

4. Ergebnisse

4.1 Entwicklung einer Selektionsstrategie

Die Knüpfung von N-glycosidischen Bindungen zählt zu den wichtigsten Reaktionen in der Biochemie. Sie ist essentiell für den Aufbau von RNA und DNA. Aus dem präbiotischen Blickwinkel ist es von großem Interesse, ob RNA in der Lage ist, die Synthese ihrer eigenen Bausteine zu katalysieren.

Mit der in unserem Labor entwickelten Strategie der direkten Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden sollte es möglich sein, RNA-Moleküle zu finden, die diesen Typ von Reaktionen katalysieren können.

Notwendig ist hierbei die Entwicklung einer speziellen Selektionsstrategie, die es ermöglicht, zwischen aktiven und inaktiven RNA-Species zu unterscheiden.

4.1.1 Konstruktion der RNA-Bibliothek

Ausgangspunkt einer jeden Selektion ist die kombinatorische RNA-Bibliothek. Dafür wurde in unserer Arbeitsgruppe ein entsprechender DNA-Pool konstruiert und synthetisiert. Er enthält eine komplett randomisierte Region von 120 Nucleotiden, die durch zwei konstante Bereiche für die Hybridisierung mit Primer A und Primer B flankiert ist. Diese Primer sind notwendig für die Amplifizierung durch die Polymerasekettenreaktion, wobei die DNA-Matrize durch den Primer A zusätzlich um die für die Erkennung durch die T7-RNA-Polymerase notwendige Promotorsequenz verlängert wurde. Der DNA-Pool wurde durch chemische Festphasensynthese hergestellt. Dabei wurde für die randomisierten Positionen ein Gemisch aller vier DNA-Phosphoramidite in einem Verhältnis von dA : dC : dG : dT = 3 : 3 : 2 : 2 eingesetzt. Mit dieser nicht-äquimolaren Zusammensetzung wurde der unterschiedlichen Reaktivität der einzelnen Phosphoramidite Rechnung getragen und so der Einbau der einzelnen Nucleotide nach dem Zufallsprinzip ermöglicht.

Die Komplexität des doppelsträngigen DNA-Pools bestand aus $4,8 \times 10^{14}$ verschiedenen Sequenzen. Durch präparative T7-Transkription dieses DNA-Pools wird die RNA-Bibliothek hergestellt.

4.1.2 Allgemeines Selektionsschema und Konstruktion des Linkers

Ein wichtiger Schritt bei der Selektion von Katalysatoren bimolekularer Reaktionen ist die Ankopplung von einem der Reaktanden an jedes der individuellen Moleküle der kombinatorischen RNA-Bibliothek. Wir wählten die heterocyclischen Basen Orotsäure (Uracil-6-carbonsäure) sowie Nicotinsäure als Vertreter der Pyrimidin- und Pyridinbasen als potentielle Reaktanden.

Das allgemeine Selektionsschema (Abb. 7) geht von einer randomisierten RNA-Bibliothek aus, die mit dem nucleobasenderivatisierten Linker ligiert wird. Diese RNA-Linker-Konjugat-Bibliothek wird mit dem aktivierten Zuckerphosphat PRPP inkubiert, das eine Ankergruppe aufweisen muß. Wenn die Reaktion stattfindet, wird diese Ankergruppe auch auf die erfolgreichen Katalysatoren übertragen, die über geeignete Festphasen selektiert werden können. Über eine geeignete Spaltstelle kann diese immobilisierte RNA wieder selektiv freigesetzt werden und steht nach reverser Transkription und PCR-Amplifizierung wieder als Ausgangspool für die nächste Selektionsrunde zur Verfügung.

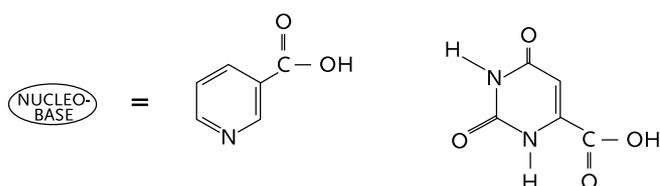
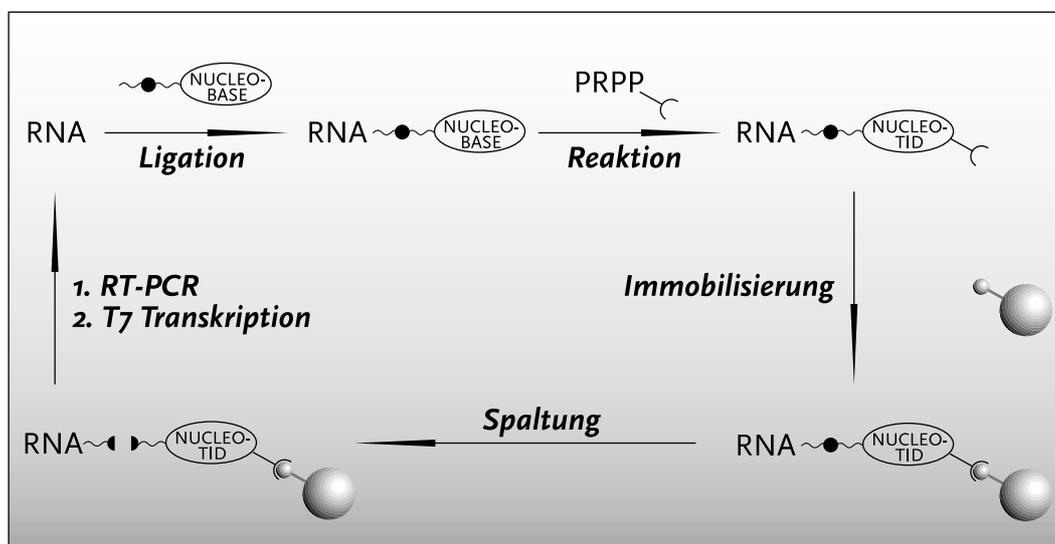


Abb. 7: Allgemeines Selektionsschema zur N-glycosidischen Bindungsknüpfung

Für die Synthese von RNA-Konjugat-Bibliotheken wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Dinucleotidanalogen entwickelt, welches eine versatile Derivatisierung mit verschiedensten Reaktanden ermöglicht.

Dieser Linker (Abb. 8) besteht aus:

- einem 5'-phosphoryliertem Dinucleotid pCpC, das für die Erkennung durch T₄-RNA-Ligase wichtig ist,
- 5 Hexaethylglycol-Spacern für die flexible Anordnung von Reaktand und RNA,
- einer o-Nitrobenzyleinheit als photochemisch ansteuerbare Spaltstelle und
- einer primären aliphatischen Aminogruppe, die zugänglich ist für Derivatisierungen durch aktivierte Carbonsäuren.

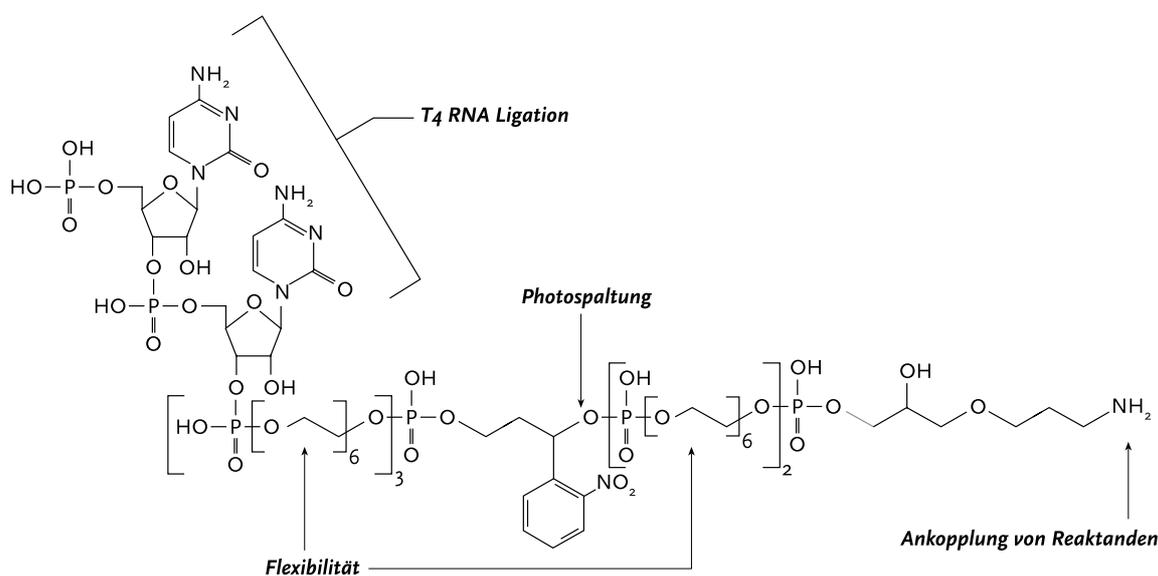


Abb. 8: Aufbau des Linkers zur Einführung potentieller Reaktanden in RNA

4.1.3 Linkerderivatisierung

Der Linker enthält eine primäre Aminogruppe, die sich für die Derivatisierung mit organischen Molekülen eignet. Das wohl schonendste Verfahren dazu beruht auf dem Einsatz aktivierter Ester, da selektiv die primäre Aminofunktion acyliert und keine Nebenreaktionen an den exocyclischen Aminogruppen der Cytidine stattfinden sollten. Neben p-Nitrophenylestern bieten sich die N-Hydroxysuccinimidester zur schonenden Derivatisierung an. Orotsäure- sowie Nicotinsäure-NHS-ester wurden zur Linkerderivatisierung eingesetzt (Abb.9). Ein 4ofacher Überschuß der aktivierten Komponente war ausreichend, um fast quantitative Umsetzungen mit dem Linker zu erzielen.

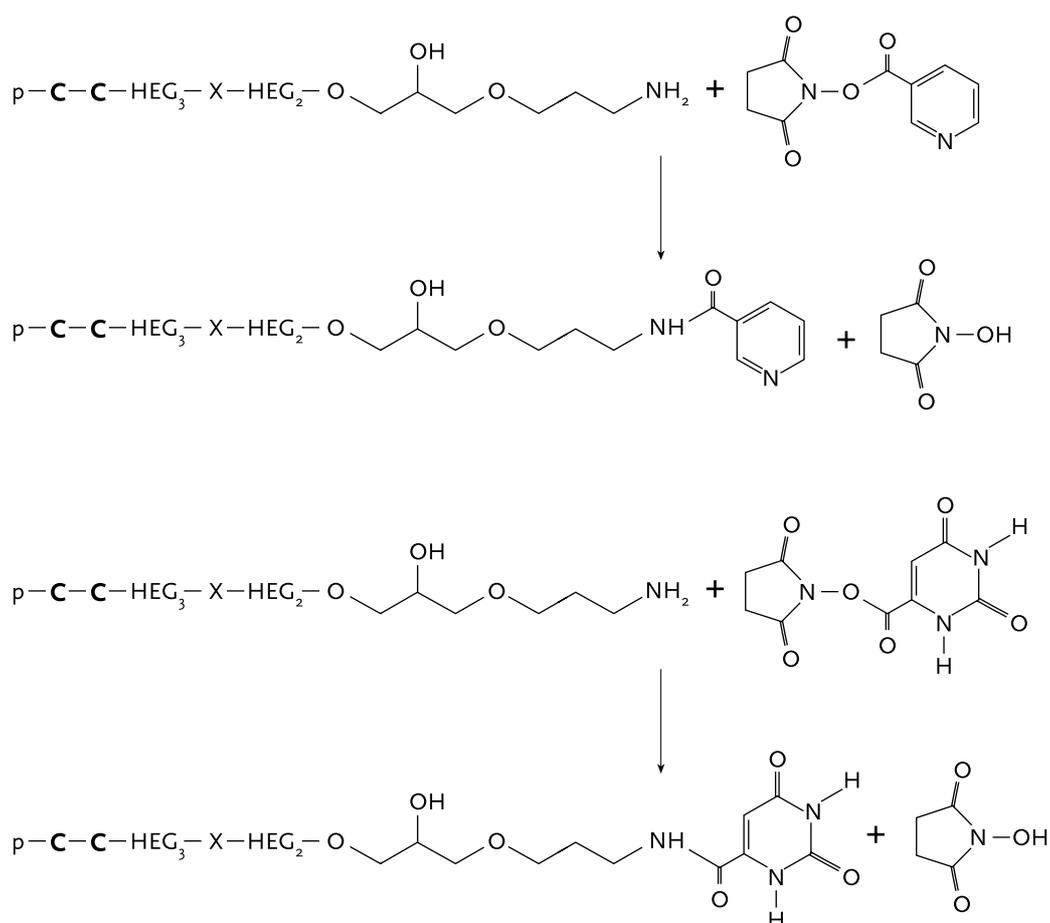


Abb. 9: Derivatisierung des Linkers mit den NHS-Estern der Nicotin- bzw. Orotsäure

Nach Reinigung über RP-HPLC (Abb. 10) betragen die Ausbeuten an gereinigtem Orotsäurelinker 33 % bzw. 60 % bei dem Nicotinsäurelinker. Die geringe Ausbeute bei dem Orotsäurelinker ist darauf zurückzuführen, daß bei der Hydrolyse des Orotsäure-NHS-esters die entstehende Orotsäure ausfällt und Teile des Linkers copräzipitiert wurden. Wegen des geringen Unterschiedes der Retentionszeiten des Orotsäurelinkers gegenüber dem unmodifizierten Linker waren auch die Verluste bei der HPLC-Fraktionierung hoch.

Die derivatisierten Linker wurden über MALDI-TOF-Massenspektrometrie charakterisiert.

Die gefundenen Molmassen des Orotsäurelinkers bzw. des Nicotinsäurelinkers mit 2959.0 bzw. 2925.0 stimmen mit den berechneten Werten für $[M-H]^-$ 2957.9 bzw. 2924.9 überein. Die ebenfalls gefundenen Photospaltprodukte deuten darauf hin, daß nur die terminale Aminogruppe des jeweiligen Linkers funktionalisiert wurden.

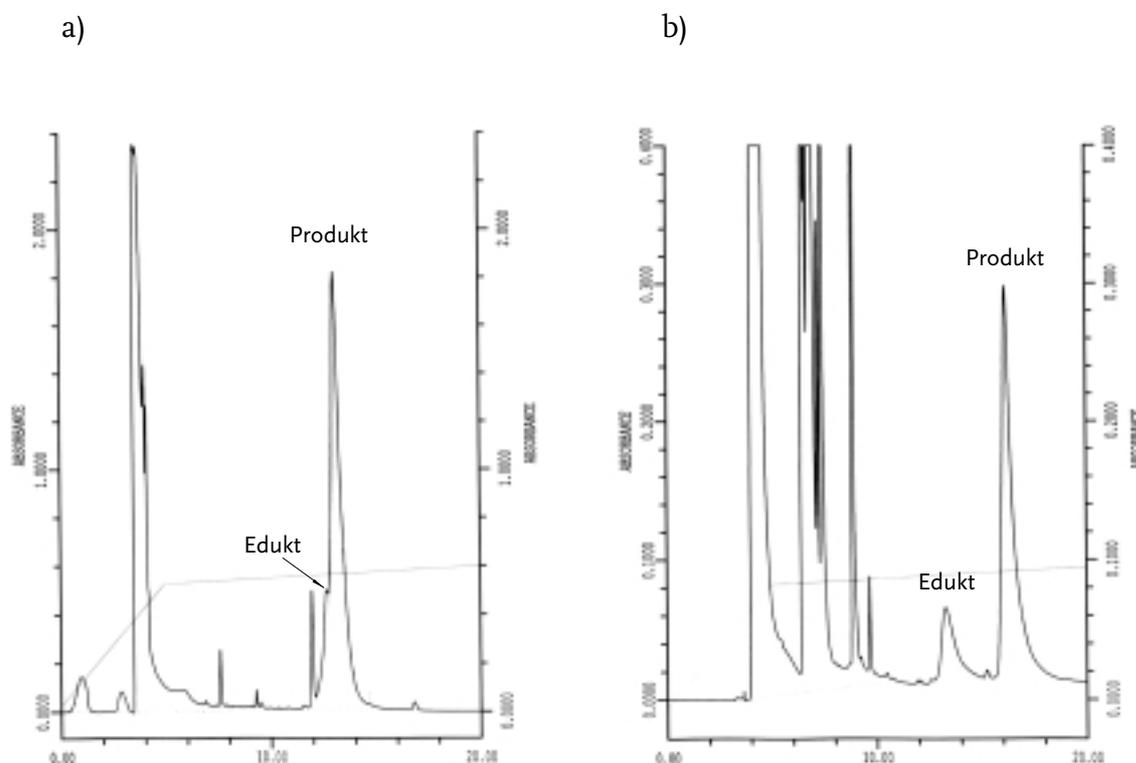


Abb. 10: Chromatographische Reinigung der Linkerkonjugate über RP-HPLC a) Umsetzung des Dinucleotidanalogs (Abb.8) mit Orotsäure-NHS-Ester bzw. b) mit Nicotinsäure-NHS-Ester

4.1.4 Ligation

Zur Untersuchung der enzymatischen Anknüpfung der derivatisierten Linker wurde die Ligation mittels T₄-RNA-Ligase getestet. Pool-RNA-Moleküle wurden mit verschiedenen Äquivalenten an Orotsäurelinker inkubiert. Ein 4-facher Überschuß an Linker über eingesetzter RNA ergab 60-70% Ligationsprodukt bei einer Übernachtinkubation. Die Ligationsansätze enthielten jeweils 10% DMSO.

Die Einführung der Linker konnte also effizient über Ligation mittels T₄-RNA-Ligase erfolgen. Hinsichtlich der Ligationserausbeuten unterschieden sich die Ligationen mit dem Orotsäurelinker und dem Nicotinsäurelinker nicht. Eine 6%ige PAGE war ausreichend, um die Ligationsprodukte von unmodifizierten RNA-Pool-Molekülen abzutrennen (Abb. 11).

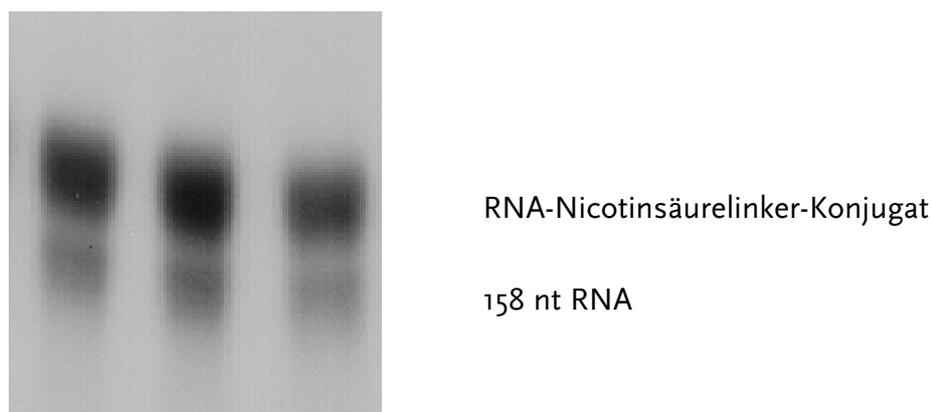


Abb. 11: Autoradiographie eines Ligationsgels (6% denaturierende PAGE)

Desweiteren konnte so gezeigt werden, daß die verschiedenen Linker durch T₄-RNA-Ligase erkannt und effizient an Pool-RNA-Moleküle ligiert wurden.

4.1.5 Evaluierung geeigneter Ankergruppen

Mit den nun erhaltenen Linkern – und damit ternären RNA-Konjugaten – wurde die Wahl einer selektierbaren Funktion notwendig.

Zuerst wurde die Einführung einer Thiolfunktion als Ankergruppe in das 5-Phosphat des PRPP erwogen. Über die Synthese von 1-Phosphothioanaloga von PRPP wurde bereits berichtet [Smithers, 1984a, b]. Auch die Synthese von 5-Thio-PRPP war in einer einzigen Arbeit in der Literatur beschrieben [Murray, 1969]. Beide Arbeiten nutzten die durch die PRPP-Synthetase vermittelte Einführung der 1-Pyrophosphatgruppe unter Verwendung von ATP, bzw. dessen Thio-Analoga. Ausgehend von D-Ribose wurde das geschützte Derivat 1-O-Methyl-2,3-isopropyliden- β -D-ribofuranosid hergestellt und in Analogie zur Phosphorylierung [Gross, 1983] mit Thiophosphorylchlorid umgesetzt (Abb. 12). Nach Entschützung und Ionenaustauschchromatographie konnte Ribose-5-thiophosphat erhalten werden. Die Umsetzung des Ribose-5-thio-phosphates mit ATP und PRPP-Synthetase wurde in Analogie zur PRPP-Synthese nach der Variation von Kornberg durchgeführt [Flaks, 1959], um das 5-Thio-PRPP zu erhalten.

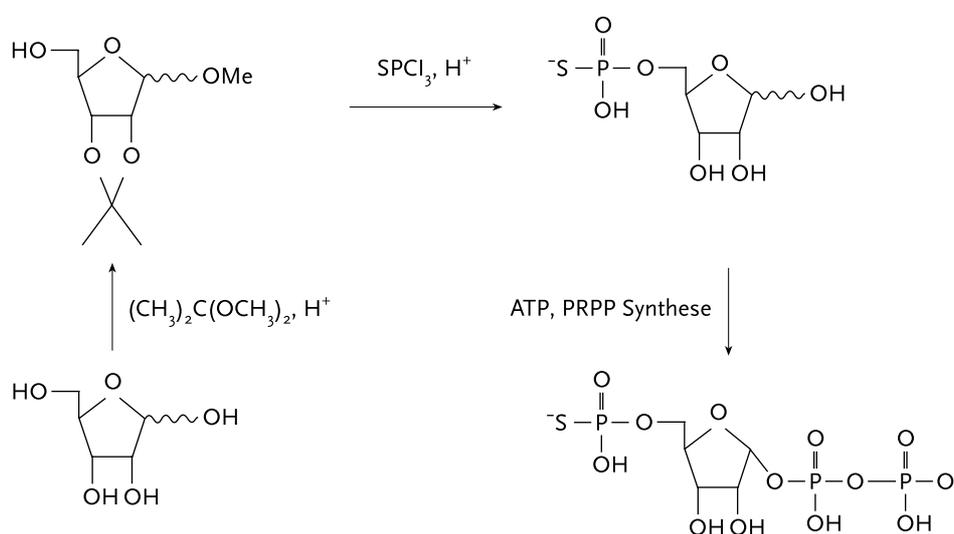


Abb. 12: Schema zur Synthese von 5-Thio-PRPP

Eine Analyse des Reaktionsgemisches über ^{31}P -NMR-Spektroskopie (Abb. 13) zeigte Signale bei -5.0 (d) und -10.8 (d) ppm, die für die Pyrophosphatgruppen des PRPP charakteristisch sind [Jaffe, 1978]. Allerdings ist der Peak bei 4.0 ppm auf Ribose-5-phosphat zurückzuführen. Es deutete darauf hin, daß die Thiofunktion des Ribose-5-thiophosphats (44.5 ppm) im Laufe der Reaktion hydrolysierte und entstandenes Ribose-5-phosphat zu PRPP umgewandelt wurde.

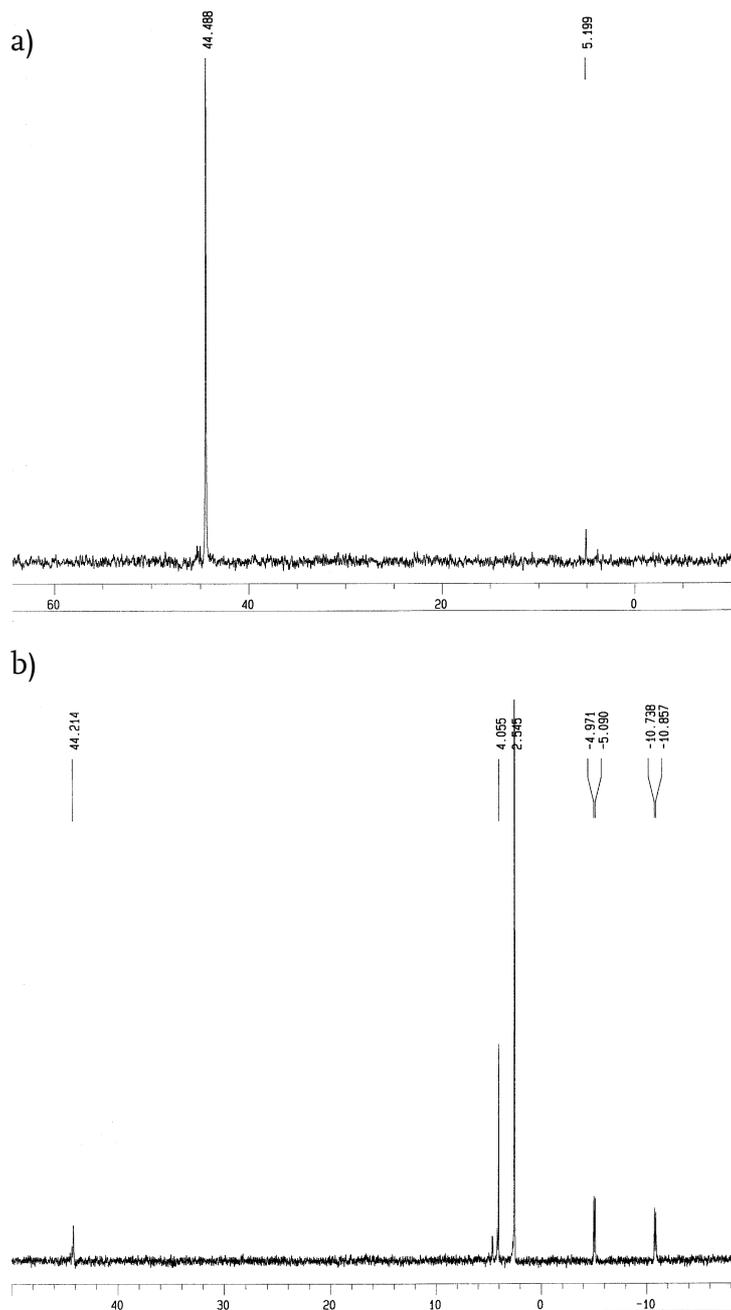


Abb. 13: ^{31}P -NMR-Spektren von Ribose-5-thiophosphat (a) und des Ansatzes zur Synthese von 5-Thio-PRPP (b)

Die Geschwindigkeitskonstante für die Einführung der Pyrophosphatgruppe in Ribose-5-thiophosphat mittels PRPP-Synthetase liegt mindestens 2 Größenordnungen unter der für das Ribose-5-phosphat beobachteten [Murray, 1969], so daß die Hydrolyse des Ribose-5-thiophosphats vermutlich schneller vonstatten ging, als die Synthese von 5-Thio-PRPP.

Da sich also die Einführung von Thiolgruppen in PRPP als unpraktikabel erwies, wurde alternativ auf die intrinsische Ankergruppe des PRPP zurückgegriffen:

Wenn die Reaktion zwischen RNA-Konjugat und aktiviertem Zucker stattfindet, wird ein phosphorylierter Riboserest auf das durch den nucleobasen-derivatisierten Linker blockierte 3'-Ende übertragen. Das Reaktionsprodukt erhält eine neue Funktionalität, nämlich die 2',3'-cis-diol-Gruppe der Ribose.

Es galt nun, sich diese neue Funktionalisierung als Selektionskriterium nutzbar zu machen.

4.1.6 Periodatoxidation und Immobilisierung von cis-diol-Gruppen

Cis-diol-Gruppen reagieren unter milden oxidativen Bedingungen mittels Natriumperiodat selektiv zu einem Dialdehyd [von Ahsen, 1995; Sampson, 1996], welcher direkt mit hydrazinderivatisierten Festphasen immobilisiert werden kann [Hansske, 1979; Oh, 1994]. Die RNA wird durch die Periodatoxidation selbst nicht angegriffen.

Auf dieser Basis konnten wir ein Selektionsschema entwickeln (Abb. 14). Wenn die Reaktion zwischen RNA-Linker-Konjugat und dem aktivierten Zuckerphosphat stattfindet, wird ein Ribosephosphatrest an das 3'-Ende angefügt, das sonst durch den derivatisierten Linker blockiert ist. Diese neuentstandene cis-diol-Gruppe wird mit Periodat zu einem Dialdehyd oxidiert, der anschließend an einer Hydrazidfestphase immobilisiert werden kann. Durch anschließende photolytische Spaltung werden die RNA-Moleküle wieder freigesetzt.

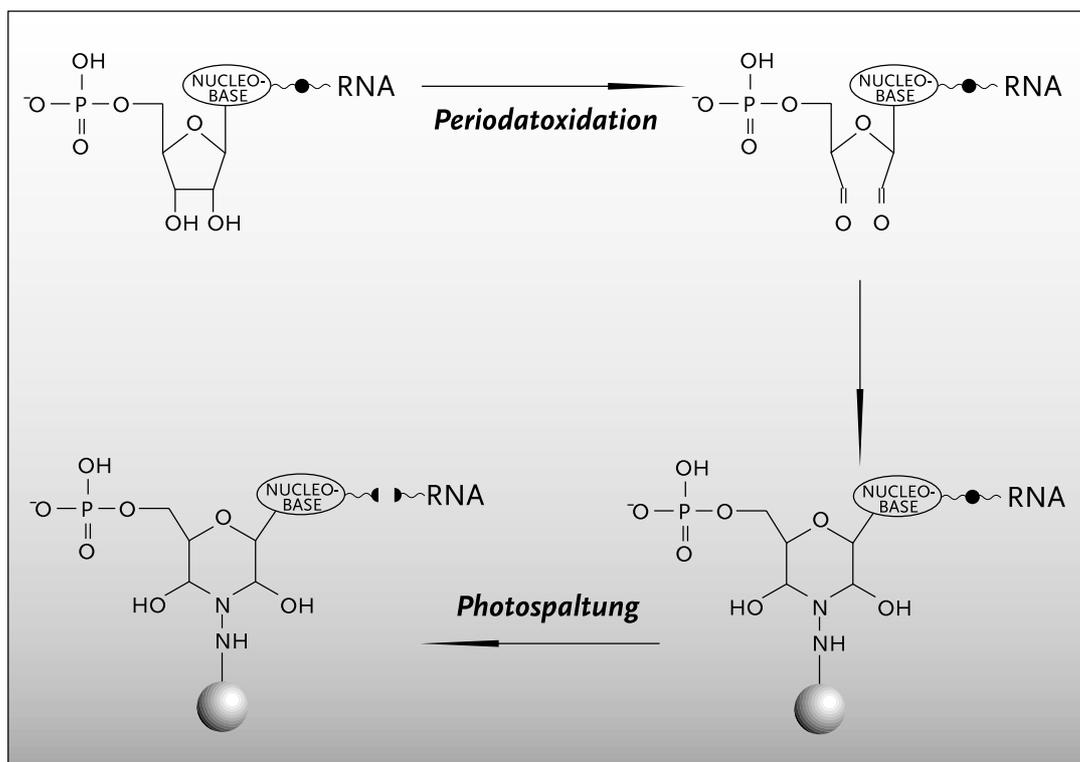


Abb. 14: Selektionsschema zur N-glycosidischen Bindungsknüpfung mittels Oxidation von cis-diol-Gruppen und Immobilisierung

Es wurde ein Dinucleotidanalogen als Modellverbindung mittels automatischer Festphasensynthese dargestellt, das ebenfalls eine cis-diol-Gruppe (Adenosinlinker, Abb. 15a) trägt, um das Immobilisierungsprotokoll auszuarbeiten.

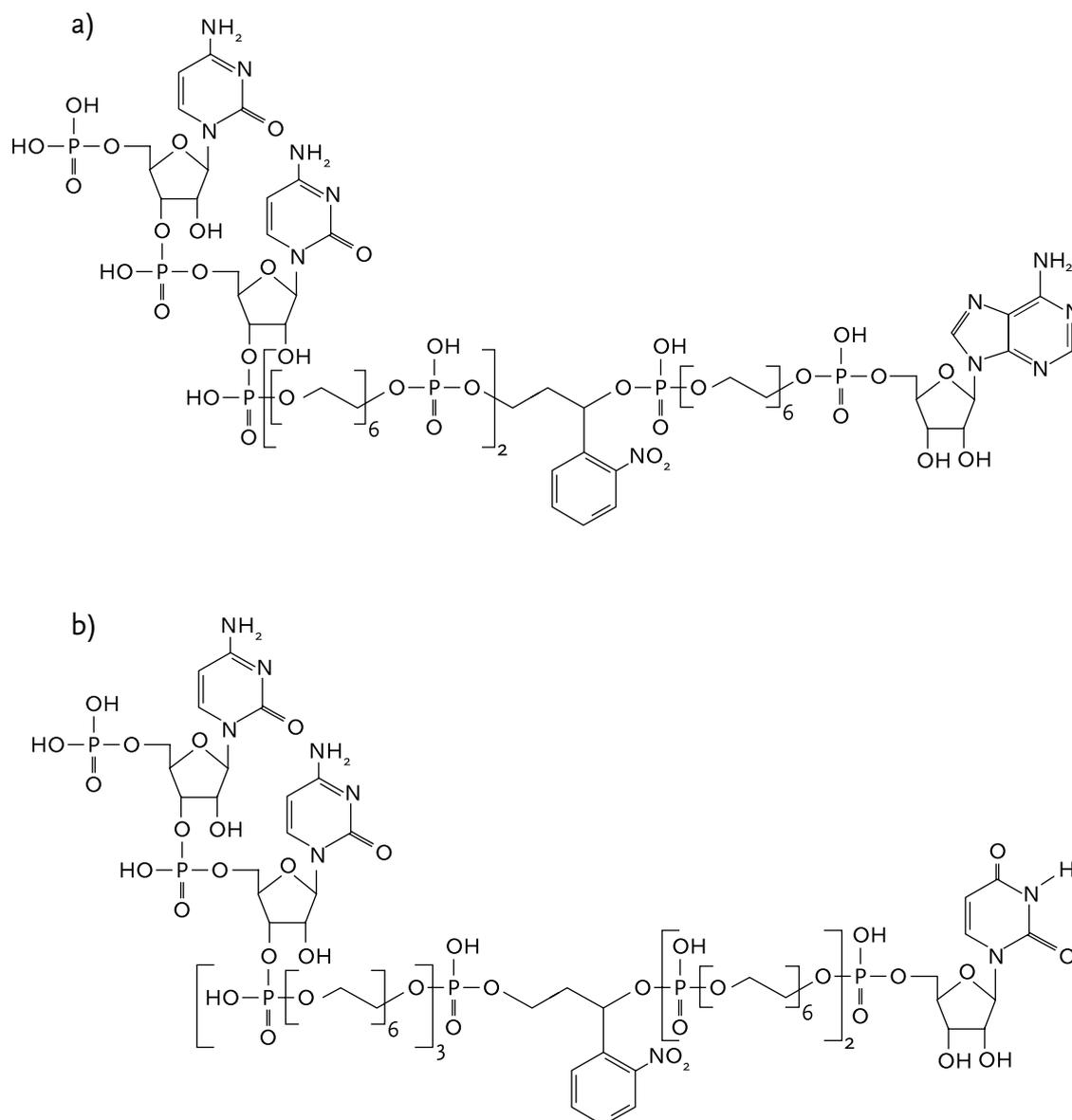


Abb. 15: a) Adenosinlinker mit 3 flexiblen HEG-Einheiten, b) Uridinlinker mit 5 HEG-Einheiten

Die Anordnung des Riboserestes in diesem Dinucleotidanalogen bzw. in dem nach Ligation erhaltenen RNA-Konjugat entspricht nicht ganz genau dem des entstehenden Produktes nach erfolgter Reaktion mit PRPP, jedoch waren Unterschiede hinsichtlich des Immobilisierungsverhaltens nicht zu erwarten.

Zur Simulation und Entwicklung des Selektionsschrittes wurde eine T7-Transkription eines Teils der DNA-Bibliothek zur Generierung von Pool-RNA-Molekülen durchgeführt und diese jeweils mit dem Orotsäurelinker bzw. dem Adenosinlinker mit T4-RNA-Ligase ligiert. Nach Reinigung über PAGE wurden jeweils 100 pmol unmodifizierte RNA, RNA-Orotsäurelinker-, RNA-Adenosinlinkerkonjugat mit Natriumperiodat oxidiert und nach Ethanol-fällung und Aufnahme im Immobilisierungspuffer mit 100 µl Festphase (Ultra Link Immobilized Hydrazide, Pierce), die sich auf Mikrozentrifugenfiltern befand, unter heftigem Schütteln inkubiert. So ließen sich verhältnismäßig einfach mehrere Waschschrte durchführen. Anschließend erfolgte eine laservermittelte photolytische Spaltung, wobei die entstehenden Spaltprodukte durch Zentrifugation von der noch auf der Festphase befindlichen ungespaltenen RNA abgetrennt werden konnten.

Tatsächlich konnten die cis-diol-Gruppen tragenden RNA-Adenosinlinkerkonjugate und die RNA mit unmodifiziertem 3'-Ende in guten Ausbeuten immobilisiert werden.

Die immobilisierten RNA-Adenosinlinker-Konjugate konnten selektiv von der Festphase heruntergespalten werden (Abb. 16). Die mit 70% etwas zu geringe Spaltungsausbeute bei dem RNA-Adenosinlinkerkonjugat und die 2%ige Immobilisierung vom Orotsäurelinkerkonjugat ist auf die Verunreinigung durch RNA mit nativem 3'-Ende zurückzuführen. Die Menge an RNA, die nach der Laserspaltung von immobilisierter RNA und RNA-Orotsäurelinkerkonjugat gewonnen wurde, stellt den Hintergrund bei den anschließenden Selektionen dar (Tab. 3).

Probe	RNA-Orotsäure-Linker-Konjugat	RNA	RNA-Adenosin-Linker-Konjugat
cis-diol-Gruppe	-	+	+
photospaltbarer Linker	+	-	+
Prozent immobilisiert	2.0	88	81
Prozent photolytisch freigesetzter RNA	0.2	0.3	70

Tab 3: Immobilisierung von RNA und RNA-Linkerkonjugaten an Hydrazidfestphasen und Photospaltung (355 nm)

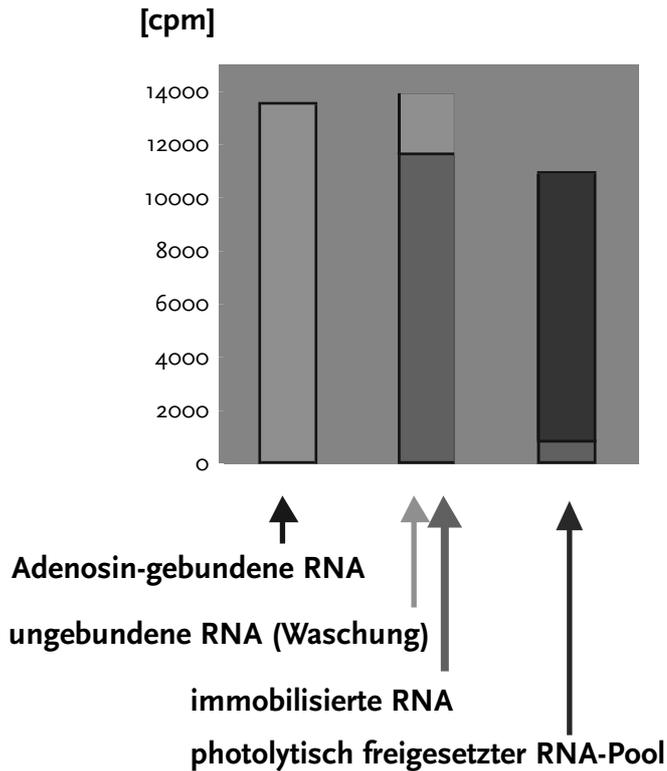


Abb. 16: Immobilisierung und photolytische Freisetzung von RNA-Adenosin-Linkerkonjugaten

Bei der Durchführung einer Selektionsrunde über Periodatoxidation, Immobilisierung und Photospaltung ergab sich folgendes Waschprofil für die einzelnen Waschschrte (siehe Methodenteil), wobei Fraktion 13 die photolytisch freigesetzte RNA enthielt und Fraktion 14 die Festphase nach der Photospaltung darstellt.

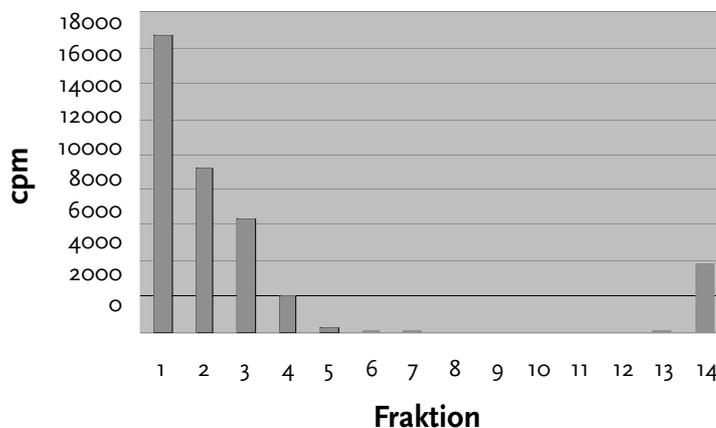


Abb. 17: Typisches Waschprofil einer Selektionsrunde (1 Durchlauf, 2 - 12 Waschfraktionen, 13 selektierte RNA, 14 Festphase)

Die Reaktion von Borsäurederivaten mit cis-diol-Gruppen ist pH-abhängig, da es sich um eine intermediäre Veresterung handelt.

Die Acryloylaminophenylborsäure wurde nach Literaturvorschrift [Igloi, 1985] synthetisiert und in guten Ausbeuten erhalten.

Unter unseren Bedingungen (5.4 % PAGE, davon 7.5 % APB; pH 9) konnte die Unterscheidung zwischen RNA-Konjugaten mit und ohne cis-diol-Gruppen gezeigt werden (Abb. 19).

Die Affinitätsgelelektrophorese mit borsäurehaltigen Gelen ist eine probate Methode zur Selektion auf cis-diol-Gruppen.

In den Selektionen diente das RNA-Uridin-Konjugat als Referenz (der Uridinlinker ist in Abb. 15b gezeigt).

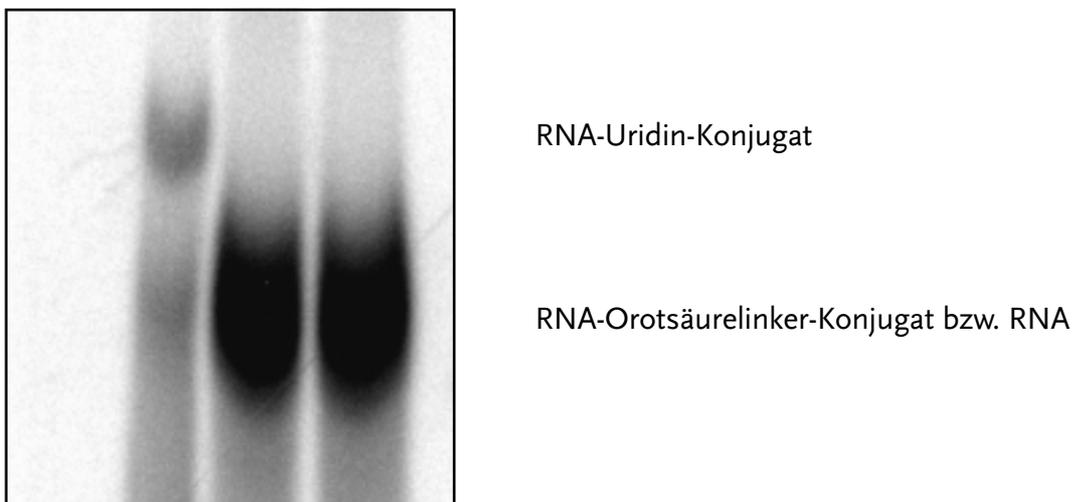


Abb. 19: APB-vermittelte Retardation von cis-diol-Gruppen (Autoradiographie, 5.4 % denaturierende Page, davon 7.5 % APB)

4.1.8 Durchführung der Selektion

Die Selektionen für die N-glycosidische Bindungsknüpfung an Pyridin- (Nicotinsäure) und Pyrimidinbasen (Orotsäure) wurden parallel durchgeführt. Nach der Generierung der randomisierten RNA-Bibliothek wurde diese jeweils mit dem entsprechenden nucleobasenderivatisierten Linker ligiert. Die erhaltenen RNA-Linker-Konjugate wurden mit dem aktivierten Zuckerphosphat PRPP inkubiert. Die Separierung aktiver von inaktiven Species erfolgte über Affinitätschromatographie mit APB oder über Periodatoxidation, Immobilisierung und Photospaltung.

Die selektierten Species wurden revers transkribiert und amplifiziert. Die nachfolgende T7-Transkription lieferte dann den Ausgangspool für die nächste Selektionsrunde.

Für den ersten Selektionsversuch wurden 3 Kopien der Poolkomplexität (≈ 0.8 nmol) als DNA-Matrize für die präparative T7-Transkription der ersten Selektionsrunde eingesetzt. Die danach folgende präparative Ligation mit den Linkern ergab 7.2 Komplexitäten orotsäurederivatisierten Pool, bzw. 8.9 Komplexitäten nicotinsäurederivatisierten Pool.

Zunächst wurden die RNA-Konjugate in Gegenwart des Puffers denaturiert, renaturiert und dann PRPP und $MgCl_2$ zugegeben. Die Zusammensetzung des Inkubationspuffers orientierte sich an den optimalen Bedingungen für RNA-Faltungen und den pH-Bedingungen entsprechend den natürlichen Ribosyltransferasen. Auf weitere Metallionen wurde aufgrund der Instabilität von PRPP-Lösungen besonders in Gegenwart von Schwermetallen verzichtet [Flaks, 1959].

In den Runden 1 bis 9 wurden bei den Immobilisierungen (Runde 3, 5, 7, 8) zwischen 0.075 und 0.48 % selektiert, bei den APB-vermittelten Gelretardationen (Runde 1, 2, 4, 9, 10) zwischen 0.2 und 1.0 %. Die Selektionen wurden nach der 10. Runde abgebrochen, da keine katalytische Aktivität detektiert werden konnte.

Für den zweiten Selektionsversuch wurden die Inkubationsbedingungen verändert. Die Konzentration an PRPP wurde auf 10 mM gesenkt. Dadurch

wurde die effektive Magnesiumionenkonzentration verdreifacht, da jeweils ein Mg^{2+} -Ion durch ein Molekül PRPP komplexiert ist.

2.5 Kopien der Poolkomplexität (a 0.8 nmol) wurden als DNA-Matrize für die präparative T7-Transkription eingesetzt. Die danach folgende präparative Ligation mit den Linkern ergab 9.1 Komplexitäten orotsäurederivatisierten Pool, bzw. 11.1 Komplexitäten nicotinsäurederivatisierten Pool.

In den Runden 2 bis 9 wurden bei den Immobilisierungen (Runde 3, 4, 6, 7, 9) zwischen 0.06 und 0.32 % selektiert, bei den APB-vermittelten Gelretardationen (Runde 2, 5, 8, 10) zwischen 0.83 und 1.7 %. Bei der 10 ten Runde zeigte sich ein deutlich verändertes Laufverhalten von sowohl RNA-Konjugaten vor und nach der Inkubation mit PRPP auf dem APB-Gel, daß daraus geschlossen wurde, Moleküle mit veränderter gelelektrophoretischer Mobilität angereichert zu haben. Deswegen wurde die Runde 6 nochmals wiederholt und alle weiteren Selektionen (nicotinsäurederivatisierter Pool) nur noch mittels Immobilisierungen durchgeführt, um der Selektion von RNA-Molekülen mit veränderter gelelektrophoretischer Mobilität entgegenzuwirken.

Auch hier lagen die Selektionsraten bei 0.08 - 0.4 %.

Eine Anreicherung von katalytischen RNAs konnte nicht detektiert werden.

1. Selektion:

Runde	O / ‰	N / ‰	Selektion
1	4	5.2	APB-Gel
2	10.4	6.8	APB-Gel
3	4.8	3.3	Immobilisierung
4	6.9	5.2	APB-Gel
5	1.0	0.75	Immobilisierung
6	3.7	2.0	APB-Gel
7	3.2	3.6	Immobilisierung
8	3.4	2.2	Immobilisierung
9	2.3	2.5	APB-Gel
10			APB-Gel

2. Selektion:

Runde	O / ‰	N / ‰	Selektion
1	65	50	APB-Gel
2	1.2	1.6	APB-Gel
3	3.2	2.6	Immobilisierung
4	3.0	1.8	Immobilisierung
5	8.4	16.7	APB-Gel
6	0.6	1.4	Immobilisierung
7	2.0	2.4	Immobilisierung
8	3.9	5.2	APB-Gel
9	1.6	1.6	Immobilisierung
10			APB-Gel

Runde	O / ‰	N / ‰	Selektion
6		4.3	Immobilisierung
7		1.0	Immobilisierung
8		0.8	Immobilisierung
9		2.7	Immobilisierung
10		2.1	Immobilisierung
11		1.2	Immobilisierung
12		0.9	Immobilisierung

Tab. 4: Ergebnisse der einzelnen Selektionsrunden (O-Orotsäure derivatisierte RNA, N-Nicotinsäure derivatisierte RNA)

4.2 Entwicklung eines dynamischen Verfahrens zur Bestimmung von Konzentrationen kleiner organischer Moleküle

RNA-Strukturen können ihre Konformation durch Bindung eines Liganden ändern. Wenn diese dynamische Strukturänderung mit dem Ein- oder Ausschalten katalytischer Aktivität einhergeht, kann man diese Eigenschaft prinzipiell zur Generierung von Biosensoren nutzen.

Breaker berichtete kürzlich über ein Theophyllin-abhängiges allosterisches Ribozym, das aus dem Hammerheadribozym und dem Theophyllinaptamer besteht, welche durch ein Kommunikationsmodul verbunden sind [Soukup, 1999b, c].

Das Theophyllin ist ein interessanter Naturstoff aufgrund seiner physiologischen Wirkung als Bronchodilator. Als Arzneimittel wird es zur Linderung asthmatischer Beschwerden genutzt.

Will man Theophyllin nachweisen, muß man ein System finden, das selektiv zwischen Theophyllin und Coffein unterscheiden kann. Das Theophyllinaptamer weist diese Eigenschaft auf, da es durch Gegenselektion mit Coffein isoliert werden konnte [Jenison, 1994]. Die Diskriminierung zwischen beiden Verbindungen beträgt 10 000.

Das theophyllinabhängige allosterische Ribozym (Abb. 20) sollte die Basis bilden für die Etablierung eines theophyllinselektiven Biosensors.

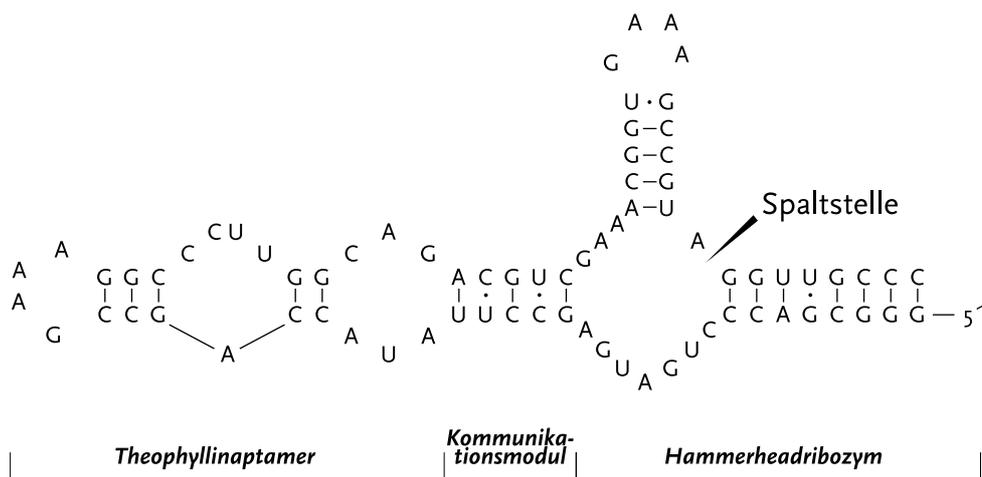


Abb. 20: Ribozym HH76

Zunächst mußte getestet werden, ob dieses allosterische Ribozym eine Abhängigkeit von der Konzentration des Theophyllins zeigt. Dazu wurde das Ribozym HH76 durch T7-Transkription hergestellt. Jeweils 18.3 pmol Ribozym HH76 wurden mit verschiedenen Mengen an Theophyllin (0 - 3.3 mM) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und über denaturierende 10% PAGE analysiert (Abb. 21).

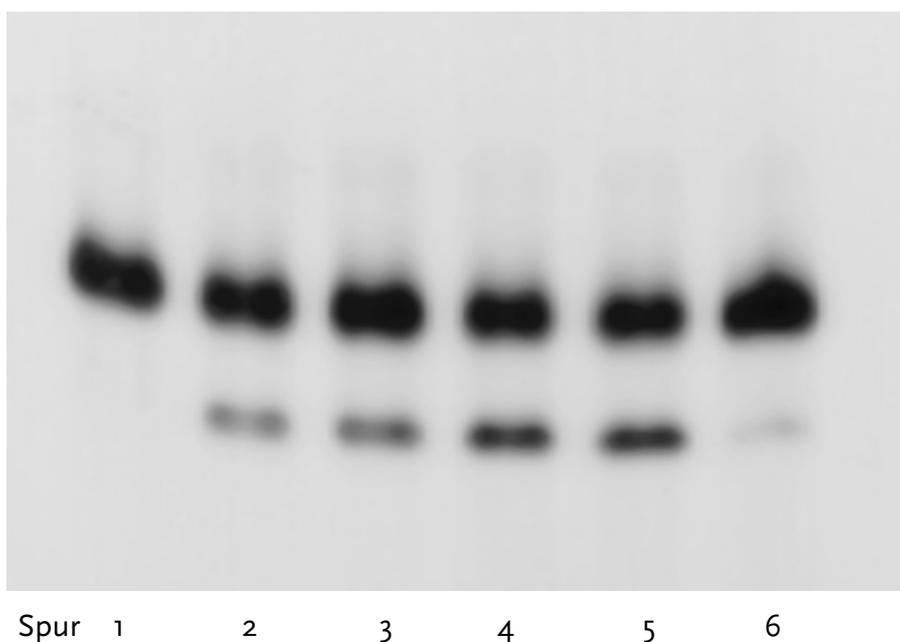


Abb. 21: Theophyllinvermittelte Hammerheadspaltung des Ribozyms HH76 (Autoradiographie, denaturierende 10 % PAGE)

Gelspur	c(Theophyllin) / mM	% Spaltprodukt
1	0	2.4
2	0.33	19.8
3	0.5	22.4
4	1.67	32.8
5	3.3	30.8
6	3.3	6.5 ^a

Tab. 5: Auswertung der theophyllinabhängigen Hammerheadspaltung aus Abb. 21, (a: die Magnesiumkonzentration wurde in diesem Ansatz auf 4.5 mM bzw. 20 % gesenkt)

Auf der Abbildung des Gels ist erkennbar, daß eine Abhängigkeit der Spaltung von der Theophyllinkonzentration existiert. Die Spaltungseffizienzen wurden mit dem Phosphorimager Storm 840 (Molecular Dynamics) und der Auswertungssoftware ImageQuant bestimmt und sind hintergrundkorrigiert.

Die Analyse des Gels ergab, daß innerhalb von 30 Minuten ca. 30% des Ribozyms gespalten wurden. Das Ribozym ist von der Magnesiumionenkonzentration stark abhängig, da die Spalteffizienz bei der höchsten Theophyllinkonzentration und 20 % der Mg²⁺-Ionen (4.5 mM) auf 21 % sank (Spur 6).

Mit der ermittelten Abhängigkeit der Hammerheadspaltung von der Theophyllinkonzentration waren also die Grundvoraussetzungen gegeben, um auf der Basis des Ribozyms HH76 einen theophyllinabhängigen Biosensor zu entwickeln.

Hat man ein konzentrationsabhängiges System, benötigt man ein meßbares Signal, welches der Theophyllinmenge proportional ist. Hier bietet sich die Fluoreszenz als einfach und sofort zu detektierendes Signal an. Hammerheadkinetiken wurden bereits über Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) ermittelt [Jenne, 1999; Singh, 1999]. Im intermolekularen Hammerheadsystem kann der Substratstrang mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen substituiert sein. Bei erfolgter Hammerheadspaltung diffundieren die zwei kleinen Bruchstücke ab, die Änderung der Fluoreszenzresonanz bildet die Grundlage zur kinetischen Analyse der Spaltungseffizienz.

Wir entwarfen ein intermolekulares System (Abb. 22), das aus einem mit Fluorescein und Dabcyl modifizierten Substratstrang besteht, der entsprechend komplementär zu dem Hammerheadstrang mit Theophyllin-Response ist.

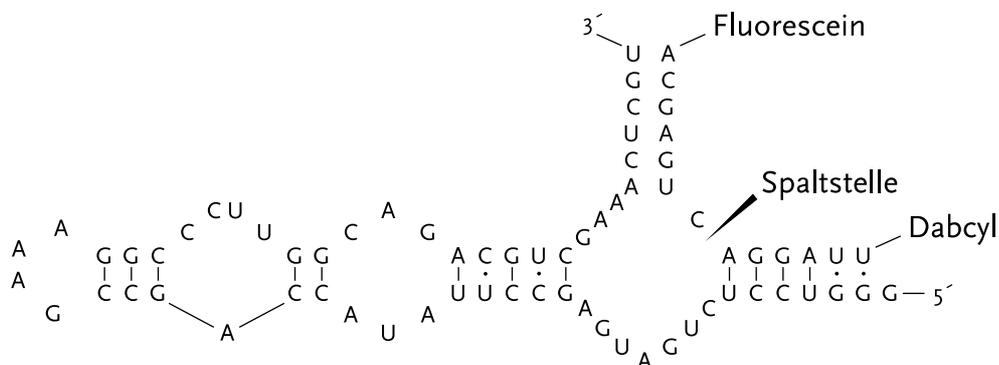


Abb. 22: Intermolekulares Hammerheadsystem SWI58-SWI13DF

Fluorescein und Dabcyl sind laut Kramer ein ausgezeichnetes Fluorophor/Quencherpaar, das er auch für die "molecular beacons" (molekulare Leuchtfeuer) einsetzte [Tyagi, 1998]. Bei Anregung mit der Excitationswellenlänge des Fluoresceins wird Energie aufgenommen, die normalerweise als Licht höherer Wellenlänge abgestrahlt wird. In Gegenwart eines Quenchers wie Dabcyl wird diese Energie auf ihn übertragen und als Wärme an das System abgegeben, es kommt also nicht zur Freisetzung von Fluoreszenz. Die Quencheffizienz ist vom Abstand des Fluorophores vom Quencher abhängig.

Nach der Spaltung des Substratstranges sollten die 6 und 7 nt langen Bruchstücke abdiffundieren, welches durch die geringe Anzahl von G-C-Basenpaaren erleichtert wird, der räumliche Abstand zwischen Fluorophor und Quencher erhöht sich drastisch, Fluoreszenz wird freigesetzt.

Da das Hammerheadribozym nur in Gegenwart von Theophyllin aktiv ist, sollten die Spaltungsraten mit der Theophyllinkonzentration korrelieren.

Der Hammerheadstrang SWI58 wurde durch automatisierte Festphasensynthese hergestellt und über HPLC, der Substratstrang über 18 % PAGE gereinigt. Zuerst wurden die Spaltungsraten im Substratüberschuß untersucht. Für jeden Ansatz wurden 174 pmol Hammerheadstrang und 700 pmol Substratstrang eingesetzt.

Die zeitliche Verfolgung des Fluoreszenzemissionssignals bei 518 nm bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm wurde in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Theophyllin (Abb. 23) und in Gegenwart von Coffein aufgezeichnet und die relative scheinbare Anfangsgeschwindigkeit als Anstieg der Tangente an die resultierenden Kurven ermittelt.

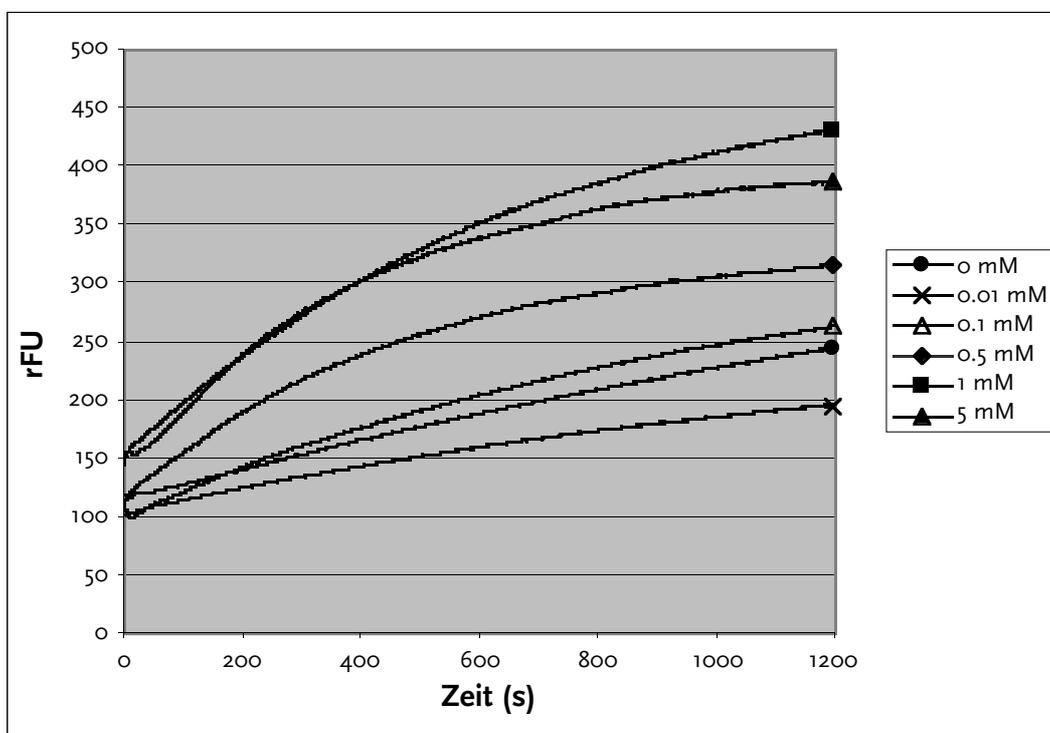


Abb. 23: Zeitliche Verfolgung des Fluoreszenzsignals bei der theophyllinvermittelten Hammerheadspaltung im System SWI58/SWI13DF (0-5 mM Theophyllin, Substratüberschuß, Anregung 490 nm, Emission 518 nm)

Es stellte sich heraus, daß sich die Hammerheadspaltung auch in Abwesenheit von Theophyllin nennenswert vollzog.

Die jeweiligen Anfangsgeschwindigkeiten korrespondierten mit der Konzentration des anwesenden Theophyllins, die in Abb. 24 wiedergegeben ist.

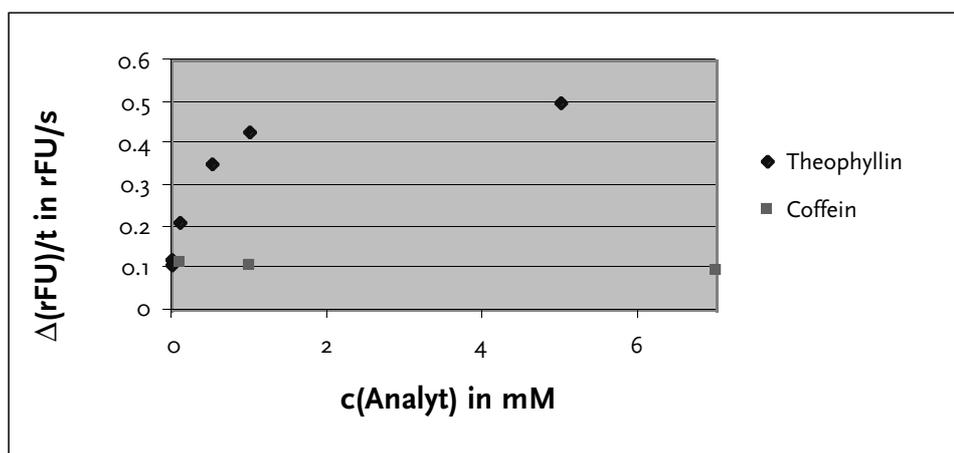


Abb. 24: Hammerheadspaltung (Substratüberschuß): die relativen scheinbaren Anfangsgeschwindigkeiten wurden gegen die Theophyllin- bzw. Coffeinkonzentration im Ansatz aufgetragen

Mit diesem System sind Theophyllinkonzentrationen von 0.1 - 2 mM bestimmbar. Coffein zeigte keinen Effekt.

Die Untersuchung der Theophyllinabhängigkeit der Hammerheadribozym-spaltung wurde auch unter Bedingungen des Ribozymüberschusses durchgeführt. Das Verhältnis zwischen Ribozym- und Substratstrang betrug 3 : 1.

Die zeitliche Verfolgung des Fluoreszenzemissionssignals wurde analog der Messungen bei Substratüberschuß aufgezeichnet (Abb. 25).

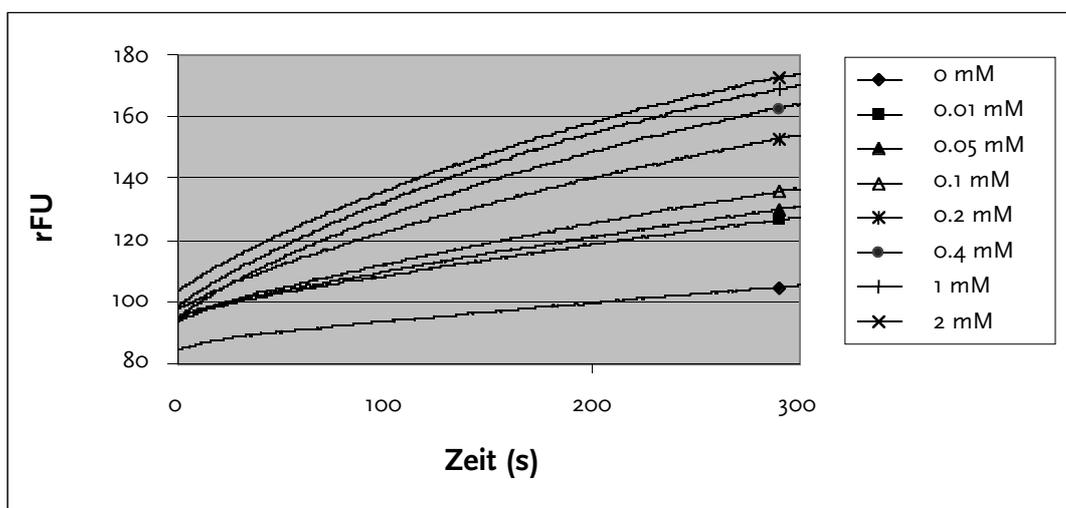


Abb. 25: Fluoreszenzsignal bei der theophyllinvermittelten Hammerheadspaltung im System SWI58/SWI13DF (0-2 mM Theophyllin, Substratüberschuß, Anregung 490 nm, Emission 518 nm)

Die relative Anfangsgeschwindigkeit wurde als Anstieg der Tangente an die resultierenden Kurven bei $t = 60$ s ermittelt und aus 2 Meßreihen gemittelt (Abb. 26).

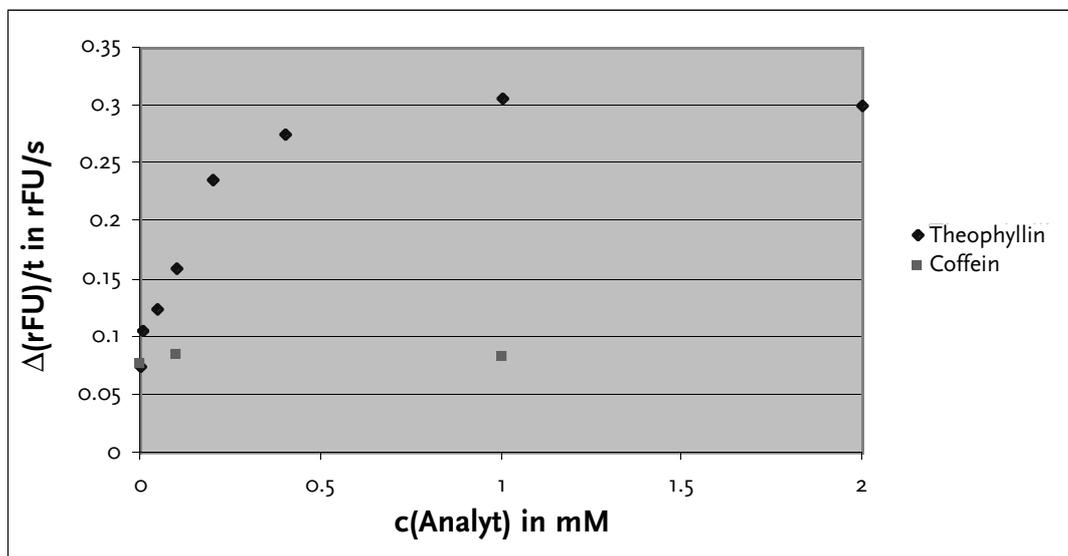


Abb. 26: Hammerheadspaltung (Ribozymüberschuß): die relativen scheinbaren Anfangsgeschwindigkeiten wurden gegen die Theophyllin- bzw. Coffeinkonzentration im Ansatz aufgetragen

Unter den Bedingungen des Ribozymüberschusses lag der dynamische Bereich unseres Sensors bei 0.01 - 1 mM Theophyllin. Er umfaßt also zwei Größenordnungen. Im unteren Konzentrationsbereich ist er sensitiver als unter den Bedingungen des Substratüberschusses. Die Dissoziationskonstante des Theophyllins entspricht der halbmaximalen scheinbaren Anfangsgeschwindigkeit und liegt bei etwa 200 μ M.

Die allosterische Aktivierung (das Verhältnis maximaler Ribozymspaltung zur Hintergrundreaktion) betrug etwa 4. Die Gegenwart von Coffein führte zu keiner Ribozymspaltung über der Hintergrundreaktion. Auch hier konnte die Theophyllinselektivität gezeigt werden.

Für den theophyllinabhängigen Sensor sind die Bedingungen des Ribozymüberschusses vorzuziehen.