

Funktionale Nukleinsäuren

◆ Funktionale Nukleinsäuren spielen zunächst eine zentrale Rolle in biologischen Prozessen rund um Replikation, Transkription sowie Translation und werden auch als Therapeutika studiert. Neben diesen originär biologischen Funktionen gewinnt zunehmend die synthetische Funktionalisierung der Nukleinsäuren, also die Modifizierung mit reaktiven Gruppen oder Sonden, das Interesse der Forscher. Chemische Modifizierungen verleihen RNA wie DNA potenziell neue oder bioanalytisch lesbare Eigenschaften und erlauben es den Forschern, biologische Prozesse detaillierter zu studieren oder chemische Prozesse wie die Katalyse mit Nukleinsäuren neu zu entwickeln.

RNA-Faltung mit biogenen Aminen

◆ Besonderes Augenmerk bei funktioneller RNA verdienen Faltungsgleichgewichte und Ligandbindungsstellen (Aptamere). Biogene Polyamine sind wichtig für die Struktur, Dynamik und Funktion: Ihre mehrfachen, miteinander ver-

bundenen positiven Ladungen agieren wie ein flexibler Klebstoff, der die intramolekulare Abstoßung von Phosphaten im RNA-Rückgrat durch Abschirmung mindert. Typischerweise gehen Polyamine dabei jedoch kaum längerfristige räumlich definierte Bindungen ein, wie sie etwa von Aminoglycosiden bekannt sind. Besonders interessant sind Polyamine aus hyperthermophilen Organismen, die in der Nähe des Siedepunkts von Wasser leben. Ihnen wird ein wesentlicher Anteil daran zugeschrieben, dass Nukleinsäurestrukturen bei diesen Temperaturen offensichtlich in der lebenden Zelle nicht dehybridisieren. Eine vergleichende Untersuchung der Wirkung der beiden isomeren Pentamine Taa und Cdp (Abbildung 1) auf eine tRNA-Struktur zeigte eine thermische Stabilisierung von bis zu 20 K bereits bei mikromolaren Konzentrationen an Polyaminen.¹⁾ Dabei stabilisiert das quaternäre Taa die tRNA-Struktur deutlich stärker als sein lineares Isomer. Begleitende enzymkinetische Untersuchungen und Experimente mit Struktursonden ergaben Hinweise, dass die Bindung von Taa an RNA im Vergleich zum Cdp strukturspezifischer ist. Dies lässt sich auf die kompaktere Struktur und die permanente positive La-

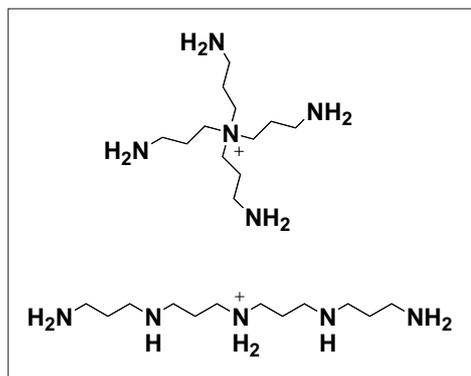


Abb. 1. Zwei biogene isomere Polyamine aus thermophilen Archaea: Tetrakis(3-aminopropyl)-ammonium (Taa, oben) und Caldopentamin (Cdp, unten).²⁾

dung des quaternären Stickstoffs zurückzuführen. Die Ergebnisse bringen neue Impulse in die Entwicklung von Polykationen, deren Wechselwirkung mit Nukleinsäuren, wie sie z. B. in polykationischen Transfektionsagentien gegeben sind, bisher typischerweise als unspezifisch galten.

RNA-Strukturcharakterisierung mit NMR-Spektroskopie

◆ Für die Charakterisierung der dynamischen Struktur funktioneller RNA ist die NMR-Spektroskopie besonders gut geeignet, da RNA-Stränge oft mehrere Konformationen gleichzeitig aufweisen. Die struktu-

rellen Wechsel zwischen alternativen Konformationen stehen im Zentrum der biochemischen Mechanismen der Riboschalter und RNA-Thermometer. Ein grundlegendes Anliegen ist es herauszufinden, wie aussagekräftig In-vitro-Experimente zur Strukturaufklärung von RNA in Bezug auf die Frage sind, ob die Ergebnisse auf die zelluläre Umgebung übertragbar sind. Tatsächlich könnten strukturelle Wechsel, die durch Ligandbindung in Riboschaltern ausgelöst werden, in der Zelle durch Ionen und Polyamine, wie eben beschrieben, aber auch durch RNA-Chaperon-Proteine und Ähnliches beeinflusst werden. Die Arbeitsgruppen Dötsch und Schwalbe zeigten, dass RNA in lebenden *Xenopus-laevis*-Eimutterzellen durch In-Cell-NMR studiert werden können, und dass bereits geringe Einflüsse die Stabilität der RNA verändern.²⁾ Die NMR-Spektroskopie scheint daher zur idealen nichtinvasiven Technik zu werden, um funktionell wichtige Strukturänderungen der RNA nicht nur in vitro sondern auch in vivo zu untersuchen.

Aptamere

◆ Aptamere sind einzelsträngige Nukleinsäuren, die aufgrund ihrer 3D-Struktur mit hoher Affinität und Spezifität an Zielmoleküle binden. Aptamere lassen sich durch einen als SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) bezeichneten Prozess in vitro gewinnen. Ihre geringe Immunogenität, ihre postselektive Modifizierbarkeit und die damit verbundene Adaptation an definierte Applikationen, verhelfen Aptameren zu einer immer wichtigeren Rolle bei der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien.³⁾ Ihr Einsatz als molekulare Transporter zum Ansteuern malignen Zellen ist ein Gebiet, das sich dementsprechend rasch entwickelt. Die Arbeitsgruppen Mayer und Famulok etablierten eine neue Selektionsstrategie, mit der sich Aptamere isolieren lassen, die Tumorzellen selektiv binden. Hierzu implementierten sie die Fluorescence-activated-cell-sorting(FACS)-Technik in den Selektionsprozess. Dies ermöglicht die Adressierung definierter Zell-

Subpopulationen in komplexen Zellgemischen durch In-vitro-Selektion.⁴⁾ Das FACS-SELEX-Verfahren erlaubt es zudem, gleichzeitig ungewünschte Zellsubpopulationen während des Selektionsprozesses zu eliminieren und zellspezifische Aptamere effizient anzureichern.

Neben den genannten Anwendungen wurde kürzlich ein weiteres Einsatzgebiet von Aptameren als Antidot erschlossen. Die Arbeitsgruppe Mayer entwickelte ein Aptamer, welches das Medikament Xigris (rekombinant hergestelltes Activated Protein C (APC)) bindet.⁵⁾ Xigris wird wegen seiner zellschützenden und entzündungshemmenden Wirkung zur Behandlung der schweren Sepsis eingesetzt. Aufgrund seiner antikoagulatorischen Wirkung kann es aber vereinzelt bei Patienten massive Blutungen verursachen. Diese Nebenwirkung blockiert das Aptamer selektiv, alle anderen Funktionen des Medikaments bleiben erhalten (Abbildung 2). In Anbetracht der steigenden Zahl makromolekularer Therapeutika sind Aptamere als Antidot eine vielversprechende neue Applikation.

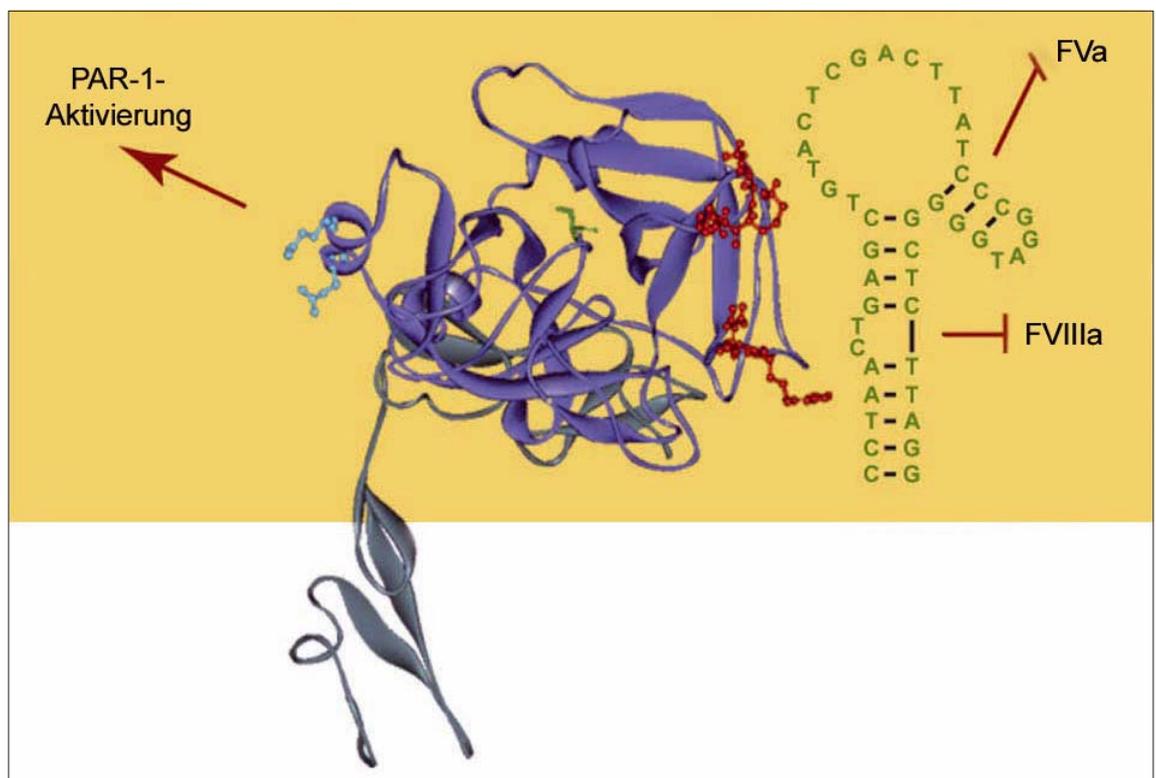


Abb. 2. Das Aptamer (in grün dargestellt) bindet an aktiviertes Protein C (APC, blau) und inhibiert die Inaktivierung der Blutgerinnungsfaktoren Faktor Va und Faktor VIIIa (die antikoagulatorische Funktion von APC), jedoch nicht die Aktivierung des PAR-1 Rezeptors (Proteinase activated receptor 1) auf Endothelzellen (die zytoprotektive Funktion von APC).⁵⁾

Ribozyme

◆ Der Mechanismus der ribosomalen Katalyse ist biologisch von grundlegendem Interesse. Die Aufklärung der Kristallstruktur des Ribosoms hat das Verständnis der Proteinbiosynthese revolutioniert.⁽⁶⁻⁸⁾ Da ribosomale RNA die konstitutionelle Grundlage für die beiden fundamentalen Prozesse der Decodierung und der Peptidbindungsknüpfung darstellt, wurde der Satz „Das Ribosom ist ein Ribozym“ geprägt. Durch Herstellung von funktionellen, positionsspezifisch modifizierten Ribosomen gelang es, die entscheidende funktionelle Gruppe der 23S-rRNA im Peptidyltransferasezentrum zu identifizieren und ihre Funktion mit einem experimentell fundierten Modell zu erklären (Abbildung 3).⁹⁾ Demnach bildet sich eine Wasserstoffbrücke von der 2'-OH-Gruppe des ribosomalen Adenosins an der Position 2451 zur 2'-OH-Gruppe des terminalen Adenosins der tRNA (A76) in der P-Stelle des Ribosoms. Dies hat zweierlei Konsequenzen: Zum einen wird die A76-Riboseeinheit in der C2'-endo-Konformation fixiert; dies ist eine räumliche Notwendigkeit für den effizienten Protonentransfer (der zum Kollaps des tetraedrischen Oxyanion-Intermediats und folglich zum Amidprodukt führt). Zum anderen wird die intramolekulare Peptidyltransesterifizierung von der 3'-O- zur 2'-O-Position der A76-Riboseeinheit unterbunden. Letztere Verknüpfung ist mit einem effizienten Protonentransfer räumlich unvereinbar.

Die Translation kleiner Peptide am Ribosom kann dieses resistent gegen Macrolidantibiotika machen. Zur Aufklärung dieses Phänomens sind stabile RNA-Peptid-Konjugate, die Peptidyl-tRNA imitieren, wünschenswert, besonders für die strukturbiochemische Untersuchung von Ribosomen. Eine neue flexible Festphasensynthesestrategie macht diese Konjugate in effizienter Weise zugänglich, ohne Beschränkungen bezüglich der RNA- und Peptidsequenz.¹⁰⁾

Neben biologisch wichtigen Reaktionen wie der Peptidbiosynthese werden auch künstliche Ribozyme, z. B. als Katalysator für die Diels-Alder-Reaktion, besser verstanden. Die Arbeitskreise Schwalbe und Jäschke berichteten über stationäre und zeit aufgelöste NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung der strukturellen Änderungen des Diels-Alder-Ribozyms, die von Liganden induziert wird.¹¹⁾ Auffallend war, dass die effizientesten RNA-Katalysatoren im Apozustand konformationell homogen waren, während eine geringfügig weniger aktive Punktmutante unterschiedliche Grundzustandsstrukturen bevölkert, zwischen denen hohe Barrieren liegen. Die Ergebnisse von Manoharan et al. legen nahe, dass die schnelle Faltung in die katalytisch aktive Konformation ein wichtiges evolutionäres Kriterium ist, nach dem im SELEX-Prozess selektioniert wird.

Hybridkatalyse

◆ In der Hybridkatalyse dienen Biomoleküle (Proteine oder Nukleinsäuren) als chirale Gerüste in übergangsmetallkatalysierten Reaktionen, um die (Stereo-)Selektivität der katalysierten Reaktionen zu beeinflussen.¹²⁾ Die Aufgabe ist schwierig: Diese Katalysatoren müssen bei Raumtemperatur, niedriger Katalysatorkonzentration, in wässriger Lösung sowie in Gegenwart der vielen funktionellen Gruppen des Biopolymers aktiv sein. Im letzten Jahr wurden mehrere neue Beispiele solcher Hybridkatalysatoren auf der Basis von Nukleinsäure-¹³⁾ oder Peptidgerüsten¹⁴⁾ publiziert, nämlich für kupferkatalysierte Friedel-Crafts-Alkylierungen und Diels-Alder-Reaktionen. Ein originelles katalytisches System unter Verwendung von Iridium(I)-Dien-Komplexen entwickelte die

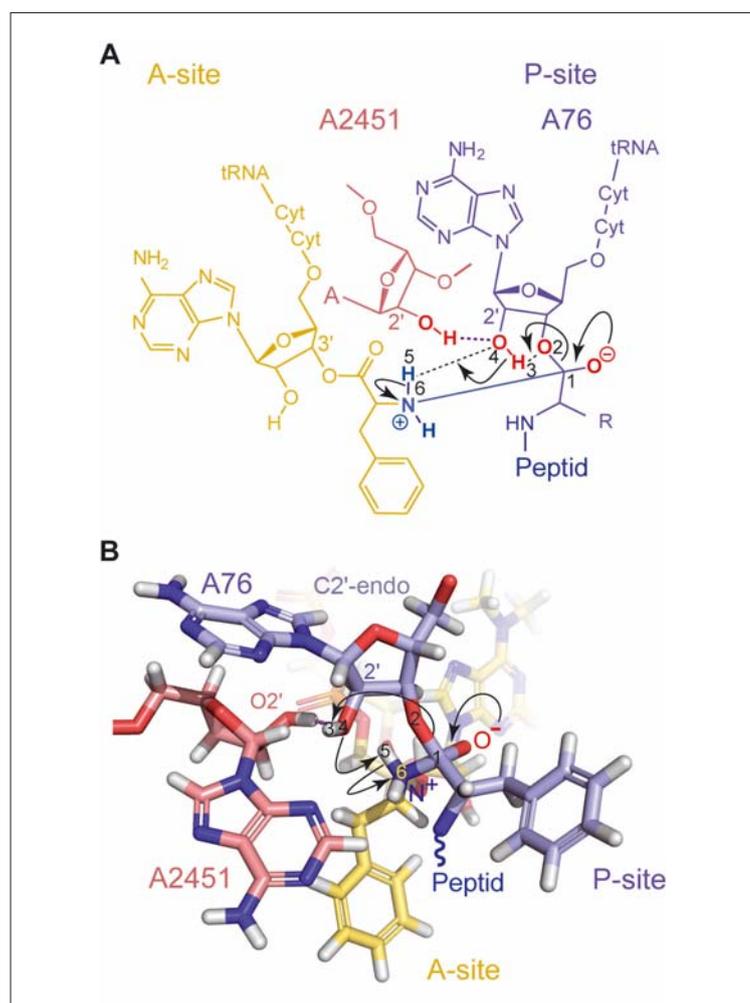


Abb. 3. Mechanismus der ribosomalen Peptidsynthese.⁹⁾

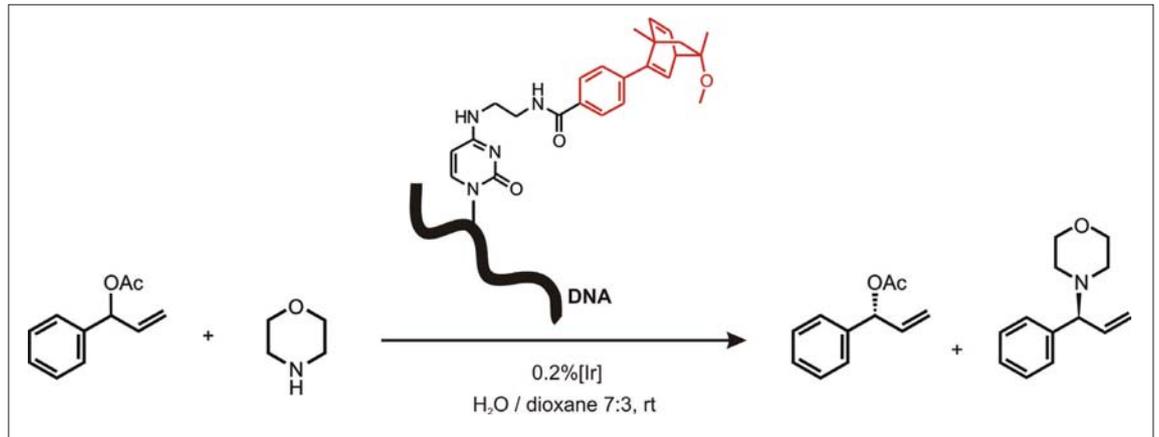


Abb. 4. DNA-Ir(I)-katalysierte allyliche Aminierung zur Racematspaltung im Wässrigen.¹⁵⁾

Arbeitsgruppe Jäschke (Abbildung 4):¹⁵⁾ Um Iridiumionen ortsspezifisch an DNA zu positionieren, wurden Dienliganden derivatisiert, kovalent an Oligonukleotide gekoppelt, und anschließend die Metallkomplexe gebildet. Diese Hybridkatalysatoren zeigten hohe Aktivität in der Ir(I)-katalysierten allylichen Aminierung im Wässrigen. Zudem

waren sie mit bis zu 4600 Turnovers außergewöhnlich robust. Die DNA-basierten Katalysatoren wirkten in der kinetischen Racematspaltung von allylichen Acetaten stereoselektiv; die Stereoselektivität ließ sich durch Veränderung des Komplementärstrangs, der mit dem dientragenden Oligonukleotid hybridisiert war, einstellen. Dem-

zufolge beeinflusst die Struktur der Nucleinsäure das stereochemische Resultat der Reaktion. Dies ist die erste Anwendung der DNA-Hybridkatalyse in der metallorganischen Chemie sowie die erste Verwendung der Ir(I)-Dien-Chemie in Kombination mit Biomolekülen. Die nächste Aufgabe wird die Entwicklung von Selektionstechniken für Hybridkatalysatoren aus kombinatorischen Nucleinsäurebibliotheken sein, um höhere Aktivitäten und Selektivitäten zu erzielen.

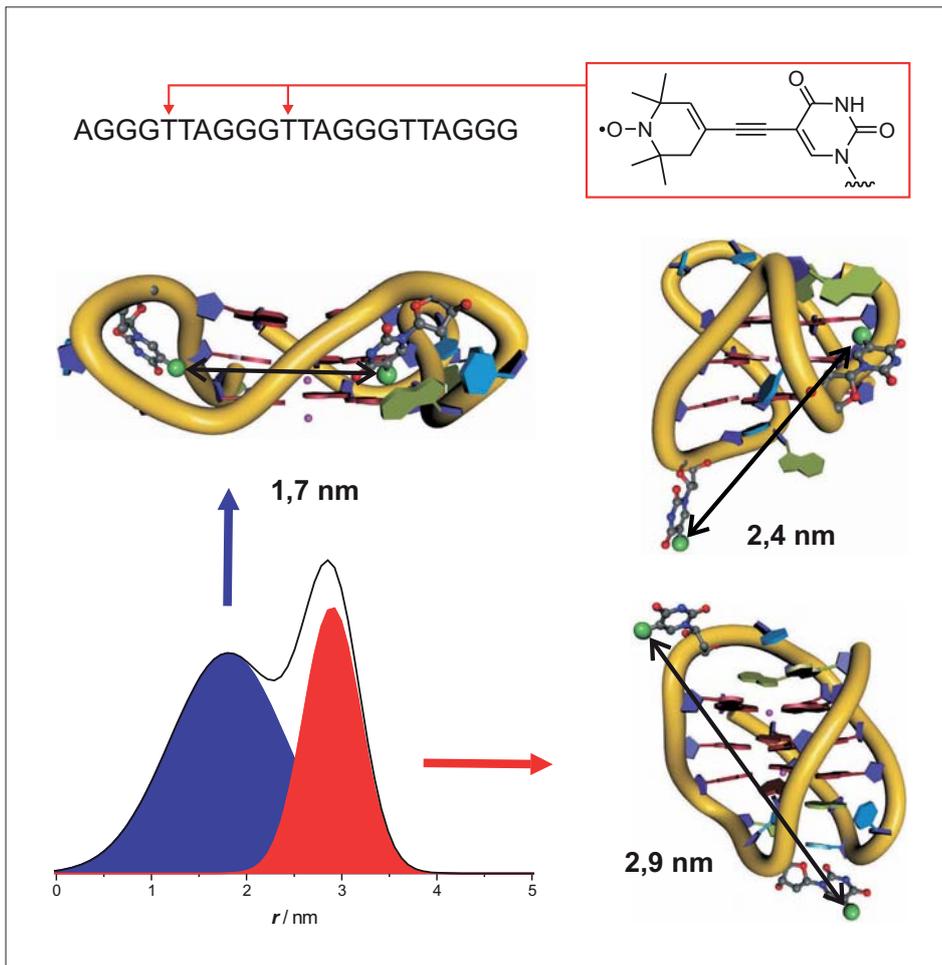


Abb. 5. Doppelt spinmarkierte Quadruplex-DNA.¹⁹⁾

G-Quadruplex-Strukturen

◆ Unter der funktionalen DNA erhielten insbesondere G-Quadruplex-Strukturen in jüngster Zeit viel Aufmerksamkeit, denn sie scheinen an der Regulation genetischer Mechanismen beteiligt zu sein [s. auch Trendbericht Organische Chemie, S. 287]. Niedermolekulare Verbindungen, die an den Chromosomenenden (den Telomeren) Quadruplexe induzieren, wirken gegen Tumoren. Vor diesem Hintergrund erscheint die Aufklärung der Struktur der repetitiven, guanosenreichen Telomere vielversprechend. Allerdings können Quadruplexe, im Gegensatz zu Duplexstrukturen, in vielfältigen Konformationen existieren, die sich durch die Orientierung der Stränge sowie deren Verknüpfung unterscheiden.^{16,17)} Die von der Telomerasequenz unter physiologischen Bedingungen eingenommenen Strukturen (Abbildung 5) werden kontrovers diskutiert. So liegt ein Gleichge-

wicht zweier Konformationen (eine antiparallele und eine parallele Spezies) vor. Die Analyse solcher Mischungen gestaltet sich mit klassischen Methoden wie etwa der CD-Spektroskopie oder hochaufgelöster Strukturbestimmung schwierig. Auf der anderen Seite eignet sich die EPR-Spektroskopie sehr gut, um Abstandsverteilungen in heterogenen Systemen zu bestimmen.¹⁸⁾ Zu diesem Zweck wurde doppelt spinmarkierte Quadruplex-DNA synthetisiert und untersucht.¹⁹⁾ Die Schleifen der Quadruplexe wurden mit Nitroxiden so modifiziert, dass eine Abstandsmessung eine eindeutige Zuordnung der fraglichen Topologien erlaubte. Die Messungen zeigten eine hohe Flexibilität der Spinmarkierungen in den Schleifen. Dies erschwerte die Auswertung der Elektronenresonanzdaten, da im Gegensatz zu Messungen an Duplexstrukturen breite Abstandsverteilungen analysiert werden müssen.¹⁸⁾ Dennoch gelang es, zwei koexistierende Strukturen zu identifizieren, nämlich eine Korbstruktur mit antiparalleler sowie eine Propellerstruktur mit paralleler Strangorientierung.¹⁹⁾

Koordiniert von Hans-Achim Wagenknecht, Regensburg, mit Beiträgen von: Jörg Hartig, Konstanz Mark Helm, Mainz Andres Jäschke, Heidelberg Günter Mayer, Glasgow Ronald Micura, Innsbruck Harald Schwalbe, Frankfurt

Hans-Achim Wagenknecht, Jahrgang 1968, ist seit dem Jahr 2005 Professor für Organische Chemie an der Universität Regensburg. Er studierte Chemie an der Universität Freiburg und promovierte 1998 bei Wolf-Dietrich Woggon an der Universität Basel. Anschließend war er Postdoc bei Jacqueline K. Barton am California Institute of Technology, Pasadena. Er habilitierte sich im Dezember 2003 bei Horst Kessler an der TU München. Seine Forschungsinteressen gelten der chemischen Biologie im Bereich der präparativen Nucleinsäure- und Peptidchemie zum Aufbau funktionaler Nucleinsäure- und Peptidarchitekturen auf der Basis von Elektronentransfer, Energietransfer und Photokatalyse.



- 8) E. Zimmerman, A. Yonath, *ChemBioChem* 2009, 10, 63.
- 9) K. Lang, M. Erlacher, D.N. Wilson, R. Micura, N. Polacek, *Chem. Biol.* 2008, 15, 485.
- 10) H. Moroder, J. Steger, D. Graber, K. Fauster, K. Trapp, V. Marquez, N. Polacek, D. N. Wilson, R. Micura, *Angew. Chem.* 2009, 121, 4116.
- 11) V. Manoharan, B. Fürtig, A. Jäschke, H. Schwalbe, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 6261.
- 12) J. Steinreiber, T. R. Ward, *Coord. Chem. Rev.* 2008, 252, 751.
- 13) A. J. Boersma, B. L. Feringa, G. Roelfes, *Angew. Chem.* 2009, 121, 3396.
- 14) D. Coquiere, J. Bos, J. Beld, G. Roelfes, *Angew. Chem.* 2009, 121, 5261.
- 15) P. Fournier, R. Fiammengio, A. Jäschke, *Angew. Chem.* 2009, 121, 4490.
- 16) S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, S. Neidle, *Nucl. Acids Res.* 2006, 34, 5402.
- 17) D. J. Patel, A. T. Phan, V. Kuryavyi, *Nucl. Acids Res.* 2007, 35, 7429.
- 18) G. Jeschke, Y. Polyhach, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2007, 9, 1895.
- 19) V. Singh, M. Azarkh, T. E. Exner, J. S. Hartig, M. Drescher, *Angew. Chem.* 2009, 121, 9908–9910.

Literatur

- 1) A. Hayrapetyan, H. Grosjean, M. Helm, *Biol. Chem.* 2009, 390, 851.
- 2) R. Hänsel, S. Foldynova-Trantarkova, F. Löhr, J. Buck, E. Bongartz, E. Bamberg, H. Schwalbe, V. Doetsch, L. Trantirek, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 15761.
- 3) G. Mayer, *Angew. Chem.* 2009, 121, 2710.
- 4) M. S. L. Raddatz, A. Dolf, P. Knolle, E. Endl, M. Famulok, G. Mayer, *Angew. Chem.* 2008, 120, 5268.
- 5) J. Müller, B. Isermann, C. Dücker, M. Salehi, M. Meyer, M. Friedrich, T. Madhusudhan, J. Oldenburg, G. Mayer, B. Pöttsch, *Chem. Biol.* 2009, 16, 442.
- 6) M. Simonovič, T. A. Steitz, *Biochim. Biophys. Acta* 2009, 1789, 612.
- 7) M. T. Schmeing, V. Ramakrishnan, *Nature* 2009, 461, 1234.

Künstliche Enzyme für die Industrie

◆ Die industrielle Biotechnik gewinnt in der chemischen Industrie an Bedeutung, da sie biogene, nachwachsende Rohstoffe in Grund- und Feinchemikalien umwandelt und so hilft, den Anteil petrochemischer Rohstoffe zu reduzieren.¹⁾ Ob in fermentativen Prozessen, die mehrstufige Umwandlungen innerhalb eines Mikroorganismus und damit innerhalb eines Reaktionsschritts erreichen, oder beim Einsatz einzelner isolierter Biokatalysatoren – immer stehen Enzyme und enzymatische Reaktionen im Mittelpunkt. Die bekannten, natürlichen Enzyme genügen oft den Prozessanforderungen oder neu geforderten chemischen Reaktionen nicht. Damit steigt der Bedarf an technischen Enzymen mit neuen Eigenschaften.

Der Bedarf lässt sich durch das Ausschöpfen des natürlichen Reservoirs mit immer effizienteren Methoden zwar teilweise decken, z. B. durch hochparallele Pyrosequenzierung oder durch die Metagenomik. Wichtiger noch ist jedoch die Möglichkeit, Enzyme durch Design zu verändern und so zu neuartigen, künstlichen Enzymen zu gelangen, die einen breiten Einsatz biotechnischer Verfahren in der chemischen Industrie erlauben. Die gerichtete Evolution ist dabei das auch in nächster Zukunft wichtigste Werkzeug im Enzymengineering. Die verschiedensten molekularbiologischen Methoden erzeugen hier zufällig sehr viele Enzymvarianten und überprüfen sie anschließend auf Zieleigenschaften. Durch Wiederholung dieses Prozesses aus Variation und Selektion gelangt man in der Regel schnell und effizient zu optimierten technischen Enzymen.

Evolutives und rationales Design wachsen zusammen

◆ Die einzelnen Schritte in diesem Prozess wurden und werden kontinuierlich weiter verbessert. So unterstützen mit steigender Rechen-