

3. Material und Methoden

3.1.1 Oligodesoxyribonucleotide

Primer A	5'-TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG AGC TCA GCC TTC ACT GC-3'
Primer B	5'- GTG GAT CCG ACC GTG GTG CC-3'
DNA-Bibliothek	5' TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG AGC TCA GCC TTC ACT GC—N ₁₂₀ —GGC ACC ACG GTC GGA TCC AC 3' Ausgangskomplexität : $4.8 \cdot 10^{14}$ verschiedene Sequenzen (800 pmol)
HH76DNA	5'- GGG CGA CCC TGA TGA GCC TTA TAC CAG CCG AAA GGC CCT TGG CAG ACG TCG AAA CGG TGA AAG CCG TAG GTT GCC C-3'
HH40	5'- TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG ACC CTG ATG AGC CTT A-3'
HH21	5'- GGG CAA CCT ACG GCT TTC ACC-3'

3.1.2 Oligoribonucleotide

SW158	5'- GGG UCC UCU GAU GAG CCU UAU ACC AGC CGA AAG GCC CUU GGC AGA CGU CGA AAC UCG U-3'
SW113DF	5'- Fluorescein-ACG AGU CAG GAU U-Dabcyl-3'
Linker	pCpC(pHEG) ₃ pX(pHEG) ₂ pHEX-NH ₂
Uridinlinker	pCpC(pHEG) ₃ pX(pHEG) ₂ pU
Adenosinlinker	pCpC(pHEG) ₂ pX(pHEG)pA

Bis auf die kombinatorische DNA-Bibliothek, SWI58 und die Linker, die in unserem Labor mittels Festphasensynthese hergestellt wurden, sind alle anderen Oligonucleotide von NAPS Göttingen in der Reinheit Molecular Biology Grade bezogen worden.

3.2 Standardmethoden und Reagenzsysteme

Folgende Standardmethoden wurden entsprechend den angegebenen Literaturstellen oder nach Herstellerangaben durchgeführt:

Ethanol- und Isopropanolfällungen, Polyacrylamid- (Rothiphorese DNA Sequenziersystem, Roth), Agarosegelelektrophoresen und Chloroform-Phenol-Extraktionen [Sambrook, 1989].

Alle Feinchemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Fluka, Roth, Riedel de Haën und Baker in der größtmöglichen Reinheit erworben.

Folgende Puffersysteme wurden in den jeweiligen enzymatischen, sowie chemischen Schritten eingesetzt:

10x Transkriptionspuffer: 800 mM HEPES, pH 7.5
220 mM MgCl₂
10 mM Spermidin

10x Ligationsspuffer: 500 mM HEPES-NaOH pH 8.3
100 mM MgCl₂
1 mM ATP (MBI Fermentas)

10x PCR-Puffer: 200 mM Tris-HCl pH 8.4
500 mM KCl (Gibco-BRL)

5x First Strand-Puffer: 250 mM Tris-HCl pH 8.3
375 mM KCl 15 mM MgCl₂ (Gibco-BRL)

10x Selektionsspuffer: 500 mM HEPES-NaOH pH 7.6
2 M KCl
10 mM EDTA

2x Immobilisierungsspuffer: Theorell-Stenhagen-Puffer pH 5.0 [Rauscher, 1977]

Waschlösung 1 : 1 M NaCl 10 mM Hepes-Na pH 6.8

Waschlösung 2 : 8 M Harnstoff 0.1 M Tris-HCl pH 7.4

Waschlösung 3 : 0.3 M Natriumacetat pH 5.5

Die Waschlösungen enthielten alle zusätzlich jeweils 0.3 mg/ml tRNA (Boehringer Mannheim).

3.3 T7-Transkription

Mit Hilfe der *in vitro* Transkription kann eine zu einer DNA-Sequenz komplementäre RNA hergestellt werden. Abhängig von der Herkunft der DNA-abhängigen RNA-Polymerase muß die DNA-Matrize einen 3'-terminalen Erkennungsbereich aufweisen. Das von uns verwendete Enzym stammt aus dem Bakteriophagen T7, der eine 17 Nucleotide lange Sequenz, den T7-Promotor, benötigt, um die Transkription zu starten.

Die Transkription selbst beginnt hinter der Promotorregion mit einem Guanosinnucleotid, wobei man die Effizienz des Enzyms noch erhöhen kann, indem man das Transkript mit zwei Guanosinnucleotiden beginnen läßt.

Die eingebauten Basen werden in Form von Nucleosidtriphosphaten benötigt. Durch den Zusatz von α - ^{32}P -CTP wurde die RNA radioaktiv markiert.

Standardansatz:

- 20 μl dsDNA-Matrizen mit Promotorbereich (z.B. 20 pmol),
Rohansatz nach PCR
- 20 μl 10x Transkriptionspuffer
- 5 μl Dithiothreitol (0.5 M)
- 1 μl Rinderserumalbumin (20 mg/ml, Boehringer Mannheim)
- 10 μl α - ^{32}P -CTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham)
- 8 x 4 μl NTPs (je 100 mM, Boehringer Mannheim/ Roche)
- 8 μl T7-Polymerase (50 U/ μl , Stratagene)
- ad 200 μl Wasser

Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 2-4 h oder über Nacht, Transkriptionsansätze wurden über denaturierende 6% PAGE gereinigt, die Produktbanden über Autoradiographie detektiert, ausgeschnitten und in 0.3 M Natriumacetat pH 5.5 ca. 45 min bei 70°C eluiert und ethanolpräzipitiert. Die Ausbeute an transkribierter RNA wurde durch Messung der Radioaktivität bestimmt.

Für die Quantifizierung der RNA gelten folgende Formeln:

$$\text{Einbaurate des } \alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-CTP} = \frac{\text{Radioaktivität der RNA [cpm]} * 100\%}{\text{eingesetzte Gesamtradioaktivität [cpm]}}$$

$$\text{RNA-Stoffmenge} = \frac{\text{Einbaurate} * \text{Konzentration CTP} * \text{Ansatzvolumen}}{\text{Anzahl der im Transkript vorkommenden Cytidine}}$$

3.4 Linkersynthese

Der Linker pCpC(pHEG)₃pX(pHEG)₂pHEX-NH₂ wurde mittels Festphasensynthese am DNA/RNA Synthesizer Expedite 8900 (Perkin Elmer) hergestellt. Es wurden 4 Synthesen a 1 µmol mit dem RNA 1 µmol Kopplungszyclus durchgeführt. 3'-Aminomodifier-C6-CPG Festphase, DMTr-Hexaethylglycolphosphoramidit, N₄-Benzoyl-5'-DMTr-2'-TBDS-Cytidinphosphoramidit und Bis-(cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit wurden von Chemgenes, Waltham, MA bezogen. Der Baustein der photolytischen Spaltstelle (X) 1-O-Nitrophenyl-1-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidyl)-3-O-DMTr-1,3-propan-diol wurde von F. Hausch nach Literaturvorschrift [Ordoukhanian, 1995] synthetisiert.

Die Spaltung von der Festphase und die Entschützung wurden mit insgesamt 1 ml 33% Ammoniak 16 h bei 55°C durchgeführt. Nach Lyophilisierung wurden die Synthesen mit je 50 µl Triethylamin-Trihydrofluorid zur Desilylierung der 2'-OH-Gruppen 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

DEAE Sephadex A-25 (Pharmacia) wurde in 50 mM Triethylammoniumacetat pH 7 suspendiert und in eine leere NAP-25 Säule bis zur Markierung gefüllt (ca. 7 ml), mit der Fritte versehen und mit 50 ml 50 mM

Triethylammoniumacetat pH 7 equilibriert. Die Ansätze nach der Entschützung wurden vereint, mit 0.1 ml 2 M Triethylammoniumacetat pH 7 versetzt und mit Wasser auf 10 ml verdünnt. Nach Applikation auf die Festphase wurde diese mit 50 ml 50 mM Triethylammoniumacetat pH 7 gewaschen und mit 10 ml 2 M Triethylammoniumacetat pH 7 unter Fraktionierung eluiert. Nach UV-Vermessung der Fraktionen bei 260 nm wurden die linkerenthaltenden Proben vereint und lyophilisiert.

Die Ausbeute betrug ca. 600 nmol (entsprechend 15 % der Theorie) nach Reinigung über HPLC (HPLC-Laufmittel: Puffer A: 0.1 M Triethylammoniumacetat pH 7.0 in Wasser, Puffer B: 0.1 M Triethylammoniumacetat pH 7.0, 80 % Acetonitril in Wasser; Fluß 1 ml/min. HPLC-Anlage: Beckmann System Gold; HPLC-Säule: Beckmann Ultrasphere ODS 4.6 x 250 mm). Elutionsprofil A:

t (min)	0	5	25	29	34	39	40
Puffer B (%)	1	22.5	26.5	100	100	1	1

3.5 Linkerderivatisierung

Orotsäurelinker

300 nmol Linker wurden in 30 µl 1 M K₂HPO₄ pH 8.0 gelöst. Eine Lösung aus 3.4 mg Orotsäure-NHS-ester in 30 µl trockenem DMF wurde hinzugefügt und 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktion vollzog sich unter Ausscheiden eines weissen Niederschlages. Anschließend wurden 10 µl 2 M Ammoniumacetatlösung zugegeben, 10 min geschüttelt, mit 100 µl Wasser verdünnt und durch ein Mikrozentrifugenfilter (0.45 µm Celluloseacetat, Roth) zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 140 µl Wasser gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden über HPLC gereinigt (R_t 13.5 min, Elutionsprofil A, siehe Linkersynthese). Die Ausbeute wurde über die UV-Absorption bei 260 nm bestimmt und betrug 100 nmol entsprechend 33 % der Theorie.

gefundene Molmasse: 2959.0, Photofragmente 1904.2 und 1056.9, (berechnet für [M-H]⁻ 2957.9, 1903.4, 1056.4)

Nicotinsäurelinker

60 μl 5 mM Linker (300 nmol) wurden zur Trockne lyophilisiert, in 30 μl 1 M K_2HPO_4 pH 8.0 gelöst. Eine Lösung aus 3.4 mg Nicotinsäure-NHS-ester in 17 μl trockenem DMF wurde hinzugefügt und 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden 10 μl 2M Ammoniumacetatlösung zugegeben, 10 min weitergeschüttelt und mit Wasser auf 300 μl aufgefüllt, durch ein Mikrozentrifugenfilter (0.45 μm Celluloseacetat, Roth) zentrifugiert und über HPLC gereinigt (R_t 16.2 min, Elutionsprofil A, siehe Linkersynthese). Die Ausbeute wurde über die UV-Absorption bei 260 nm bestimmt und betrug 180 nmol entsprechend 60 % der Theorie.

gefundene Molmasse: 2925.0, Photofragmente 1904.1 und 1023.9 (berechnet für $[\text{M-H}]^-$ 2924.9, 1903.4, 1023.4)

3.6 Ligation mittels T₄-RNA-Ligase

In jeder Selektionsrunde mußte der Linker jeweils wieder an die Pool-RNA-Moleküle gebunden werden.

Wegen der bekannten Toleranz der T₄-RNA-Ligase gegenüber Modifikationen [Igloi, 1996] konnte diese Ligase dazu genutzt werden.

Ansatz:

- x μl RNA (z.B. 2 nmol)
- 20 μl 10x Ligationspuffer
- 20 μl Dimethylsulfoxid
- 1 μl Dithiothreitol (0.5 mM, Sigma)
- 1 μl Rinderserumalbumin (20 mg/ml Boehringer Mannheim)
- 2 μl 5 mM Linker
- 25 μl T₄-RNA-Ligase (15 U/ μl , MBI Fermentas)
- ad 200 μl Wasser

Die Inkubation erfolgte bei 18°C über Nacht unter Lichtausschluß. Die Ansätze wurden ethanolgefällt und über denaturierende 6% PAGE gereinigt (vgl. T₇-Transkription), bzw. mit Phenol-Chloroform extrahiert und ethanolgefällt.

3.7 PRPP-Aktivitätstest

Um die Aktivität des PRPP sicherzustellen, wurde gelegentlich ein enzymatischer Assay [Kornberg, 1955] durchgeführt. Er basiert auf der Umwandlung von Lithiumorotat zu Orotidinmonophosphat durch die Orotidylphosphoribosyltransferase, die zu einer spektrometrisch verfolgbaren Abnahme der Absorption bei 295 nm führt.

Ansatz:

- 910 µl Wasser
- 40 µl Tris-HCl pH 7.4 (0.5 M)
- 10 µl MgCl₂ (250 mM)
- 10 µl Lithiumorotidat (20 mM)
- 1 µl PRPP (100 mM)
- 10 µl Orotidylphosphoribosyltransferase
(Sigma, gelöst in Wasser zu 0.1 U/ml)

3.8 Inkubationsschritt bei den Selektionen

Für einen 100 µl Inkubationsansatz wurden 100 pmol Ligationsprodukt in 60 (70) µl Wasser gelöst, 10 µl Selektionspuffer zugegeben und 5 min bei 95°C denaturiert und weitere 5 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl (1. Selektion) bzw. 10 µl (2. Selektion) 100 mM PRPP (frisch bereitet) und 10 µl 250 mM MgCl₂ wurde der Ansatz über Nacht bei 18°C unter Lichtausschluß stengelassen. Eingesetzt wurden 100-300 pmol Ligationsprodukt unter entsprechender Vergrößerung des Ansatzes.

3.9 Gelpermeationschromatographie

Die Methode der Gelpermeationschromatographie wurde genutzt, um den großen Überschuss an PRPP nach der Inkubation abzutrennen. Dazu wurden NAP-25-Säulen (Sephadex G 25, Pharmacia) mit 0.3 M Natriumacetat equilibriert, der Inkubationsansatz auf die Säule gegeben und nach Einlaufen der Probe mit ca. 2.7 ml 0.3 M Natriumacetat gewaschen und mit ca. 1.6 ml

0.3 M Natriumacetat in Fraktionen eluiert und anschließend ethanolgefällt. Die Fraktionierung erfolgte hier über die Detektierung der radioaktiven Strahlung mittels eines Handmonitors für β -Strahlung.

3.10 Periodatoxidation

Die gefällten RNA-Konjugate wurden in 40 μ l 0.3 M Natriumacetat pH 5.5 und 40 μ l Wasser gelöst und mit 20 μ l einer frisch bereiteten 10 μ M Natriumperiodatlösung 5 min unter Lichtausschluß inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 20 μ l Butan-2,3-diol gequencht und ethanolpräzipitiert.

3.11 Immobilisierung

Die Immobilisierung wurde in Mikrozentrifugenfiltern (Roth, Celluloseacetat, Porengröße 0.45 μ m) durchgeführt.

90 μ l der hyrazidderivatisierten Festphase (Ultra Link Immobilized Hydrazide, Pierce, Hydrazidbeladung 19 μ mol/ml) wurden in das Zentrifugationsfilter gegeben, mit Wasser gewaschen und mit 90 μ l Wasser und 10 μ l t-RNA (Boehringer Mannheim, 30 mg/ml) vorinkubiert, um unspezifische Interaktionen zwischen Pool-RNA und Festphase zu vermeiden. Es wurde einmal mit 200 μ l Wasser nachgewaschen und zentrifugiert. Die Pool-RNA wurde in 50 μ l Immobilisierungspuffer und 50 μ l Wasser gelöst und auf die Festphase gegeben. Nach 40 minütigem heftigen Schütteln wurde 30 μ l gleich behandelte Festphase zugegeben und nochmals 20 min geschüttelt.

Anschließend wurde zentrifugiert und die nun trockene Festphase nach folgendem Programm gewaschen:

2x 200 μ l Waschlösung 1

5x 200 μ l Waschlösung 2

4x 200 μ l Waschlösung 3

Nach jedem Waschschrift wurde vorsichtig zentrifugiert und die RNA-Menge der jeweils erhaltenen Fraktionen im Cerenkow-Zähler (Beckmann LS 6000 SC) über die entsprechende Radioaktivität bestimmt.

3.12 Photospaltung

Die nun erhaltene Festphase wurde in 100 µl Waschlösung 3 suspendiert und unter Schütteln 10 s lang mit Laserlicht der Wellenlänge 355 nm (Nd-YAG-Laser Fa. Spektron SLG 800 G und SL 404 G) bestrahlt und zentrifugiert. Diese Prozedur wurde noch einmal wiederholt und abschließend mit 200 µl Waschlösung 2 gewaschen. Die nach der Photospaltung erhaltene RNA wurde vereinigt und unter Zugabe von 1 µl Glycogen (Boehringer Mannheim, 20 mg/ml) ethanolgefällt.

3.13 N-Acryloyl-3-aminophenylborsäure (APB)

Es wurden 3.7 g (20 mmol) 3-Aminophenylborsäure-Hemisulfat in kleinen Portionen zu einer kräftig gerührten Lösung aus 3.4 g (17 mmol) Natriumhydrogencarbonat in 40 ml durch Aufkochen und Abkühlen unter Vakuum entgastem Wasser bei 0°C gegeben. 1.8 ml Acrylsäurechlorid wurden in ca. 50 µl Aliquots innerhalb von 20 min zugetropft. Es bildete sich eine starke weiße Eintrübung. Es wurde noch 2 h weiter bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Mischung 5 min bei -20°C inkubiert und der Niederschlag abfiltriert, in wenig Ethylacetat gelöst und die Lösung über Nacht mit Natriumsulfat getrocknet. Die Lösung wurde abdecantiert und das verbleibende Trockenmittel mit Ethylacetat gewaschen. Die organische Phase wurde mit ca. 80 ml Hexan gefällt.

Der abfiltrierte Niederschlag wurde in wenig siedendem Wasser umkristallisiert. Es wurden 2.77 g Produkt (15.4 mmol, 77 % Ausbeute) erhalten. Das APB wurde bei 4°C gelagert.

MS: $[M]^+$ berechnet 191 (für $C_9H_{10}BNO_3$), gefunden 191

3.14 Copolymerisation von Acryloyl-3-aminophenylborsäure (APB) in Polyacrylamidgele

Bei der Herstellung der APB-Gele wurden 7.8 ml 30%ige Acrylamidstammlösung (Rothiphorese Gel A, Roth), 6.7 ml 2%ige Bisacrylamidstammlösung (Rothiphorese Gel B, Roth), 5 ml 1 M Tris-acetat pH 9, 21 g Harnstoff, 200 mg N-Acryloyl-3-aminophenylborsäure (APB) und Wasser ad 50 ml miteinander zur Lösung gebracht. Die Polymerisierung wurde mit 30 µl Tetramethylethyldiamin und 0.25 ml 10% Ammoniumperoxodisulfatlösung initiiert und 2-3 h polymerisiert. Die Gele im Format 18 cm x 24 cm x 1 mm wurden 30 min bei ca. 170 V und 10 mA vorlaufen gelassen. Die Elektrophorese wurde ca. 16 h bei 170 V und 0.1 M Tris-acetat pH 9 als Elektrolyten durchgeführt.

3.15 Reverse Transkription

Nach jeder Selektionsrunde mußte die selektierte RNA vor der PCR-Amplifizierung in DNA umgeschrieben werden. Dazu wurde die RNA-abhängige DNA-Polymerase oder auch Reverse Transkriptase benutzt. Ein zu der RNA-Matrize komplementärer DNA-Primer wurde dann durch dieses Enzym verlängert. Hier wurde die SuperScript II RNase H- reverse Transkriptase verwendet, die eine RNase H-Deletion besitzt. Als Matrize diente die selektierte RNA.

Ansatz:

Hybridisierungsschritt:

10 µl RNA-Matrize

1 µl Primer B (100 µM)

10 min bei 70°C, dann auf Eis

Reverse Transkription:

- 0.4 μ l Rinderserumalbumin (20 mg/ml)
- 4 μ l 5x First Strand Buffer
- 0.4 μ l Dithiothreitol (0.5 mM)
- 1 μ l dNTP-Mix (je dNTP 10 μ M, MBI Fermentas)
- 2 min bei 55°C
- 1 μ l SuperScript II Reverse Transkriptase
(200 U/ μ l, Gibco BRL)
- 45 min bei 55°C

3.16 PCR

Ansatz:

- 20 μ l RT-Ansatz
- 6 μ l Primer A (100 μ M)
- 4 μ l Primer B (100 μ M)
- 10 μ l 10x Taq-Puffer ohne MgCl₂
- 6 μ l MgCl₂ (50 mM)
- 2 μ l dNTP-Mix (10 μ M je dNTP,
MBI Fermentas)
- 60 μ l Wasser
- 1.5 μ l Taq-Polymerase (5 U/ μ l, Gibco-BRL)

Temperaturbedingungen:

- 94 °C 2 min (Initialdenaturierung)
- 94 °C 1 min (Denaturierung)
- 55 °C 1.5 min (Hybridisierung)
- 72 °C 2.5 min (Extension)
- 13 Cyclen

Die PCR wurde in 2*50 μ l Ansätzen im PTC-100 (MJ Research) durchgeführt. Sie wurde durch Zugabe der Polymerase während des ersten Denaturierungsschrittes gestartet (Hotstart).

Die PCR-Produkte wurden über 2% Agarosegelelektrophorese (mit Ethidiumbromid angefärbt) analysiert. Als Längenmarker wurde die 100 bp-Leiter von MBI Fermentas verwendet.

3.17 Durchführung der Selektionen

Für das erste Selektionsexperiment wurden in der ersten Selektionsrunde für die präparative Transkription 3 Kopien der kombinatorischen DNA-Bibliothek in einem 5 ml-Ansatz eingesetzt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C und Reinigung mittels Gelpermeationschromatographie (NAP-25) und 6% PAGE wurden 90 nmol RNA erhalten.

Pro Nucleobase (Orot- bzw. Nicotinsäure) wurden 30 nmol RNA in einem 1.2 ml Ansatz mit je 150 nmol entsprechend derivatisiertem Dinucleotidanalogen über Nacht ligiert und anschließend gelgereinigt (6%PAGE).

Die Inkubation mit PRPP wurde im 10fachen Standardansatz 48 h lang durchgeführt. Die Konzentration an eingesetzter RNA betrug 5.8 µM (orotsäurederivatisierter Pool) bzw. 7.1 µM (nicotinsäurederivatisierter Pool). In den weiteren Runden betrug sie 1 µM. Der Überschuß an PRPP wurde mittels Gelpermeationschromatographie und anschließender Ethanol-fällung entfernt. Die Selektionen wurden in Runde 1, 2, 4, 6, 9, 10 über ein APB-Gel, in den Runden 3, 5, 7, 8 über Periodatoxidation, Immobilisierung und anschließende Photospaltung durchgeführt.

Für das zweite Selektionsexperiment wurden in der ersten Runde für die präparative Transkription 2.5 Kopien der kombinatorischen DNA-Bibliothek in einem 2 ml-Ansatz eingesetzt. Nach 4 h Inkubation bei 37°C und Reinigung mittels Gelpermeationschromatographie (NAP-25, Pharmacia) und 6% PAGE wurden 21 nmol RNA erhalten.

Die Hälfte der RNA wurde jeweils in einem 0.6 ml Ansatz mit dem 4fachen Überschuß an entsprechend derivatisiertem Dinucleotidanalogen über Nacht ligiert.

Die kombinatorische RNA-Konjugatbibliothek wurde mit PRPP im 5 ml Ansatz über Nacht inkubiert. Die Konzentration an eingesetzter RNA betrug abweichend vom Standardansatz in der ersten Runde jeweils etwa 5 µM. Der Überschuß an PRPP wurde mittels Gelpermeationschromatographie und anschließender Ethanol-fällung entfernt. Die Selektionen wurden in Runde 1, 2,

5, 8, 10 über ein APB-Gel, in den Runden 3, 4, 6, 7, 9 über Periodatoxidation, Immobilisierung und anschließende Photo-spaltung durchgeführt.

3.18 1-O-Methyl-2,3-isopropyliden-D-ribofuranosid

Zu einer Lösung aus 10 g getrockneter D-Ribose in 200 ml absolutem Aceton und 120 ml 2,2-Dimethoxypropan wurde eine Mischung aus 40 ml Methanol und 8 ml 2.5 M methanolischer HCl gegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Die erhaltene Lösung wurde mit Pyridin neutralisiert und unter Vakuum zu einem Öl eingengt, das dann zwischen 100 ml Wasser und 40 ml Ether aufgenommen wurde. Die wässrige Phase wurde 3 mal mit 30 ml Ether ausgeschüttelt und die vereinigten Etherphasen eingengt. Das resultierende gelbliche Öl wurde bei 3.8 mbar und 70°C destilliert. Es wurden 7.3 g (54% der Theorie) eines farblosen Öls erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz): 1.32 ppm (CH_3), 1.48 ppm (CH_3), 3.4 ppm (OCH_3), 4.4 ppm (4-H), 4.6 ppm (1-H), 4.8 ppm (2-H), 4.95 ppm (3-H), 3.6 ppm (5- CH_2O)

3.19 Ribose-5-thiophosphat

8 ml trockenes Acetonitril und 2 ml Thiophosphorylchlorid wurden in einem 100 ml Zweihalskolben vorgelegt. 1.25 ml Pyridin wurden innerhalb von 10 min zugetropft. 2.8 g 1-O-Methyl-2,3-isopropyliden-D-ribofuranosid wurden in 8 ml trockenem Acetonitril innerhalb 40 min bei fortwährender Eisbadkühlung zugetropft und 2 h bei 0°C nachgerührt.

Der Ansatz wurde in 60 ml eiskaltes Wasser eingerührt und 1 h bei 70°C im Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen wurde der pH-Wert auf 5 mittels 1 M NaOH eingestellt.

Es wurden 12 ml einer gesättigten BaCl_2 -Lösung zugegeben und der Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt. Mit 1 M NaOH wurde der pH auf 7.4 gebracht und 150 ml Ethanol zugegeben. Der entstehende Niederschlag wurde abfiltriert bzw. abzentrifugiert.

Nach Trocknen im Vakuum über Phosphorpentoxid wurden 4.2 g eines weißen Feststoffes (Bariumsalz des Ribose-5-thiophosphats) gewonnen.

Dowex K21 (Cl⁻-Form) wurde mit 2 M NaOH in die OH-Form überführt und mit Wasser bis zur Neutralität gewaschen und anschließend mit Ameisensäure in die Formiat-Form überführt und wieder bis zur Neutralität gewaschen. Das Material wurde in eine FPLC-Säule (Pharmacia, XK 16) gefüllt.

Ca. 100 mg Bariumsalz des Ribose-5-thiophosphates wurde mittels Zugabe einer Natriumsulfatlösung in das entsprechende Natriumsalz überführt und das ausgefallene Bariumsulfat abgetrennt. Die erhaltene Lösung wurde über Anionenaustauschchromatographie mit dem vorbereiteten Dowex gereinigt (FPLC-Anlage Pharmacia LKB LCC-500 Plus). Eluent: A: Wasser, B: 1 M NH₄HCOO pH 5.9, Fluß 2 ml/min, Gradient 0% B auf 50% B in 360 min, Fraktionsgröße 12 ml. Die Fraktionen wurden mit Orcinol auf den Ribosegehalt getestet (0.1 ml Probe wurde mit 0.1 ml 1% FeCl₃ in 37% HCl und 0.01 ml einer ethanolischen Orcinol-Lösung (100 mg/ml) 10 min bei 95°C inkubiert, diese Lösung mit Wasser auf 1 ml verdünnt und bei 670 nm UV-spektrometrisch vermessen).

Das Ribose-5-thiophosphat konnte in den Fraktionen 17-26 nachgewiesen werden. Die Fraktionen wurden zur Trockne lyophilisiert. Ausbeute ca. 30 mg (als freie Säure) ³¹P-NMR (160 MHz): 44.5 ppm (Ribose-5-thiophosphat)

3.20 Synthese von 5-Thio-PRPP

- 1070 µl Wasser
- 340 µl 300 mM Kaliumhydrogenphosphat pH 7.4
- 100 µl 0.5 M Tris-HCl pH 7.5
- 130 µl 5-Ribosethiophosphat (6 mg gelöst)
- 200 µl 10 mM ATP
- 144 µl 250 mM MgCl₂
- 8 µl PRPP-Synthetase (Sigma, 0.2 U)

Der Ansatz wurde für 3 h bei 37°C inkubiert. Zur Abtrennung von ATP wurde mit einer Spatelspitze Aktivkohle ausgeschüttelt, bis keine UV-Aktivität bei 260 nm nachweisbar war, und die filtrierte Lösung ³¹P-NMR-spektroskopisch untersucht: 4.05 ppm Ribose-5-phosphat, -5.05 ppm (d) und -10.8 ppm (d) Ribose-1-pyrophosphat, 44.2 ppm Ribose-5-thiophosphat (Spur) und 2.54 ppm (anorganisches Phosphat aus dem Puffer).

3.21 Synthese des Ribozyms SWI58

Die RNA SWI58 wurde chemisch über automatisierte Festphasensynthese am DNA/RNA Synthesizer Expedite 8900 (Perkin Elmer) nach Protokollen des Herstellers unter Verwendung der entsprechenden schnell entschützbaaren tertiär-Butylphenoxyacetylgeschützten Phosphoramidite der Firma Prologo im 1 µmol-Maßstab hergestellt. Nach der ammoniakalischen Entschützung wurde die Festphase abgetrennt, die ammoniakalische Lösung im Vakuum zur Trockne lyophilisiert. Die Abspaltung der Silylschutzgruppen erfolgte mit 250 µl einer Mischung aus Triethylamin, N-Methylpyrrolidon und Triethylamin-Trihydrofluorid (Volumenverhältnis 1.5 : 3 : 2) bei 65°C für 90 min. Nach Zugabe von 25 µl 3 M Natriumacetatlösung pH 5.5 und 1 ml kaltem n-Butanol wurde die RNA gefällt und das resultierende Pellet in Wasser aufgelöst und über HPLC (siehe Linkersynthese) gereinigt (R_t 15.7 min). Elutionsprofil B:

t (min)	0	30	33	38	43
Puffer B (%)	1	40	100	100	1

3.22 Die Hammerheadspaltung des Ribozyms HH76 in Gegenwart von Theophyllin

Das Ribozym HH76 wurde durch T7-Transkription unter Verwendung von α - ^{32}P -CTP hergestellt. Als Matrize diente der DNA-Strang HH76DNA, der zuvor mit den Primern HH40 und HH21 amplifiziert wurde, wobei der Primer HH40 den T7-Promotor enthielt. Die Reinigung erfolgte über 10% PAGE, Elution und Ethanolfällung.

Für die Spaltungsansätze wurden jeweils 3 μl Selektionspuffer, 2.7 μl 250 mM MgCl_2 (im 6. Ansatz 2.7 μl 50 mM MgCl_2), 10 μl HH76 (1.83 pmol/ml), 0 bis 10 μl 10 mM Theophyllinlösung und Wasser ad 30 μl vereint, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend über ein 10 %iges Polyacrylamidgel analysiert. Die Spaltungseffizienzen wurden über Autoradiographie mit dem Phosphorimager Storm 840 (Molecular Dynamics) und der Auswertungssoftware ImageQuant bestimmt.

3.23 Fluoreszenzmessungen

Die Kinetiken der Hammerheadspaltungen wurden durch Fluoreszenzmessungen in einem Fluoreszenzspektrometer (Perkin Elmer LS-50B) ermittelt. Die Induktion der Fluoreszenz erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und die Emission wurde bei 518 nm gemessen.

Für die Messungen (Substratüberschuß) wurden 10 μl Selektionspuffer, 10 μl 250 mM MgCl_2 , entsprechende Mengen der Theophyllin- bzw. Coffeinstammlösungen, 2 μl SWI58 (86 pmol/ μl) und Wasser ad 100 μl gemischt und in eine für Fluoreszenzmessungen geeignete Quarzglasküvette (Hellma, 60 μl ; Strahlengang 3 x 3 mm) überführt. Nach Zugabe von 1 μl SWI13DF (700 pmol/ μl) wurde die zeitliche Veränderung des Emissionssignals 10-30 min lang verfolgt (Spaltbreiten: 5 nm Emission, 15 nm Excitation).

Für die Messungen unter den Bedingungen des Ribozymüberschusses wurden 2.5 µl 1 M Tris HCl pH 7.5, 10 µl 50 mM MgCl₂, entsprechende Mengen der Theophyllin- bzw. Coffeinstammlösungen, 2.5 µl SWI58 (69 pmol/µl) und Wasser ad 50 µl gemischt und in eine Quarzglasküvette (Hellma) überführt. Nach Zugabe von 1 µl SWI13DF (57 pmol/µl) wurde die zeitliche Veränderung des Emissionssignals 5 min lang aufgezeichnet (Spaltbreiten: 10 nm Emission, 15 nm Excitation).