

Protein-Nucleinsäure-Interaktionen

RNA-Protein-Interaktionen

◆ RNA-Interferenz (RNAi) ist ein konservierter Mechanismus zum Abbau langkettiger RNAs, welcher mit Virusresistenz, der Bildung von Heterochromatin und entwicklungsbiologischen Steuerungsprozessen assoziiert ist. Da dieser Mechanismus sich zum gezielten Abbau von spezifischen mRNA-Sequenzen eignet, ist die Anwendung von RNAi bald nach ihrer Entdeckung zur Standardmethode der „reversen Genetik“ in Entwicklungsbiologie und Molekularbiologie avanciert.

Die RNAi-Antwort wird durch doppelsträngige RNA hervorgerufen, deren Einführung in die Zelle den spezifischen Abbau aller RNAs derselben Sequenz in kleine Fragmente, die siRNAs, bewirkt. Diese „small interfering“ RNAs sind 19- bis 23-mer-Duplexe mit zwei Nucleotide langen Überhängen an beiden 3'-Enden. Während in einigen Organismen doppelsträngige RNA größerer Länge zur Programmierung der RNAi-Antwort dienen kann, induziert deren Verwendung in Säugerzellen einen interferongekoppelten, nichtspezifischen Abbau von RNA.

Ein Befund von extremer Wichtigkeit war daher, dass 21-mer-Duplex-RNAs sich für die RNA-Interferenz in Säugerzellen eignen, ohne diese Interferonantwort zu provozieren. Diese Erkenntnis hat die Bedeutung von RNAi in Molekularbiologie, Biotechnologie und zuletzt auch in der Medizin noch einmal erheblich gesteigert. Eine erfolgreiche Anwendung von RNAi im Tiermodell wurde kürzlich beschrieben.¹⁾ RNAi hat somit in kürzester Zeit andere anti-mRNA-Strategien zur manipulativen Genregulation überflügelt.

Für alle Anwendungen von siRNA gilt es, wichtige Eigenschaften zu optimieren. Kritisch dabei sind die optimale Sequenz, die optimale Länge, das Design der 3'-überhängenden

Nucleotide sowie erlaubte chemische Modifikationen, um die Lebensdauer der RNAi in vivo zu erhöhen. Widersprüchliche Daten zur chemisch optimalen Gestaltung rühren vermutlich von gegenläufigen Einflüssen verschiedener beteiligter molekularer Partner her.

Die Strukturbilogie von Proteinen, die mit siRNAs wechselwirken, liefert wichtige Beiträge zum Verständnis dieser Einflüsse. Mehrere hochinteressante Arbeiten illustrieren, wie Proteine die mit der molekularen Erkennung von siRNA verbundenen Anforderungen erfüllen.

Zwei konkurrierende Publikationen aus dem Jahr 2003^{2,3)} beschreiben Kristallstrukturen des viralen Proteins p19, welches typische siRNA sequenzunspezifisch bindet. Das homodimere Protein bindet einen 21-mer(19bp)-siRNA-Duplex mit einem zwei Nucleotide langen 3'-Überhang. Der Großteil der Bindungsfläche zur RNA besteht aus ei-

ner sattelartigen β -Faltblattstruktur, welche dort, wo sie mit der großen Furche der RNA wechselwirkt, elektrostatisch positiv geladen ist. Zwei symmetrische α -Helices, welche über tertiäre Wechselwirkungen mit den β -Faltblättern des Kerns verankert sind, ragen aus diesem hervor und funktionieren als „Leseköpfe“, um die Länge der gebundenen Nucleinsäure zu kontrollieren. Dabei binden die aromatischen Seitenketten von jeweils zwei Tryptophanresten wie ein weiteres Basenpaar durch π -Stacking auf dem letzten Basenpaar der RNA-Helix (Abbildung 1). Das Protein als Ganzes wirkt somit als molekulares Lineal; die Flexibilität der Verbindungssegmente zu den Leseköpfen ermöglicht die Bindung von RNA-Duplexen mit Längen von 19 bis 21 Basenpaaren. Isequenzielle DNA-Duplexe werden nicht gebunden. Die 3'-überhängenden Nucleotide sind in der Elektronendichtekarte nicht zu erkennen,²⁾ was



Abb. 1.
Struktur des p19-Homodimer-siRNA-Komplexes. Die π -Stacking-Wechselwirkungen zwischen den Tryptophanresten des Proteins und den abschließenden Basenpaaren der Helix sind hervorgehoben.

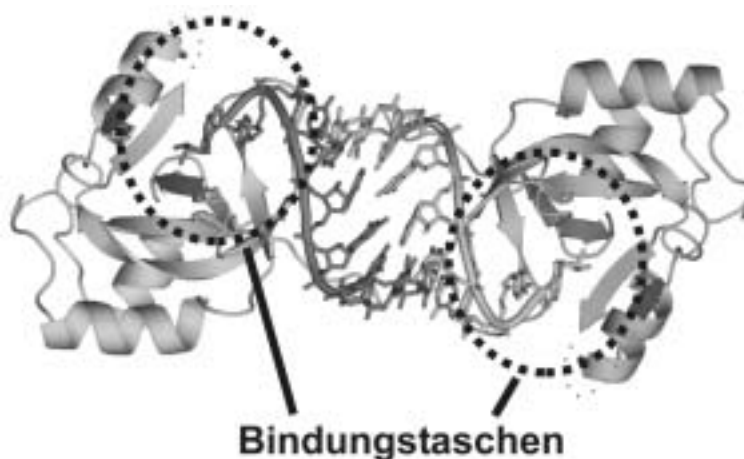
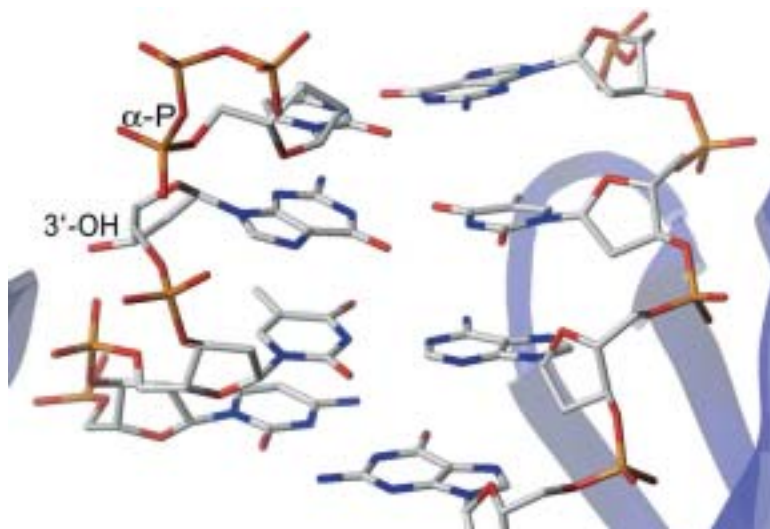


Abb. 2
Struktur des PAZ-RNA-Komplexes. Die Bindungstaschen des Proteins für die zwei überhängenden Nucleotide des 3'-Endes der RNA sind hervorgehoben.

Abb. 3.

Dpo4-DNA-Polymerase mit einer G-T-Fehlpaarung am Primer-Terminus. Die Fehlpaarung führt dazu, dass das 3'-OH-Ende des Primerstranges eine ungünstige Konformation für den nucleophilen Angriff auf die α -Phosphatgruppe des eintretenden Triphosphats einnimmt.



darauf hindeutet, dass sie als charakteristische Eigenschaft von siRNAs nicht vom p19-Protein erkannt werden. Damit übereinstimmend zeigen In-vitro-Experimente, dass p19 auch RNA-Duplexe ohne 3'-Überhang bindet.

Die „PAZ-Domäne“ ist ein wichtiges RNA-bindendes Proteinmodul, welches u. a. in den Schlüsselkomponenten der molekularen RNAi-Maschinerie wie „Dicer“ und „Argonaute“ vorkommt. Die PAZ-Domäne ist in ihren Bindungseigenschaften komplementär zum p19-Protein. Als wichtiges RNA-bindendes Modul im molekularen Mechanismus von RNAi wurde die Struktur einer RNA-freien PAZ-Domäne als Teil von Argonaute aufgeklärt.⁴⁾ Die mit einer Auflösung von 2,6 Å bestimmte Kristallstruktur von PAZ, komplexiert mit dem Homoduplex einer 9-mer-RNA, welcher die siRNA-typischen 3'-Überhänge von zwei Nucleotiden Länge aufweist,⁵⁾ zeigt eine neuartige spezielle Bindungstasche (Abbildung 2), deren molekulare Erkennung der beiden Nucleotide des 3'-Überhangs die Affinität des Proteins für die siRNA um mehr als drei Größenordnungen verbessert. Die Sequenz des Überhangs hat vernachlässigbaren Einfluß auf die Bindungskonstante, was sich mit der Abwesenheit von Wasserstoffbrücken zwischen Protein und der Watson-Crick- oder der Hoogsteen-Kante der 3'-überhängenden Basen er-

klären lässt. Die beiden 3'-Nucleotide werden vielmehr über Wasserstoffbrücken zu den Phosphatresten und den 2'-OH-Gruppen sowie durch das π -Stacking der aromatischen Seitenkette eines Phenylalans auf die Base des 3'-terminalen Uridins erkannt. Damit kompatibel ist der experimentelle Befund einer um zwei Größenordnungen verschlechterten Bindungskonstanten einer Nucleinsäure mit zwei Desoxythymidinen im 3'-Überhang. Die Bindungstasche ist groß genug, um eine 2'-O-Methylgruppe zu tolerieren, diskriminiert jedoch deutlich

gegen größere Modifikationen wie Propandiol, Fluorescein oder Puro-mycin am 3'-Ende.

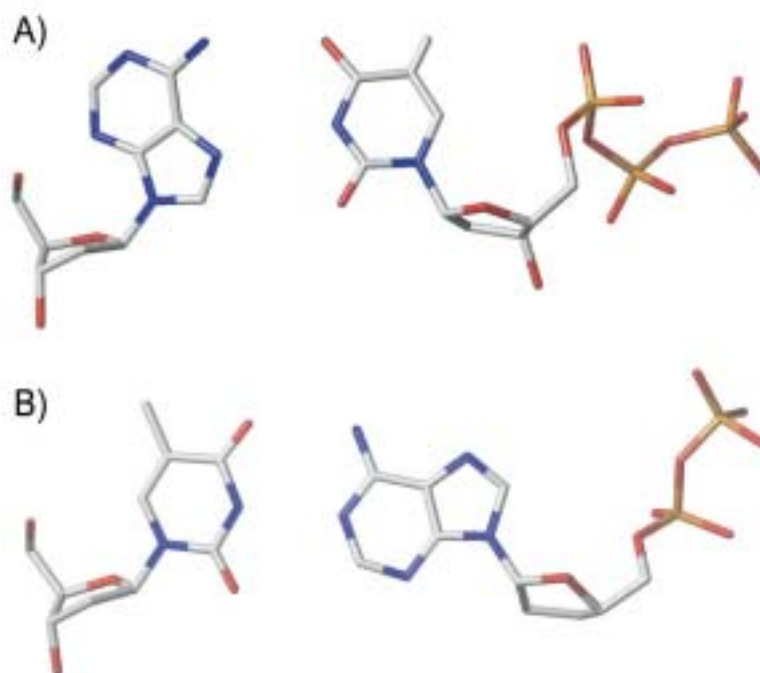
Insgesamt illustrieren diese beiden Beispiele komplementäre Erkennungsstrategien typischer Eigenschaften von siRNAs durch zwei sehr unterschiedliche Proteine. P19 erkennt das 5'-Ende, jedoch nicht das 3'-Ende und kann die Länge der RNA-Duplexe diskriminieren, während PAZ nur das überhängende 3'-Ende erkennt und das 5'-Ende sowie die Länge der RNA im Wesentlichen ignoriert. Gemäß dem universellen Mechanismus von RNAi zeigt keines der Proteine sequenzspezifische Bindung.

Protein-DNA-Interaktionen

◆ Die gesamte biologische DNA-Synthese in der DNA-Reparatur, -Rekombination und -Replikation hängt von der Fähigkeit der DNA-Polymerasen ab, das Templat richtig zu erkennen und komplementäre Nucleotide selektiv zu inkorporieren. Dabei paart immer ein Guanin mit einem Cytosin und ein Adenin mit einem Thymin. Hoch selektive DNA-Polymerasen weichen von dieser Regel nur ungefähr einmal pro 100 000 bis 1 000 000 synthetisierte Phosphorsäurediester-Bindungen ab.

Abb. 4.

A) In humaner DNA-Polymerase γ (hPol γ) paart ein codierendes Adenin über eine syn-Konformation mit einem eintretenden Thymin. Ein codierendes Thyminidn geht allerdings den „normalen“ Paarungsmodus mit einem eintretenden Adenin ein (siehe B) aus einer Struktur der zur hPol γ homologen Dpo4-DNA-Polymerase).



Gemäß einem aktuellen Modell beruht diese Selektivität auf der Auswahl des Nucleobasenpaars anhand der richtigen Größe und Geometrie. Dieses Modell stützen Kristallstrukturanalysen von DNA-Polymerasen, welche die Bildung von Nucleotid-Bindungstaschen vermuten lassen, die ausschließlich nach Watson-Crick gepaarte Nucleotide akzeptieren.

Wie kommt es jedoch zu Fehlern während der enzymatischen DNA-Synthese? Bis erste Kristallstrukturen von DNA-Polymerasen mit fehlgepaarten DNA-Substraten vorlagen, war dieses Problem auf molekularer Ebene nur wenig verstanden. Beese und Mitarbeiter fanden, dass einzelne Fehlpaarungen, die sich im doppelsträngigen DNA-Substrat befinden, zu signifikanten Konformationsänderungen im Enzym-Substrat-Komplex führen, z. B. der Verlängerung des Templatstranges, Störung der Templat- und Primerstränge und Verdrängung der DNA vom katalytischen Zentrum.⁶⁾ Überraschend war, dass sogar dann starke Konformationsänderungen im katalytischen Zentrum auftraten, wenn sich einzelne Fehlpaarungen bis zu vier Nucleotide-Paare entfernt vom katalytischen Zentrum befanden. Aufgrund der durch Fehlpaarungen hervorgerufenen Störungen werden wenig produktive Komplexe gebildet. Dies

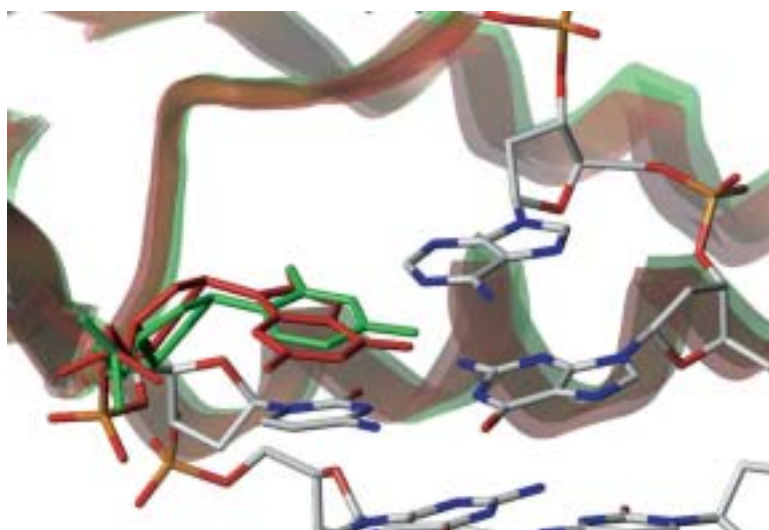


Abb. 5.
Bindung von 8oxoG (rot) im Vergleich zu kanonischem Thyminidin (grün) in einer selektiven DNA-Polymerase.

setzt die Effizienz des Einbaus im Vergleich zu kanonisch gepaarten DNA-Substraten herab und erhöht so die Genauigkeit der DNA-Polymerasen.

Ähnliches gilt für Dpo4, eine DNA-Polymerase der Y-Familie von *Solifolobus solfataricus*.⁷⁾ Dieses Enzym verlängert Guanin-Thymin-Fehlpaarungen am Primerende mit überraschend geringer Effizienz im Vergleich zu kanonischen Adenin-Thymin-Primerenden. Eine Kristallstrukturanalyse zeigte, dass das Protein eine „Reverse-wobble“-Paarung zwischen Guanin und Thymin stabilisiert, was dazu führt, dass die 3'-OH-Gruppe am Primerende vom

eintretenden Nucleosid-Triphosphat weg zeigt (Abbildung 3).

In jüngster Zeit wurde eine Vielzahl neuer humaner DNA-Polymerasen entdeckt. Es sind mittlerweile über ein Dutzend humane DNA-Polymerasen bekannt, die erstaunliche und zunächst unerwartete Eigenschaften aufweisen, wie zum Teil hohe Fehlerraten und die Fähigkeit, auch geschädigte DNA-Stränge zu kopieren.

Ein herausragendes Beispiel für eine DNA-Polymerase mit hohen Fehlerraten ist die humane DNA-Polymerase ϵ (hPol ϵ). Erstaunlicherweise folgt der von hPol ϵ katalysierte Einbau eines Nucleotids gegenüber

Thymin im Templatstrang nicht der Watson-Crick-Basenpaarung. hPol γ baut Guanin gegenüber Thymin im Templatstrang effizienter ein als Adenin. Eine weitere interessante Eigenschaft dieses Enzyms ist die Neigung, das korrekte Nucleotid gegenüber Adenin im Templatstrang mit bis zu mehr als tausendfach höherer Effizienz im Vergleich zum korrekten Nucleotid gegenüber Thymin im Templatstrang einzubauen. Einblicke in die strukturellen Ursachen dieser Phänomene gab eine Kristallstrukturanalyse von hPol γ im ternären Komplex mit dem DNA-Substrat und dem eintretenden Nucleotid.⁸⁾ Die Struktur zeigt, dass ein codierendes Adenin über eine *syn*-Konformation mit einem eintretenden Thymin über einen Modus, der als Hoogsteen-Paarung bezeichnet wird, paart (Abbildung 4). Dies ist das erste Beispiel für ein solches Paarungsverhalten bei unmodifizierten Nucleotiden im aktiven Zentrum. Das Enzym scheint diese Konformation zu stabilisieren und somit auf Hoogsteen-Paarung spezialisiert zu sein. Dieses Verhalten bildet die Basis für die unterschiedlichen Selektivitäten und Effizienzen bei der Nucleotid-Inkorporation. Gegenüber Adenin in der *syn*-Konformation im codierenden Strang kann nur ein Thymin über zwei Wasserstoffbrückenbindungen paaren und den sterischen Ansprüchen des aktiven Zentrums genügen. Da Thymin keine Hoogsteen-Seite aufweist, existieren jedoch gegenüber Thymin in der *syn*-Konformation im codierenden Strang nur wenige Möglichkeiten zur Bildung von Wasserstoffbrücken mit einem eintretenden Nucleotid. Dies könnte die Ursache für die erhöhte Fehlerneigung und geringere Synthese-Effizienz in diesem Fall sein.

Das Erbgut unterliegt ständig Einflüssen, die es in einer Weise schädigen können, dass erhöhte Mutationsraten auftreten. So entstehen bei der Atmung reaktive Sauerstoffspezies, die Guaninreste schädigen können und zur Entstehung von 8-Oxoguanin (8oxoG) führen. 8oxoG ist die häufigste im Genom auftretende Schädigung. Sie führt

durch enzymatischen Einbau von einem Adenin gegenüber 8oxoG zu einem Anstieg von Guanin-zu-Thymin-Transversions-Mutationen.

Kürzlich gelang es, Kristallstrukturen von hochselektiven DNA-Polymerasen zu erhalten, die eine korrekte Replikation von 8oxoG (Einbau eines Cytosins) und eine mutagene Replikation von 8oxoG (Einbau eines Adenins) aufweisen.^{9,10)} Es zeigte sich eine Umkehr der Mechanismen, mit denen DNA-Polymerasen sonst Fehler während der Synthese von DNA vermeiden. Der Komplex 8oxoG-Adenin verhält sich wie ein richtiges Nucleobasenpaar, während 8oxoG-Cytosin sich wie ein fehlerhaftes Nucleobasenpaar verhält (Abbildung 5). Diese Beobachtungen könnten die Ausgangsbasis für Erklärungen der erhöhten Fehlerraten bei der Replikation entlang von 8oxoG-Einheiten sein.

Andres Jäschke, Mark Helm
Institut für Pharmazie und
Molekulare Biotechnologie
Universität Heidelberg

jaeschke@uni-hd.de
mark.helm@urz.uni-heidelberg.de
Andreas Marx, Michael Strerath
Fachbereich Chemie
Universität Konstanz
Andreas.Marx@uni-konstanz.de
Michael.Strerath@web.de

- 1) J. Soutschek et al., Nature 2004, 432, 173–178.
- 2) K. Ye, L. Malinina, D. J. Patel, Nature 2003, 426, 874–878.
- 3) J. M. Vargason et al., Cell 2003, 115, 799–811.
- 4) J. J. Song et al., Science 2004, 305, 1434–1437.
- 5) J. B. Ma, K. Ye, D. J. Patel, Nature 2004, 429, 318–322.
- 6) S. J. Johnson, L. S. Beese, Cell 2004, 116, 803–816.
- 7) J. Trincão, R. E. Johnson, W. T. Wolfe, C. R. Escalante, S. Prakash, L. Prakash, A. K. Aggarwal, Nature Struct. Mol. Biol. 2004, 11, 457–462.
- 8) D. T. Nair, R. E. Johnson, S. Prakash, L. Prakash, A. K. Aggarwal, Nature 2004, 430, 377–380.
- 9) G. W. Hsu, M. Ober, T. Carell, L. S. Beese, Nature 2004, 431, 217–221.
- 10) L. G. Brieva, B. F. Eichmann, R. J. Kokosak, S. Doublié, T. A. Kunkel, T. Ellenberger, EMBO J. 2004, 23, 3452–3461.



Andres Jäschke (Jahrgang 1962) studierte Chemie an der Humboldt-Universität zu Berlin, wo er 1993 bei Dieter Cech promovierte. Nach einem Postdocaufenthalt am MIT (Alexander Rich) habilitierte er sich im Jahre 2000 an der Freien Universität Berlin. Seit 2002 ist er C4-Professor für Pharmazeutische Chemie an der Universität Heidelberg. Sein Forschungsinteresse gilt den katalytischen und regulatorischen Eigenschaften von Nucleinsäuren.



Mark Helm (Jahrgang 1969) studierte Chemie in Würzburg und promovierte 1999 in Molekularbiologie an der Université Louis Pasteur in Strasbourg. Nach einem Postdocaufenthalt am Caltech wechselte er 2001 an die FU Berlin. Seit 2002 ist er am Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie der Universität Heidelberg, wo er in der Abteilung Chemie eine Forschungsgruppe leitet, deren Schwerpunkt auf dynamischen Vorgängen in Nucleinsäuren liegt.



Andreas Marx (Jahrgang 1968) promovierte 1997 bei Bernd Giese in Basel und war von 1997 bis 1999 Postdoktorand bei Hisashi Yamamoto in Nagoya. 2003 habilitierte er sich an der Universität Bonn im Umfeld von Michael Famulok in Organischer Chemie und Biochemie. Seit 2004 hat er eine Professur für Organische Chemie/Zelluläre Chemie am Fachbereich Chemie der Universität Konstanz inne. Sein Forschungsgebiet ist die chemische Biologie von Nucleinsäuren.



Michael Strerath (Jahrgang 1974) studierte Chemie an der Universität Düsseldorf und fertigte im Jahr 2001 bei Stefan Kubik seine Diplomarbeit an. 2001 wechselte er an die Universität Bonn, wo er im Arbeitskreis von Andreas Marx mit seiner Doktorarbeit begann. Darin beschäftigt sich mit chemischen und genetischen Ansätzen zur Entwicklung von Methoden für die Genomanalyse. Anfang 2004 folgte er Andreas Marx an die Universität Konstanz.