proteinen sowie als attraktives Target für klassisches Protein-Engineering und -design erkannt. Die klassischen Protein-Engineering-Verfahren sind auf das Standardrepertoire der kanonischen Aminosäuren beschränkt. Diese Limitierung konnte aber in den letzten Jahren durch neuere Methoden überwunden werden, die eine Erweiterung des Aminosaurerepertoires

[*] Dr. N. Budisa, M. Rubini, J. H. Bae, E. Weyher, W. Wenger, Prof. Dr. R. Huber, Prof. Dr. L. Moroder
Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz 18A, 82152 Martinsried (Deutschland)
Fax: (+49)89-8578-3516
E-mail: budisa@biochem.mpg.de

Dr. R. Golbik
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
06120 Halle/Saale (Deutschland)

[**] Wir danken Monika Franke für die Hilfe bei der deutschen Übersetzung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Bikonformativer Bisdecalin-Schalter**Konformative Kupplung zweier
Konformationsschalter****

*Michael Karle, Dirk Bockelmann, Dirk Schumann,
Christian Griesinger* und Ulrich Koert**

Als molekulare Schalter bezeichnet man Moleküle, die auf einen externen Stimulus hin reversibel zwischen zwei oder mehreren Zuständen wechseln können (An, Aus).^[1] Man unterscheidet Photoschalter/chiroptische Schalter,^[2] Redox-

[*] Prof. Dr. U. Koert, Dipl.-Chem. M. Karle, Dipl.-Chem. D. Schumann
Fachbereich Chemie
Philipps-Universität Marburg
Hans-Meerwein-Straße, 35032 Marburg (Deutschland)
Fax: (+49) 6421-2825-677
E-mail: koert@chemie.uni-marburg.de

Prof. Dr. C. Griesinger, Dipl.-Chem. D. Bockelmann
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie
NMR-basierte Strukturbiologie
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)
Fax: (+49) 551-201-2201
E-mail: cigr@nmr.mpibpc.mpg.de

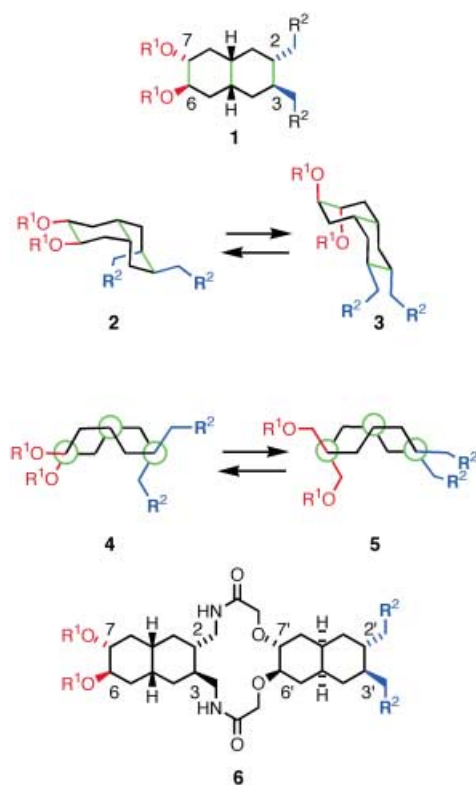
[**] Diese Arbeit wurde von der Volkswagen-Stiftung, der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Max-Planck-Gesellschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und der Pinguin-Stiftung unterstützt.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Schalter,^[3] schaltbare Rotaxane und Catenane^[4] sowie schaltbare allosterische Rezeptoren.^[5] Konformationsschalter weisen ein bikonformatives Grundgerüst auf. Bikonformative *cis*-Decaline^[6] und *cis,anti,cis*-Perhydroanthracene^[7] haben sich bereits als Schaltelemente zur molekularen Signaltransduktion durch konformative Transmission bewährt.^[8]

Ein 2,3,6,7-tetrasubstituiertes *cis*-Decalin vom Typ **1** kann die beiden Grundzustandskonformationen **2** und **3** einnehmen (Schema 1).^[6] Der doppelte Ringflip der beiden *all*-Sesselkonformere von **1** lässt sich auch mit einer Newman-Projektion entlang der grün gekennzeichneten C-C-Bindungen veranschaulichen (**4**→**5**).

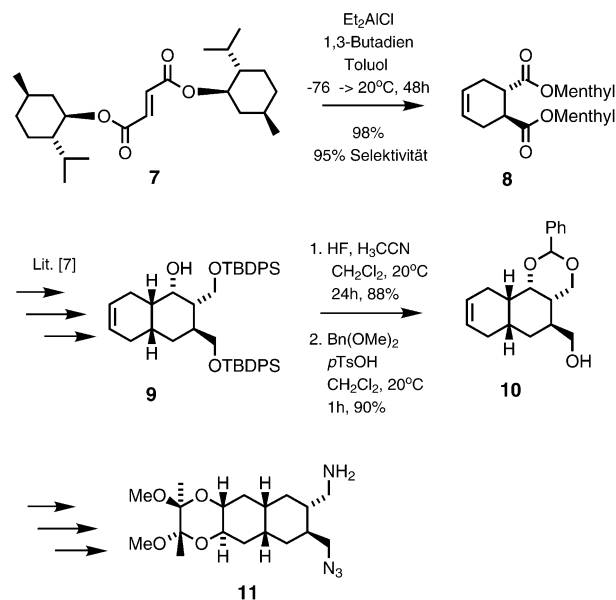


Schema 1. Tetrasubstituiertes *cis*-Decalin **1** mit Doppelringflip **2**→**3** (**4**→**5** in der Newman-Projektion). **6** ist der Prototyp eines gekoppelten Bisdecalin.

Um mit Konformationsschaltern größere Distanzen zu überbrücken (etwa zur Signaltransduktion) oder um sie zu molekularen Schaltkreisen zu verknüpfen, müssen zwei oder mehrere Konformationsschalter gekoppelt werden.^[9] Hier untersuchen wir, ob sich ein 14-gliedriges Makrobisactam vom Typ **6** zur konformativen Kupplung zweier *cis*-Decalin-Schalter eignet.^[10] Laut Kraftfeldrechnungen sollte der 14-gliedrige Ring in **6** zwei Niedrigenergiekonformationen einnehmen: eine mit einer *all*-äquatorialen Orientierung der vier Anknüpfungspunkte an die beiden Decalineinheiten (Positionen 2,3,6,7 in **6**) und eine mit einer *all*-axialen Orientierung. Hier berichten wir über die Synthese von **6** und geben eine Antwort auf die Frage, ob ein Doppelringflip in der „linken“ Decalineinheit über den 14-gliedrigen Bisactamring

hinweg einen Doppelringflip in der „rechten“ Decalineinheit auslösen kann.

Eine bereits beschriebene Synthese von **1** liefert das Produkt nur in racemischer Form.^[6a] Um aber zwei Decaline vorhersagbar und kontrolliert zu verknüpfen, musste ein enantioselektiver Syntheseweg zu tetrasubstituierten Decalinen vom Typ **1** entwickelt werden (Schema 2). Angewendet



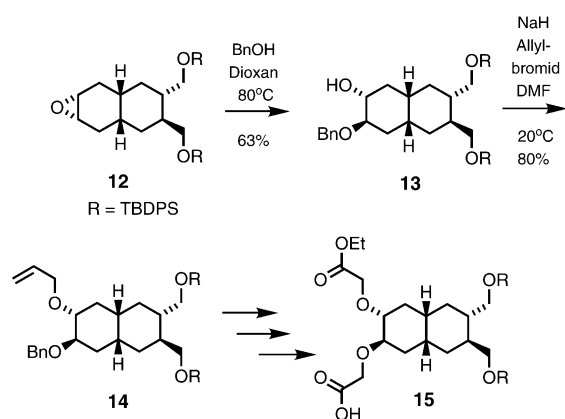
Schema 2. Enantioselektive Synthese des tetrasubstituierten Azidoaminomethyldecalin **11**. TBDPS = *tert*-Butyldiphenylsilyl.

wurde eine stereoselektive Diels-Alder-Reaktion^[11] von Dimethylfumarat (**7**) mit 1,3-Butadien zum Cyclohexen **8**. Nach Abspaltung der chiralen Auxiliare wurde in wenigen Stufen der Alkohol **9** erreicht. Details der Synthese und experimentelle Daten zu wichtigen Syntheseprodukten befinden sich in den Hintergrundinformationen. Nach Abspaltung der beiden Silylether in **9** können die beiden resultierenden primären Hydroxygruppen durch Bildung des Benzylidenacetals **10** differenziert werden. Aus **10** wurde analog zur racemischen Route das Azidoaminomethyldecalin **11** erhalten, der vollständig funktionalisierte linke Decalinbaustein für **6** (siehe Hintergrundinformationen).

Ein Schlüsselschritt bei der Synthese des rechten Decalinbausteins war die regioselektive Öffnung des Epoxids **12** mit Benzylalkohol zum *trans*-diaxialen β -Benzylalkohol **13**, der über die Zwischenstufe **14** in die Monocarbonsäure **15** überführt werden konnte (Schema 3 und Hintergrundinformationen).

Die Synthese des 14-gliedrigen Bisactams **17** begann mit der HBTU-vermittelten Kupplung von **11** und **15** zum Amid **16** (Schema 4). Nach Hydrolyse des Ethylesters und anschließender Azidreduktion konnte die resultierende Aminocarbonsäure zu dem Bisactam **17** cyclisiert werden.

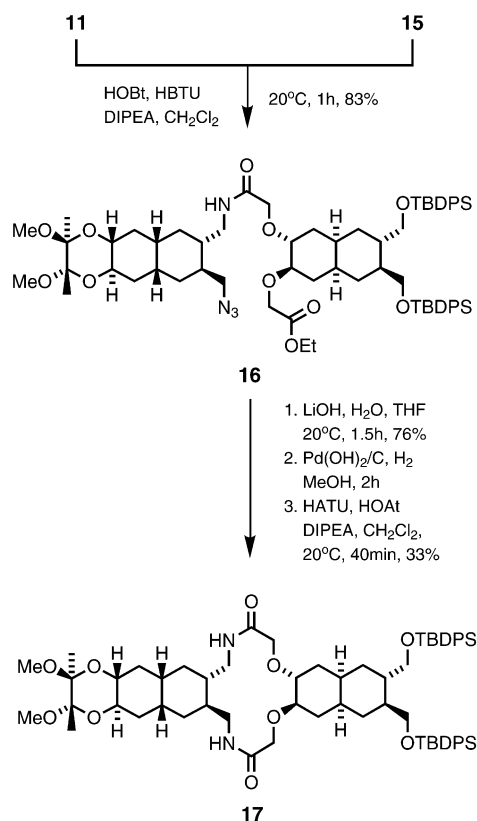
Die Bisacetalgruppe in **17** fixiert die O-Substituenten an C6 und C7 in äquatorialen Positionen. Die Struktur des Gesamtmoleküls, die sich durch diese kovalente Klammerung der linken Decalineinheit ergibt, und insbesondere die axial/



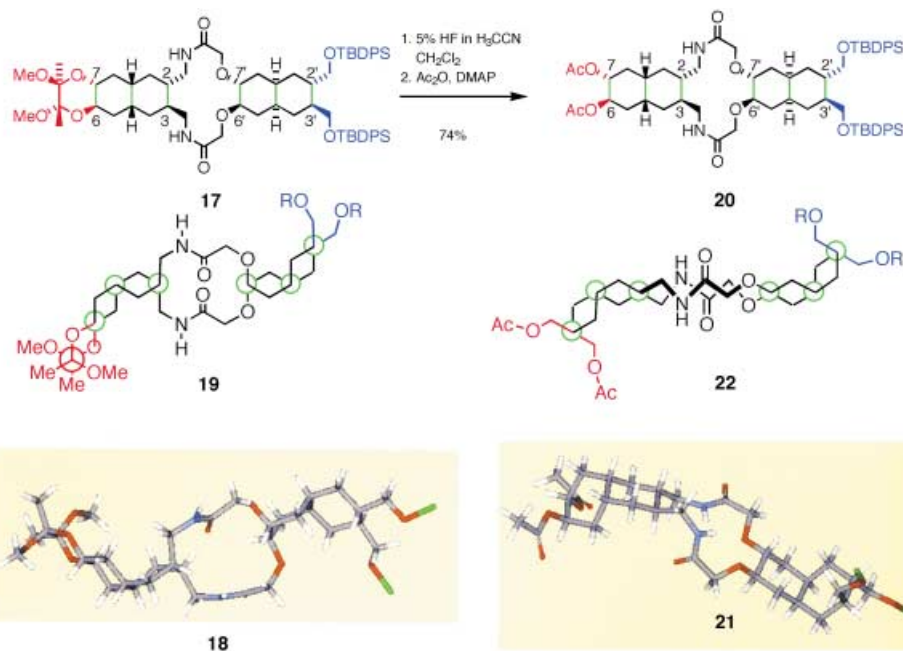
Scheme 3. Synthese des enantiomerenreinen Decalins **15**.

äquatorial-Anordnungen der vier Substituenten jeder Decalineinheit, konnte durch DQF-COSY- und ROESY-Experimente in CDCl_3 zweifelsfrei bestimmt werden. Die Strukturparameter (ROE-Kontakte und Torsionswinkel, siehe Hintergrundinformationen) wurden als Grundlage für Molecular-Modeling-Rechnungen verwendet (InsightII/Discover, CVFF). Es wurden zehn strukturell verwandte Niedrigenergieformen (z.B. **18** in Schema 5) mit Doppelsesselkonformation der Decalineinheiten identifiziert. Strukturelle Unterschiede ergaben sich in der lokalen Konformation des 14-gliedrigen Bislactamrings.

In der linken Decalineinheit führt die äquatoriale Verankerung der C6- und C7-Substituenten zu einer axialen Positionierung der C2- und C3-Substituenten. Dies wiederum bewirkt eine axiale Orientierung der C6'- und C7'-Substituenten in der rechten Decalineinheit, was schließlich zur



Scheme 4. Verknüpfung der beiden Decalinbausteine zum Amid **16** und Ringschluss zum Bislactam **17**. HOBt = 1-Hydroxybenzotriazol, HBTU = 2-(1-*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, DIPEA = Diisopropylethylamin, HATU = 2-(1-Hydroxy-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, HOAt = 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol.



Scheme 5. Das Lösen der Bisacetatklammer (**17**→**20**) führt zu einem Doppelringflip in der linken Decalineinheit, der durch konformative Kuppelung über das 14-gliedrige Bislactam einen Doppelringflip in der rechten Decalineinheit induziert (**18**→**21** oder **19**→**22**). **19** und **22** sind Newman-Projektionen entlang der grün markierten C-C-Bindungen in **17** bzw. **20**.

äquatorialen Orientierung der C2'- und C3'-Substituenten am äußeren rechten Molekülende führt.

Die kovalente Bisacetalklammer wurde durch Einwirkung von HF gespalten, wobei die TBDPS-Gruppen bemerkenswerterweise nicht beeinträchtigt wurden.^[12] Das resultierende Diol wurde als Diacetat **20** geschützt, um die NMR-Analysen zu erleichtern. Wiederum ergaben die auf Grundlage der NMR-Daten (ROE-Kontakte und Torsionswinkel, siehe Hintergrundinformationen) durchgeführten Kraftfeldrechnungen von **20** mehrere energiearme Konformationen mit einer eindeutigen, einheitlichen Struktur (z.B. **21** in Schema 5) der beiden Decalindoppelsessel und Variationen im 14-gliedrigen Ring. In der linken Decalineinheit sind die beiden O-Substituenten an C6 und C7 nun in axiale Positionen gewechselt.^[13] Daraus resultiert ein Doppelringflip der Decalineinheit und eine äquatoriale Anordnung der Substituenten an C2 und C3. Dieser Konformationswechsel wird über den 14-gliedrigen Bisactamring an die rechte Decalineinheit weitergegeben und führt dort ebenfalls zu einem Doppelringflip. Die Substituenten an C6' und C7' nehmen nun äquatoriale Positionen ein, und die vormals äquatorialen Substituenten an C2' und C3' wechseln in axiale Positionen.

Dies ist das erste Beispiel für die konformative Kupplung zweier Decalinschalter durch einen 14-gliedrigen Bisactamring. Die Schaltdistanz vom linken (C6, C7) zum rechten Molekülende (C2', C3') beträgt ca. 15 Å. Die Methode sollte die Reihenschaltung von mehr als zwei bikonformativen Decalinen ermöglichen. Eine Funktionskette von drei Decalinen, die über zwei Bisactamringe gekuppelt sind, könnte hinreichend lang sein, um den lipophilen Bereich einer Phospholipid-Doppelschicht zu überbrücken und so die Signaltransduktion durch Membranen zu ermöglichen.

Zusammenfassend wurde die Kupplung zweier bikonformativer Decalineinheiten über einen 14-gliedrigen Bisactamring beschrieben. Damit ist der Weg frei für Anwendungen von gekuppelten Konformationsschaltern, z.B. in der Signaltransduktion, zum Schalten von Ionenkanälen oder in molekularen Schaltkreisen.^[14]

Eingegangen am 12. Juni 2003 [Z52130]

Stichwörter: Bisactame · Decalin · Konformationsanalyse · Molekulare Schalter · NMR-Spektroskopie

- [1] a) *Molecular Switches* (Hrsg.: B. L. Feringa), Wiley-VCH, Weinheim, **2001**; b) A. P. de Silva, H. Q. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515–1566; c) J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry*, VCH, Weinheim, **1995**.
- [2] Ausgezeichnete Übersichten: a) *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1683–1890 (Themenheft Photochromism: Memories and Switches); b) B. L. Feringa, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 504–513.
- [3] a) L. Zelikovich, J. Libman, A. Shanzer, *Nature* **1995**, *374*, 790–792; b) D. Kalny, M. Elhabiri, T. Moav, A. Vaskevich, I. Rubinstein, A. Shanzer, A.-M. Albrecht-Gary, *Chem. Commun.* **2002**, 1426–1427; c) H. Plenio, C. Aberle, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 4438–4446.

- [4] a) R. A. Bissel, E. Córdova, A. E. Kaifer, J. F. Stoddart, *Nature* **1994**, *369*, 133–137; b) P. R. Ashton, V. Balzani, J. Becher, A. Credi, M. C. T. Fyfe, G. Matteredsteig, S. Menzer, M. B. Nielsen, F. M. Raymo, J. F. Stoddart, M. Venturi, D. J. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3951–3957; c) M. Bauer, F. Vögtle, *Chem. Ber.* **1992**, *125*, 1675–1686.
- [5] a) S. Shinkai in *Molecular Switches* (Hrsg.: B. Feringa), Wiley-VCH, Weinheim, **2001**, S. 281; b) S. Shinkai, M. Ikeda, A. Sugasaki, M. Takeuchi, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 494–503.
- [6] a) U. Koert, R. Krauss, H.-G. Weinig, C. Heumann, B. Ziemer, C. Mügge, M. Seydack, J. Bendig, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 575–586; Studien mit substituierten Cyclohexanen: b) M. Raban, D. L. Burch, E. R. Hortelano, D. Durocher, D. Kost, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1283–1287; c) V. V. Samoshin, O. A. Zelenkina, I. V. Yartseva, N. S. Zefirov, *Zh. Org. Khim.* **1987**, *23*, 2244–2245; d) V. V. Samoshin, V. A. Chertkov, L. P. Vaatlina, E. K. Dobretsova, N. A. Simonov, L. P. Katorsky, D. E. Gremyachinsky, H.-J. Schneider, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3981–3984; e) G. W. Buchanan, K. Bourque, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 3963–3966.
- [7] a) H.-G. Weinig, R. Krauss, M. Seydack, J. Bendig, U. Koert, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 2075–2088; b) R. Krauss, H.-G. Weinig, M. Seydack, J. Bendig, U. Koert, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1905–1908; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1835–1837; c) J. Berninger, R. Krauss, H.-G. Weinig, U. Koert, B. Ziemer, K. Harms, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 875–884.
- [8] a) R. Krauss, U. Koert, *Synlett* **2003**, 598–608; Beispiele für andere Konformationsschalter: b) H. Yuasa, H. Hashimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5089–5090; c) S. E. O'Connor, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2296; d) H. J. Schneider, F. Werner, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 490–491; e) V. A. Palyulin, S. V. Emets, V. A. Chertkov, C. Kasper, H.-J. Schneider, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 3479–3482; f) J. N. H. Reek, H. Engelkamp, A. E. Rowan, J. A. A. W. Elemans, R. J. M. Nolte, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 716–722.
- [9] Nichtkonformative Kupplung: F. M. Raymo, S. Giordani, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3475–3478.
- [10] Das Konzept der makrocyclischen Konformationskontrolle wurde mit Erfolg in der Naturstoffsynthese eingesetzt: a) „Selectivity—A Goal for Synthetic Efficiency“: W. C. Still in *Workshop Conferences Hoechst, Vol. 14* (Hrsg.: W. Bartmann, B. M. Trost), Verlag Chemie, Weinheim, **1983**; b) G. Quinkert, N. Heim, J. Glenneberg, U.-M. Billhardt, V. Autze, J. W. Bats, G. Dürner, *Angew. Chem.* **1987**, *99*, 363–365; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 362–364.
- [11] K. Furuta, K. Iwanaga, H. Yamamoto, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4507–4510. Die Bestimmung der Stereoselektivität und die stereochemische Zuordnung des Reaktionsprodukts erfolgte nach der reduktiven Entfernung der Mentylester. Details befinden sich in den Hintergrundinformationen.
- [12] a) S. V. Ley, H. W. M. Priepe, S. L. Warriner, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2410–2412; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *106*, 2290–2292; b) J.-L. Montchamp, F. Tian, M. E. Hart, J. W. Frost, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3897–3899.
- [13] Der Wechsel der C6,C7-Substituenten in die axiale Position lässt sich auch aus den Kopplungsmustern im DQF-COSY-Spektrum entnehmen: H6 und H7 zeigen nun eine für bisäquatoriale Protonen charakteristische kleine Kopplungskonstante.
- [14] Übersicht: a) V. Balzani, M. Gomez-Lopez, J.-F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 405–414; ausgewählte Beispiele: b) T. R. Kelly, H. De Silva, R. A. Silva, *Nature* **1999**, *401*, 150–152; c) N. Koumura, R. W. J. Zijlstra, R. A. van Delde, N. Harada, B. L. Feringa, *Nature* **1999**, *401*, 152–154; d) A. P. de Silva, N. D. McClenaghan, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3965–3966.

Meine akademischen Lehrer in Konstanz waren:

Prof. Dr. H.-H. Brintzinger, Prof. Dr. E. Daltrozzo, Prof. Dr. J. Felsche, Prof. Dr. H. Fischer, Prof. Dr. A. Geyer, Prof. Dr. J. C. Jochims, Prof. Dr. F. Metz, Prof. Dr. G. Müller, Prof. Dr. W. Pfeiderer, Prof. Dr. M. Przybylski, Prof. Dr. R. R. Schmidt, Prof. Dr. U. Steiner, Prof. Dr. W. Weyrich

Meine akademischen Lehrer in Frankfurt waren:

Prof. Dr. E. Egert, Prof. Dr. J. W. Engels, Prof. Dr. S. Glaser, Prof. Dr. C. Griesinger, Prof. Dr. M. Nilges, Prof. Dr. D. Rehm, Prof. Dr. Rüterjans, Prof. Dr. H. Schwalbe

Lebenslauf

Persönliche Daten: Dirk Bockelmann
geb. 06.08.1970, Hoya/Weser
ledig
Eltern: Ingrid und Manfred Bockelmann

Schulbildung

1977-1983 Grundschole und Orientierungsstufe in Bruchhausen-Vilsen
1983-05/1990 Gymnasium Syke, Abschluß: Abitur

Zivildienst

08/1990-09/1991 Zivildienst im Behindertenkindergarten der Lebenshilfe
Braunschweig

Studium

10/1991-09/1998 Studium der Chemie an der Universität Konstanz
Abschluß: Diplom, Gesamtnote: gut(2,1)
Thema der Diplomarbeit: Rigide hydrophile Peptidisostere -
Synthese und Strukturaufklärung

10/1998-2/2006 Anfertigen der vorliegenden Dissertation im
Arbeitskreis von Prof. Dr. C. Griesinger

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, daß ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, daß aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt, den 08. Mai 2006

(Dirk Bockelmann)