

# 1 Einleitung

## 1.1 Die RNA-Welt

Mit der Entdeckung selbstreplizierender Moleküle entstand die Hypothese über eine RNA-Welt und über den Ursprung des Lebens<sup>[1]</sup>. Diese Hypothese versucht die grundlegende Frage zu beantworten, was die Rolle funktioneller Moleküle zu Beginn des Lebens war.

Die Entdeckung, daß RNA-Moleküle bei ihrer eigenen Bildung als Katalysatoren wirken können, legt die Vermutung nahe, daß die RNA beides war, erstes Gen und erster Katalysator. Diese Entdeckung führt weg von der klassischen DNA-RNA-Protein-Welt hin zur Betrachtung einer RNA-Welt, in der die RNA selbst sowohl als genetisches Material wie auch als Überträger der Information für Ribosomen zur Proteinherstellung dient. Die Aufteilung von Speicherung der genetischen Information durch DNA und Katalyse durch Proteine wäre nach der Theorie der RNA-Welt eine spätere Entwicklung. Später entwickelten sich DNA-Moleküle, die in ihrer Sequenz komplementär waren zu der selbstreplizierenden RNA, und welche die Aufgabe der Bewahrung der genetischen Information übernahmen. Die Entdeckung, daß die Synthese der Peptidbindung in Proteinen durch die rRNA in den Ribosomen katalysiert wurde, lieferte eine Bestätigung für die Theorie der RNA-Welt.

1981 machten Cech und Mitarbeiter bei der Untersuchung des Spleißmechanismus von rRNA aus dem Wimperntierchen *Tetrahymena thermophila* die erstaunliche Entdeckung, daß keine Proteinenzyme an der Reaktion beteiligt sind. Inkubiert man die rRNA dieses Organismus in Gegenwart von Guanosin und in Abwesenheit von Proteinen, so wird ein 413 Nukleotide langes Intron (intervenierende Sequenz: IVS) herausgeschnitten, und die flankierenden Extrons werden zusammengefügt. Entfernt man die ersten 19 Nukleotide der IVS, erhält man die L-19-IVS-RNA, die alle Bedingungen eines Katalysators erfüllt. Durch diese Entdeckungen bildete sich allmählich die Vermutung, daß RNA-Moleküle in der Lage zu sein scheinen alle notwendigen Reaktionen katalysieren zu können, um sich selbst zu verdoppeln oder Proteine zu synthetisieren. Zwei Jahre später entdeckten Altman und Pace, daß RNase P in der Lage ist, ohne seine Proteinkomponente eine prä-tRNA an der richtigen Stelle katalytisch in einer trans-Reaktion zu spalten. Für ihre bahnbrechenden Arbeiten erhielten Sidney Altman und Thomas R. Cech 1989 den Nobelpreis für Chemie<sup>[2, 3]</sup>. Für katalytisch aktive RNA-Moleküle wurde der Begriff „Ribozym“ eingeführt, der sich aus den Begriffen *Ribonukleinsäure* und *Enzym* zusammensetzt.

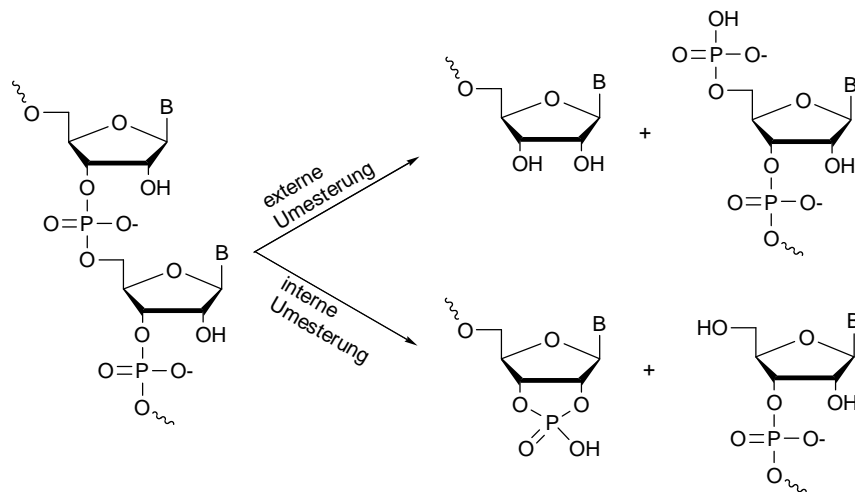
## 1.2 Ribozyme

Die Entdeckung der Ribozyme durch Cech und Altman hat die Sichtweise der Funktion von RNA-Molekülen in Chemie, Biologie und Medizin grundlegend geändert. RNA-Moleküle wurden als passive Moleküle betrachtet, die nur Informationen tragen oder Struktur liefern. Nun weiß man aber, daß RNA-Moleküle nicht nur das Spleißen und Spalten von RNA katalysieren, sondern auch eine Reihe weiterer Reaktionen. Diese Entdeckung hat die Rolle der RNA in der Evolution neu definiert.

Bald nach der Entdeckung der Ribozyme stellten sich zwei Fragen: (1) Wie sieht die dreidimensionale Struktur der Ribozyme, vor allem an der katalytischen Spaltstelle aus? (2) Wie wird der stabilisierende Übergangszustand erreicht?

Diese Fragen sind zwar in den letzten Jahren immer noch nicht vollständig beantwortet worden, aber es gibt einige Kristallstrukturen, kinetische und thermodynamische Untersuchungen, die dazu beigetragen haben, die Rolle, die spezifische, funktionelle Gruppen für Bindung und Katalyse spielen, zu verstehen. Die Fähigkeit von Ribozymen RNA-Moleküle zu spalten, ist sequenzspezifisch. Die Spezifität beruht auf der Basenpaarung von Ribozym-Sequenzen mit Nukleotiden in der Umgebung der Spaltstelle der Ziel-RNA. Die Spaltung kann intramolekular (*cis*), also in der eigenen Sequenz, oder intermolekular (*trans*), in einem anderen Molekül stattfinden.

Im allgemeinen findet die Katalyse bei Ribozymen unter Beteiligung von Metallionen statt, weswegen Ribozyme oft auch als Metalloenzyme bezeichnet werden. Man teilt die RNA-spaltenden Ribozyme in zwei Gruppen ein. Die grundlegende Reaktion, die katalysiert wird, ist in beiden Fällen eine Umesterung mit anschließender Hydrolyse der Phosphordiesterbindung. Bei der ersten Gruppe wird der Angriff eines externen Nucleophils auf die Phosphordiesterbindung katalysiert. Externe Nucleophile sind z. B. Wassermoleküle oder Nucleotide wie Adenosin oder Guanosin, die dann als Cofaktor dienen. Als Reaktionsprodukt erhält man eine 3'-Hydroxylgruppe und eine 5'-Phosphatgruppe. Bei der zweiten Gruppe besteht die Katalyse in der Aktivierung einer internen, der Spaltstelle benachbarten 2'-Hydroxylgruppe, die dann nucleophil am Phosphoratom angreift. Als Reaktionsprodukte erhält man hier eine zyklische 2',3'-Phosphatgruppe und eine freie 5'-Hydroxylgruppe. Als Substrate dienen meist RNA-Moleküle oder das Ribozym selbst (Abb.1).



**Abbildung 1:** Reaktionsprodukte wie sie nach externer bzw. interner Umesterung gebildet werden.

Die am bestuntersuchten Ribozyme sind die selbstspleißenden Introns der Gruppe I, Introns der Gruppe II, die RNA-Untereinheit von RNase P, das Hairpin Ribozym, das Hepatitis Delta Ribozym und das Hammerhead-Ribozym. Die ersten drei Ribozyme sind groß (>100 Nukleotide) und gehören zu der Gruppe der externen Umesterungskatalysatoren. Die letztgenannten sind kleine Moleküle von weniger als 100 Nukleotiden Größe und gehören zu den internen Umesterungskatalysatoren. Sie werden auch als *kleine* Ribozyme bezeichnet<sup>[4]</sup>.

### 1.3 Metallionen und Ribozyme

Divalente Metallionen sind vielfach notwendig für die Funktion von RNA-Molekülen. Sie helfen bei der Strukturbildung und bei der Ausbildung der aktiven Konformation für die Katalyse chemischer Reaktionen und dienen somit der Stabilisierung des Übergangszustandes. In einigen Fällen ist das Metallion aktiv am Mechanismus einer Reaktion beteiligt, indem es z. B. dazu dient, ein Nukleophil zu deprotonieren, ein Elektrophil zu aktivieren oder die Abgangsgruppe zu protonieren. Einige Metallionen übernehmen sogar beide Rollen; sie sind an der Strukturbildung und an der Reaktion beteiligt.

Bei Ribozymreaktionen sind oft Magnesiumionen beteiligt, da diese nach Pearson als „harte“ Ionen gelten und Sauerstoff als „harten“ Koordinationspartner bevorzugen<sup>[5]</sup>. Man spricht von harten Ionen, wenn sie eine schwer polarisierbare Elektronenhülle besitzen, und von weichen, wenn die Elektronenhülle leicht zu polarisieren ist. Das Konzept kann auch auf das Lewis-Säure-Base-Prinzip erweitert werden: harte Lewis-Säuren (Elektronenpaarakzeptor) oder Lewis-Basen (Elektronenpaardonor) sind schwer polarisierbar; weiche sind leicht polarisierbar. Dabei gilt die Regel: hart bevorzugt harte Reaktionspartner, weich bevorzugt weiche.

Aufgrund seines Verhältnisses von Radius zu Ladung und der daraus folgenden Lewis-Azidität wird das Magnesiumion von mehrfach negativ geladenen Liganden koordiniert. Aufgrund seines Härtegrades geht dieses Elektrophil mit Stickstoff- oder Schwefelatomen keine Koordinationsverbindungen ein. Metallische Lewis-Säuren des Typs  $M^{2+}$  aktivieren schwache Lewis-Basen, wie das Wassermolekül, und erzeugen so durch „Umpolung“ ein Nukleophil ( $M^{2+}$ )-OH. Der  $pK_a$ -Wert eines hydratisierten Metallions ist repräsentativ für die Konzentration an Metallhydroxiden in Lösung. Je geringer der Wert, desto höher der Anteil an Hydroxid-Komplexen.

Metallionen können folgende Funktionen in ribozymkatalysierten Reaktionen übernehmen:

1. Eine metallionen-koordinierte Hydroxylgruppe kann als Base fungieren und ein Proton von der 2'-Hydroxylgruppe abstrahieren, oder ein freies Metallion kann als Lewis-Säure fungieren und direkt an das Sauerstoffatom der 2'-Hydroxylgruppe koordinieren und so zu dessen Deprotonierung beitragen.
2. Die entstehende negative Ladung an der 5'-Abgangsgruppe kann durch direkte Koordination eines Metallions oder eines Protons, das von einem Metallionen gebundenen Wassermolekül stammt, stabilisiert werden.
3. Direkte Koordination eines Metallions an ein Nichtbrückensauerstoffatom oder die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zu einem Nichtbrückensauerstoffatom kann den trigonal-bipyramidalen Übergangszustand oder ein entsprechendes Intermediat stabilisieren, und somit das Phosphorzentrum für den nukleophilen Angriff zugänglicher machen.

Die erste These wird durch die Tatsache gestützt, daß die Spaltungsaktivität eines Ribozyms in einem pH-Bereich von 5,5 bis 9,0 linear zunimmt. Mit diesem Ergebnis kann allerdings nicht zwischen den beiden möglichen Mechanismen unterschieden werden. Eine weitere interessante Beobachtung in diesem Zusammenhang ist die Abhängigkeit der Aktivität vom  $pK_a$ -Wert des Metallions. Je niedriger der  $pK_a$ -Wert, desto höher ist die Spaltungsgeschwindigkeit bei gegebener Metallionenkonzentration. Diese Tatsache spricht dafür, daß ein Metallionhydroxid an der Spaltung beteiligt ist, das ein Proton von der 2'-Hydroxylgruppe abstrahiert.

Die zweite These wurde am Hammerhead-Ribozym mittels Substitution des 5'-Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom und des *metal rescue*-Effekts bestätigt. Ist die Abgangsgruppe an der 5'-Seite eine Thiolgruppe, geht die Spaltungsaktivität zurück. Durch Zugabe von Manganionen kann die Aktivität wieder voll hergestellt werden. Die dritte These wurde ebenfalls durch Schwefelsubstitution und *metal rescue*-Experimente bestätigt. Hierfür wurden die Nichtbrückensauerstoffatome substituiert.

Metallionen können im Katalysemechanismus verschiedene Funktionen übernehmen. Es gibt drei direkte (*inner sphere*) Funktionen bei der Phosphatesterhydrolyse:

1. Lewis-Säure-Aktivierung (Koordination des Phosphatsauerstoffatoms an das Metallion).
2. Nukleophile Aktivierung (Koordination eines Nukleophils wie z. B. Hydroxydionen an das Metallion).
3. Aktivierung der Abgangsgruppe (Koordination des Sauerstoffatoms der Abgangsgruppe an das Metallion).

Es gibt drei indirekte (*outer sphere*) Funktionen, die das Metallion übernehmen kann:

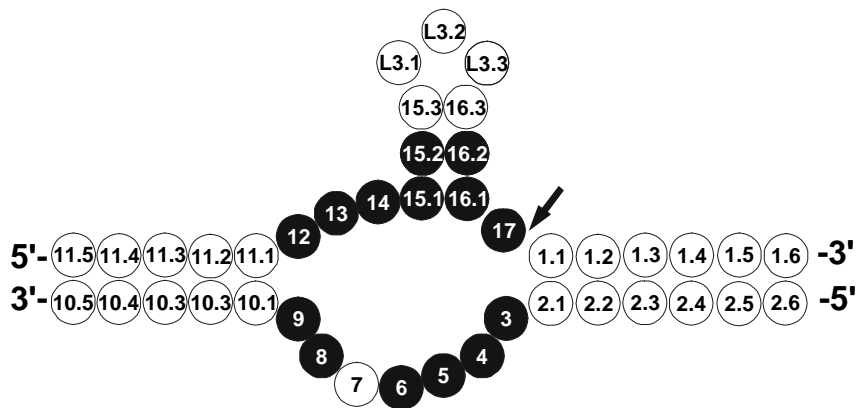
1. Metallkoordinierte Hydroxydionen dienen als intramolekularer Basenkatalysator.
2. Metallkoordinierte Wassermoleküle dienen als intramolekulare Säurekatalysatoren.
3. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Metallionen und unkoordinierten Phosphatestern können die Hydrolyse beschleunigen.

## 1.4 Hammerhead-Ribozym

Von allen katalytischen RNA-Molekülen ist das Hammerhead-Ribozym aufgrund seiner geringen Größe (ca. 30 Nukleotide) das am besten funktionell und strukturell untersuchte Ribozym. Das Hammerhead-Ribozym ist ein ideales System für Untersuchungen, um zu verstehen, wie die dreidimensionale Struktur des Enzyms und seine funktionellen Gruppen miteinander agieren und die katalytische Struktur bilden. Diese Untersuchungen resultierten in Verbesserungen bezüglich der Nukleasestabilität von Ribozymen, Reduktion der Größe und Verbesserung der katalytischen Aktivität.

Das Hammerhead-Ribozym wurde nach der Form seiner Sekundärstruktur benannt. Sie sieht aus wie der Kopf eines Hammers. Das Ribozym wurde als ein Motiv zur sequenzspezifischen Selbstspaltung von Satelliten-RNA-Molekülen in einigen Pflanzenviren entdeckt. Man geht davon aus, daß die RNA-unterstützten Spaltungen für die Viroidreplikation essentiell

sind<sup>[6, 7]</sup>. Die Struktur besteht aus drei helikalen Strängen und einer elf Nukleotide großen Konsensussequenz, welche die katalytisch aktive Tasche bildet (Abb.2)<sup>[8]</sup>. Klassische Sequenzmutationsanalysen wurden dazu verwendet die konservierten Nukleotide in diesem Bereich zu bestimmen. Mit Ausnahme von der Position U7 führten alle Substitutionen zu einer drastischen Abnahme der Aktivität<sup>[9]</sup>.



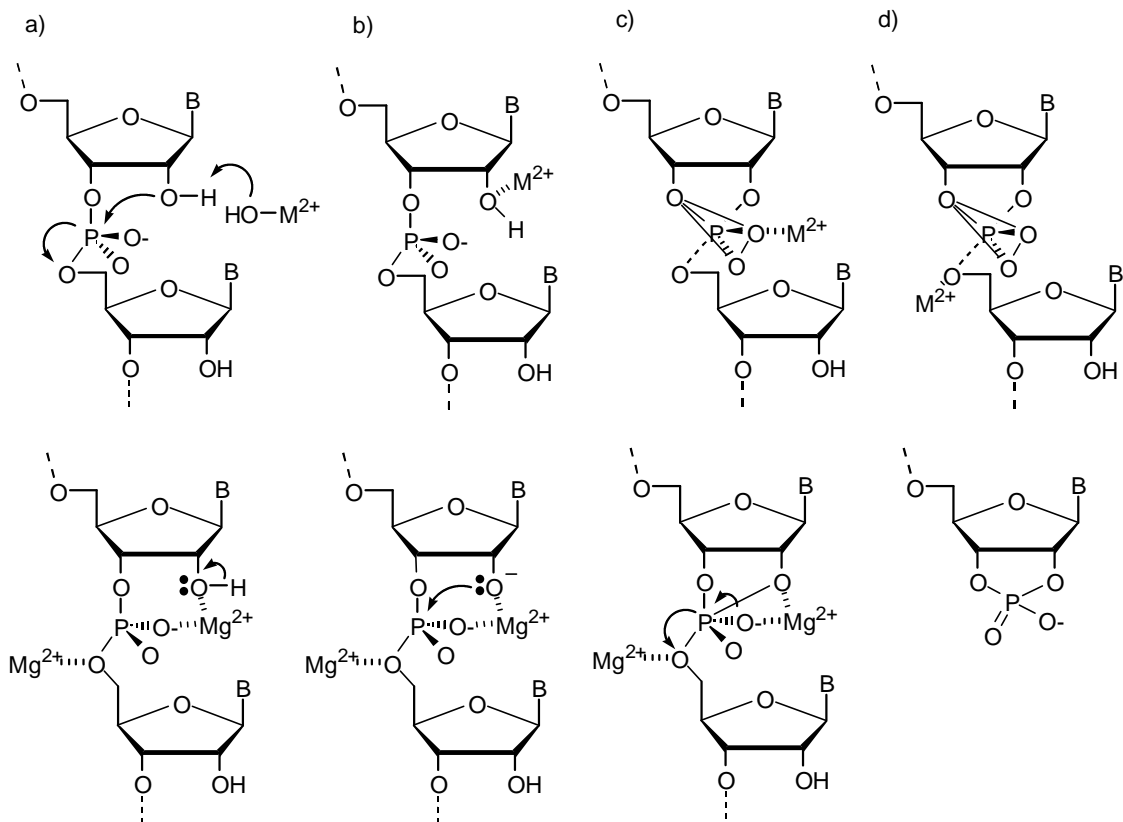
**Abbildung 2:** Nomenklatur für das Hammerhead-Ribozym, wie es 1992 zur Vereinheitlichung festgelegt wurde<sup>[10]</sup>. Konservierte Nukleotide sind invers dargestellt. Der Pfeil deutet die Spaltstelle an.

In der Natur kann die Hammerheadspaltung sowohl intramolekular (*in cis*) unter *single turnover*-Bedingungen, wie auch intermolekular (*in trans*) unter *multiple turnover*-Bedingungen stattfinden. *In vitro* können auch intermolekulare Reaktionen unter *single turnover*-Bedingungen durchgeführt werden. Divalente Metallionen sind absolut essentiell für die Hammerheadspaltung. Magnesiumionen werden eindeutig bevorzugt. Es können aber auch Ionen wie Mangan, Cobalt, Calcium, Strontium oder Barium die katalytische Aktivität unterstützen<sup>[11]</sup>. Es genügen Magnesiumkonzentrationen im millimolaren Bereich um eine Umesterung zu katalysieren, bei der die Phosphordiesterbindung zwischen den Nukleotiden 17 und 1.1 unter Ausbildung einer 5'-Hydroxylgruppe an Nukleotid 1.1 und einem zyklischen 2',3'-Phosphordiester an Nukleotid 17 gespalten wird. Die 2'-Hydroxylgruppe, von der ein Proton bei der Phosphordiesterbildung abstrahiert werden muß, ist essentiell für die Reaktion. Standardbedingungen für die Spaltungsreaktionen sind ein pH-Wert von 7,5 und Temperaturen zwischen 27 und 50°C. Die Geschwindigkeitskonstante der chemischen Spaltung liegt bei ungefähr  $1 \text{ min}^{-1}$ .

### 1.4.1 Metallionen-Mechanismus der Hammerhead-Spaltung

Es werden zwei verschiedene Mechanismen für die Spaltung der Phosphordiesterbindung durch das Hammerhead-Ribozym vorgeschlagen. Im „Ein-Metallionen-Modell“ bindet im ersten Schritt ein divalentes Metallionenhydroxid an das pro-Rp-Sauerstoffatom der Phosphatgruppe an der Spaltstelle, agiert dort als Base und abstrahiert das Protonen der 2'-Hydroxylgruppe. Das aktivierte 2'-Oxyanion greift im nächsten Schritt nukleophil das elektrophile Phosphoratom der Phosphordiesterbindung an. In einer intramolekularen Reaktion wird so das 5'-Sauerstoffatom der Abgangsgruppe ersetzt.

Im „Zwei-Metallionen-Mechanismus“ ist zusätzlich ein Magnesiumion an das 5'-Sauerstoffatom der Abgangsgruppe koordiniert und dient der Stabilisierung der negativen Ladung der Abgangsgruppe (Abb.3). In den letzten drei Jahren haben immer mehr Untersuchungen das zweite Modell bestätigt<sup>[12-19]</sup>. Dieses Modell gilt auch für andere Metalloenzyme und Ribozyme.

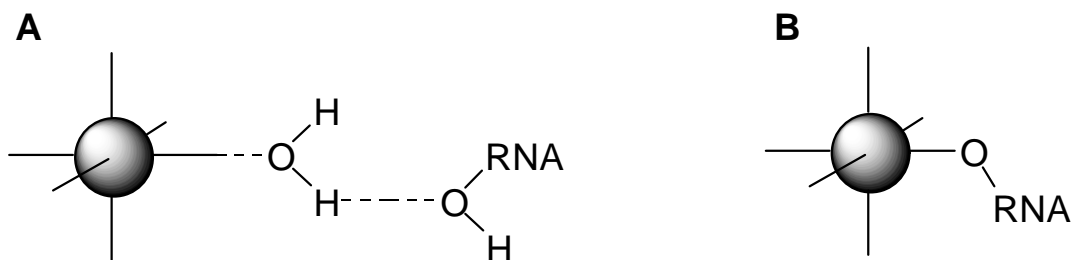


**Abbildung 3:** Möglichkeiten für eine metallkatalysierte Umesterung oder Hydrolyse. a) Metallhydroxide als Base, Deprotonierung der Hydroxylgruppe an der aktiven Seite; b) Metallkoordination an das Nukleophil der aktiven Seite, Stabilisierung der Hydroxylgruppe,  $pK_a$ -Wert Verringerung, das Oxyanion kann angreifen; c) Metallionen Stabilisierung des pentakoordinierten Übergangszustandes, Kompensation von negativer Ladung am Phosphat; d) Metallionenstabilisierung der negativ geladenen Abgangsgruppe<sup>[4]</sup>. In der zweiten Reihe ist der Zwei-Metallionen-Mechanismus dargestellt.

Die Metallhydroxide agieren als Nukleophile oder nehmen an der Basen-Katalyse teil. Im aktiven Zentrum von Ribozymen kann es, wie auch bei Proteinen, zu  $pK_a$ -Verschiebungen, und somit zu einer lokalen Konzentrationsänderung an Metallhydroxiden kommen, was einen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit haben kann.

Die Funktion des Magnesiumions bei der Hydrolyse der Phosphatbindung liegt in der möglichst effektiven Kompensation der hohen negativen Ladung, die sich bei physiologischem pH-Wert ergibt. Da es sich um eine Ladungskompensation auf beiden Seiten der Reaktionsgleichung handelt, sollte es durch das Magnesiumion zu einer Verringerung der Aktivierungsenergie kommen. Bei Polyphosphaten ist es offensichtlich, daß ein genügend polarisiertes divalentes Kation die Sauerstoffatome mehrerer Phosphateinheiten chelatisieren und damit eine räumliche Fixierung, einschließlich einer aktivierenden Ringspannung, bewirken kann. Metallionen können durch Koordination zweier Reaktanden das leichte Erreichen des Übergangszustandes einer assoziativen Reaktion begünstigen.

Bei der Koordination des Magnesiums an das Phosphatrückgrat können zwei verschiedene Arten von Komplexen entstehen. Kommt es zur Wasserstoffbrückenbindung zwischen Phosphatgruppe und einem Wassermolekül der ersten Ligandensphere des Magnesiumions, spricht man von einem Anlagerungskomplex oder indirekter Koordination (*outer-sphere-coordination*, Abb.4A). Wurde dagegen die funktionelle Gruppe des Phosphats im Austausch gegen ein Wassermolekül Ligand des Kations, spricht man von einem Durchdringungskomplex (*inner-sphere-coordination*, Abb.4B). Durchdringungskomplexe, bei denen das Metallion direkt mit der RNA koordiniert, sind inert gegen Substitutionen, das Metallion kann nicht gegen ein gleichwertiges Ion ersetzt werden<sup>[20]</sup>.

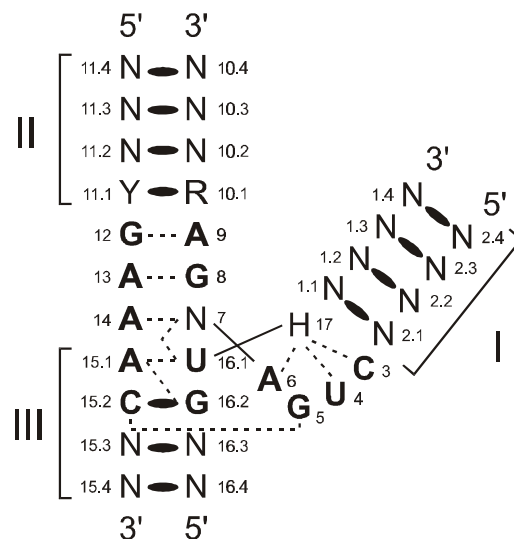


**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der möglichen Metallbindungen an RNA. Es können Anlagerungskomplexe (A) oder Durchdringungskomplexe (B) gebildet werden. R steht für den RNA-Rest.



### 1.4.2 Struktur der Hammerhead-Ribozyme

Die trans-spaltenden Hammerhead-Ribozyme bestehen aus einer Antisense-Region (Helix I und Helix III) und einer katalytischen Domäne mit einer flankierenden Helix II-Loop Sektion (Abb.5). In den letzten Jahren wurden viele Untersuchungen vorgenommen, um sowohl die globale dreidimensionale Struktur wie auch die detaillierte atomare Struktur aufzuklären. Dazu zählen Methoden wie Messungen der elektrophoretischen Mobilität, NMR-Studien, Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer- (FRET) und Röntgenstrukturuntersuchungen. Letztere wurden in den Gruppen von McKay, Scott und Klug vorgenommen<sup>[21-25]</sup>. Die Ergebnisse sind nahezu identisch, was die tertiäre Faltung und Konformation anbelangt, obwohl jeweils unterschiedliche Hammerhead-Ribozyme verwendet wurden. Alle Ribozyme weisen im Kristall eine  $\gamma$ -förmige Struktur auf, bei der die Helices I und II die Arme des  $\gamma$  bilden und Helix III die Basis darstellt. Helix I und Helix III sind benachbart und Helix II und Helix III sind gestapelt und bilden eine Pseudo-A-Form-Helix. Die katalytische Domäne ist in der Röntgenstruktur in zwei Regionen eingeteilt. Domäne I ist ein Uridin-Turn, der von den Nukleotiden C3-A6 gebildet wird. Dieser Uridin-Turn ist in seiner Konformation identisch zu den Uridin-Turns, wie sie in der tRNA vorkommen. Domäne II wurde aus den Nukleotiden G12-A14 und U7-A9 gebildet und beinhaltet ein GA-Mismatch-Basenpaar. Die Nukleotide der Domäne II bilden zwei reverse Hoogsteen-Basenpaare zwischen G8-A13 und A9-G12 aus. A14-U7 bilden ein Nicht-Watson-Crick-Basenpaar mit einer Wasserstoffbrücke aus.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung des Hammerhead-Ribozyms nach Scott *et al.* <sup>[23]</sup>. N steht für jedes beliebige Nukleotid, Y für Pyrimidine und H für jedes Nukleotid außer G. Konservierte Nukleotide sind fett gedruckt. Ellipsen stehen für Watson-Crick-Basenpaare, einfache Wasserstoffbrücken zwischen nicht-Watson-Crick-Basenpaaren sind gestrichelt dargestellt. Die Helices sind mit I, II und III beschriftet.

Die Struktur von Scott *et al.* weist mehrere Magnesiumionen-Bindungsstellen auf. Zwei davon werden als wichtig für die Spaltung angesehen<sup>[22, 23]</sup>. Das eine Magnesiumion ist von fünf Wassermolekülen hydratisiert und bindet an das pro-*S*-Sauerstoffatom der Phosphatgruppe von A9, weitere Wasserstoffbrücken bestehen zu den Nukleosiden G8, G10.1 und G12. Die Bindung wurde als essentiell für die Strukturbildung angesehen. Das zweite wichtige Magnesiumion befindet sich in direkter Nachbarschaft zur Spaltstelle. Es liegt eine direkte Bindung zum pro-*R*-Sauerstoffatom der Phosphatgruppe der Spaltstelle vor<sup>[22]</sup>. Das hydratisierte Magnesiumion kann direkt in die Katalyse eingreifen, indem es als Base fungiert, um so vor dem nukleophilen Angriff auf die Spaltstelle die Deprotonierung der 2'-Hydroxylgruppe von C17 zu fördern<sup>[26]</sup>.

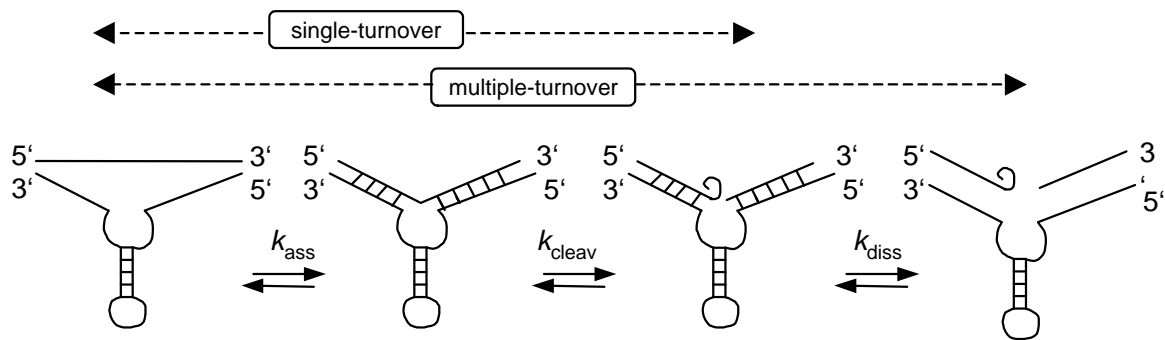
Die Kristallstrukturen repräsentieren nur die Energieminima eines Moleküls und liefern somit keine direkte und detaillierte Strukturinformation für den Übergangszustand. Die Konformationen, die sich aus den kristallographischen Strukturen ergeben, erlauben keinen *inline*-Angriff der 2'-Hydroxylgruppe auf die Phosphor-Sauerstoff-Bindung an der Spaltstelle, die absolut notwendig für die katalytische Aktivität ist. Folglich repräsentiert keine der existierenden Kristallstrukturen die exakte katalytische Konformation<sup>[9, 22, 23, 27]</sup>.

### 1.4.3 Spaltstelle und NHH-Regel

Die Sequenzspezifität des Hammerhead-Ribozyms wurde durch Mutagenesestudien der Spaltstelle bestimmt. Die ersten Untersuchungen haben ergeben, daß jedes Oligonukleotid mit der Abfolge NUX von einem Hammerhead-Ribozym gespalten werden kann. N steht für jedes beliebige Nukleotid A, G, C, U und X steht für die Nukleotide A, C, U<sup>[8, 28, 29]</sup>. Erneute Untersuchungen ergaben eine noch weniger eingeschränkte Erkennungssequenz, für die Hammerhead-Spaltung wird lediglich die Sequenz NHH benötigt, wobei N für jedes beliebige Nukleotid und H für jedes Nukleotid außer G steht<sup>[30]</sup>.

## 1.5 Hammerhead-Ribozym Kinetik

Die Kinetik von katalytischen RNA-Molekülen folgt denselben Regeln wie die von Proteinenzymen. Ribozyme binden ein Substrat, um aus einer bimolekularen eine unimolekulare Reaktion zu machen, stabilisieren den Übergangszustand, katalysieren die Reaktion und dissoziieren vom gespaltenen Produkt.



**Abbildung 6:** Schema des minimalen kinetischen Mechanismus der intermolekularen Hammerhead-Spaltung. Die vier Hauptkomponenten sind das Ribozym (R), das Substrat (S), der Ribozym-Substrat-Komplex (RS) und der Ribozym-Produkt-Komplex (RP<sub>1</sub>P<sub>2</sub>). Das Ende der Reaktion bildet die Produktdissoziation<sup>[31]</sup>. Jeder dieser Schritte wird durch eine elementare Geschwindigkeitskonstante definiert.

Das minimale Reaktionsschema einer Enzymspaltung besteht aus drei Schritten (Abb.6). Als erstes wird ein Michaelis-Menten-Komplex durch Ausbildung der Helices I und III geformt ( $k_{\text{ass}}$ ). Im zweiten Schritt wird das Substrat gespalten ( $k_{\text{cleav}}$ ), im dritten Schritt dissoziieren die gespaltenen Fragmente vom Ribozym ( $k_{\text{diss}}$ ) und der Ribozymstrang wird frei für die nächste Spaltung. Die Temperaturabhängigkeit des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes wird über einen Arrhenius-Plot ermittelt. Bei Temperaturen von 25-50°C ist die chemische Spaltung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ( $k_{\text{cleav}}$ ). Die Dissoziation geht also schneller vonstatten als die chemische Spaltung ( $k_{\text{cleav}} < k_{\text{diss}}$ ). Bei Temperaturen unter 25°C wird die Produktdissoziation zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt ( $k_{\text{diss}} < k_{\text{cleav}}$ ). Bei Temperaturen über 50°C nimmt die Geschwindigkeit der Reaktion im allgemeinen ab, da die Ausbildung des Michaelis-Menten-Komplexes durch das Erreichen der Schmelztemperatur des Oligonukleotids erschwert wird.

Die Effekte auf die Reaktionsgeschwindigkeit werden im allgemeinen durch die Konstanten  $k_{\text{cat}}$  und  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$  beschrieben. Der Wert  $k_{\text{cat}}$  beschreibt die Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Grenzkonzentration an Substrat (oder Ribozym). Er repräsentiert die Freie Energie, die benötigt wird, um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zu erreichen.  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$  ist eine Maß für die katalytische Effektivität. Sein Wert wird aus der Steigung der Michaelis-Menten-Gleichung ermittelt und entspricht einer Reaktionsgeschwindigkeitskonstante Zweiter Ordnung. Er repräsentiert die Differenz der Freien Energie zwischen freiem Ribozym und der Produktdissoziation.

Bei Reaktionen mit Substratüberschuss (*multiple turnover*) müssen alle beteiligten Reaktionsschritte berücksichtigt werden. Der Schritt der Produktdissoziation ist hierbei meist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Findet die Reaktion mit einem Ribozymüberschuß

(*single turnover*) statt, wird die chemische Spaltung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Es müssen weniger Parameter berücksichtigt werden. Darüberhinaus wird an der Sättigungsgrenze des Ribozyms eine Trennung von chemischem Schritt und Substratbindungsschritt erreicht. Es ist hinreichend bekannt, daß RNA-Sequenzen verschiedene Strukturen annehmen können, welche die gleiche Stabilität besitzen, wie die natürliche. Die Tatsache wirkt sich auf die kinetischen Eigenschaften der Spaltungsreaktion aus, wodurch es zu Schwierigkeiten bei der Auswertung der gemessenen Spaltungsgeschwindigkeit kommen kann<sup>[31, 32]</sup>.

Es ist durchaus denkbar, daß zusätzliche Zwischenschritte existieren, die mit den aktuellen experimentellen Methoden nicht detektierbar sind:

1. Umwandlung von RS in einen kurzlebigen aktiven Komplex, in dem die angreifende 2'-Hydroxylgruppe in eine Linie mit der zu spaltenden Phosphordiesterbindung gebracht wird (*in line attack*)<sup>[22, 23, 27]</sup>.
2. Eine konformelle Neuordnung, welche die Bildung des katalytischen Zentrums bewirkt<sup>[33]</sup>.
3. Ein Schritt, in dem die beteiligten Metallionen gebunden werden<sup>[34]</sup>.
4. Eine Konformationsänderung vom inaktiven zum aktiven RS<sup>[35]</sup>.

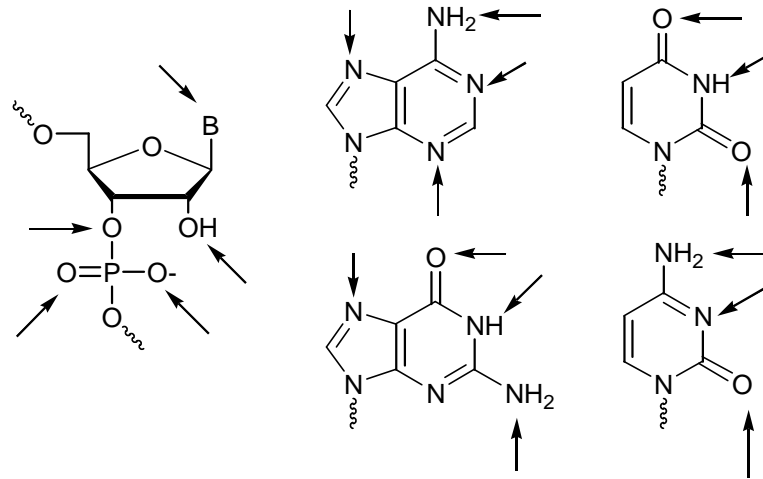
Die kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften des Hammerhead-Ribozyms sind so gut untersucht, daß es möglich ist, für eine beliebige Hammerhead-Sequenz unter beliebigen Puffer-Bedingungen die individuelle Geschwindigkeitskonstante zu berechnen<sup>[35]</sup>.

## 1.6 Modifizierte RNA

### 1.6.1 Synthetische Ribozyme

Synthetische Ribozyme werden vielfach als chemisch modifizierte Moleküle eingesetzt. Um Ribozyme z. B. als Therapeutika einsetzen zu können, ist es notwendig durch chemische Modifikation ihre Stabilität zu erhöhen ohne ihre Aktivität zu mindern, da unmodifizierte RNA in biologischem Serum instabil ist. Chemisch modifizierte Oligonukleotide werden auch dazu verwendet mechanistische oder funktionelle Studien zu betreiben. Daher sind Untersuchungen über die Auswirkungen von Modifikationen unerlässlich. Da RNA sowohl enzymatisch wie auch nicht-enzymatisch hydrolysiert werden kann, werden viele Untersuchungen unternommen, die mechanistischen Details dieser Reaktionen zu verstehen. Eine Vielzahl an strukturellen Modifikationen wurde etabliert, und die Verbesserung der chemischen Synthese von RNA erweitert die Möglichkeiten der Modifikationen. In einem

Übersichtsartikel von Zhou und Taira wurden 1998 die wichtigsten Ergebnisse bezüglich der ribozymkatalysierten Spaltung zusammengefaßt<sup>[36]</sup>. Nukleotidbausteine können folgendermaßen modifiziert werden (Abb.7):



**Abbildung 7:** Mögliche Modifikationsstellen in einem Oligonukleotid. Die Pfeile deuten auf gängige austauschbare funktionelle Gruppen.

1. 2'-Zuckermodifikationen

Die Hydroxylgruppe wird durch Gruppen wie O-Alkyl, Fluoro-, Amino-, O-Allyl-, C-Allyl-, O-Methyl- oder einfach nur ein Proton substituiert.

2. Phosphatmodifikationen

Die am häufigsten verwendete Modifikation ist die Substitution der Nichtbrücken- oder Brückensauerstoffatom gegen Schwefelatome. Es besteht aber auch die Möglichkeit die Phosphatgruppe gegen einen nicht-nukleotidischen Linker zu substituieren.

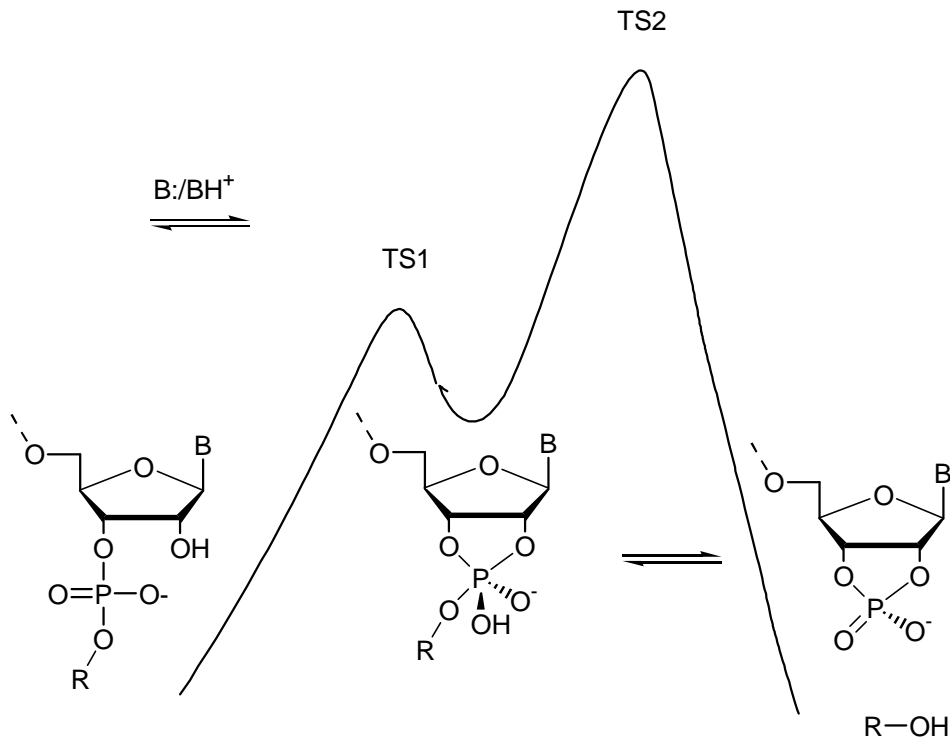
3. Basenmodifikationen

Bei den Basen bestehen mehrere Modifikationsmöglichkeiten. Zum einen können die unterschiedlichen funktionellen Gruppen der Basen substituiert werden, zum anderen besteht aber auch die Möglichkeit, die Base selbst zu substituieren bzw. zu entfernen.

**1.6.2 Nichtenzymatische Hydrolyse von RNA**

Die Hydrolyse von RNA wird durch einen nukleophilen Angriff der 2'-Hydroxylgruppen initiiert (Abb.8). Die 2'-Hydroxylgruppe wird durch eine Base aktiviert, und ein Proton wird auf die Phosphordiesterbindung übertragen. Es entsteht ein pentakoordinierter Übergangszustand (TS1). Im zweiten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird unter Ausbildung eines trigonal bipyramidalen Übergangszustandes (TS2) die Phosphor-Sauerstoff-Bindung auf

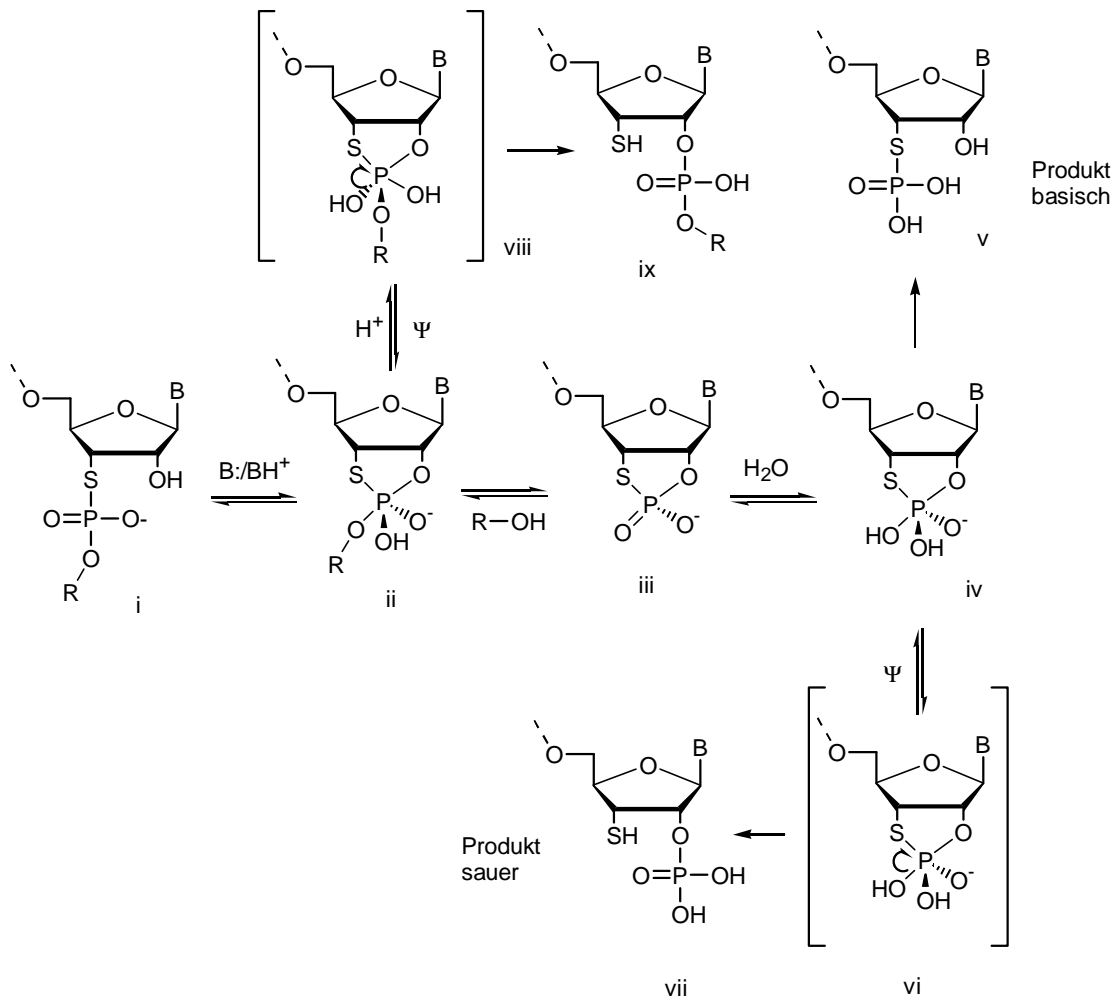
der 5'-Seite des folgenden Nucleotids gespalten und ein zyklischer Phosphordiester entsteht. Im Anschluß wird der zyklische Phosphordiester hydrolysiert und eine 3'-Phosphat- und eine 2'-Hydroxylgruppe werden gebildet.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der nichtenzymatischen Hydrolyse von RNA.

### 1.6.3 Hydrolyse 3'-thio-modifizierter RNA

3'-Thiolat-modifizierte Oligonucleotide stellen interessante RNA-Analoga dar<sup>[37-39]</sup>. Mit diesen Verbindungen wurden Studien zur enzymatischen Spaltung von RNA, zur Hydrolyse und zur spezifischen Spaltung der Phosphorothiolat-Bindung mit verschiedenen Reagenzien vorgenommen<sup>[39]</sup>. Grundsätzlich erfolgt die Hydrolyse 3'-phosphorothiolat-modifizierter RNA nach dem gleichen Schema wie bei unmodifizierter RNA. Diese Eigenschaft macht die 3'-Thiolate zu guten RNA-Analoga. Das detaillierte Hydrolyseschema modifizierter RNA (i) ist in Abbildung 9 dargestellt:



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung der Hydrolyse 3'-phosphorothiolat-modifizierter RNA.

Unter basischen Reaktionsbedingungen entsteht (v) als Produkt, das aus (i) wie folgt gebildet wird: (i) → (ii) → (iii) → (iv) → (v). Anders verläuft dagegen die Hydrolyse unter sauren Reaktionsbedingungen. Hier ist Pseudorotation erlaubt und (vi) wird als Zwischenprodukt gebildet. Das Endprodukt (vii) wird über (i) → (ii) → (iii) → (iv) → (vi) → (vii) gebildet. Die Pseudorotation fördert die Spaltung der schwachen Phosphor-Schwefel-Bindung und somit die Bildung von Produkt (vii). Unter basischen Bedingungen (pH 10-14) ist die Pseudorotation verboten und somit resultiert direkt Produkt (v). Die 3'-phosphorothiolat modifizierte RNA wird 2000-fach schneller hydrolysiert als die entsprechende unmodifizierte RNA, wohingegen die säurekatalysierte Hydrolyse nur 3-fach schneller stattfindet<sup>[36]</sup>.

Die Substitution von Sauerstoff gegen Schwefel führt zu einer Veränderung der Geometrie im Rückgrat der RNA. Die Bindungen sind länger und die Winkel kleiner. Diese Änderung bewirkt eine Stabilisierung des zyklischen Übergangszustandes was auf eine Verminderung der Ringspannungsenergie des fünfgliedrigen Ringes der Intermediate (ii) und (iv)

zurückzuführen ist. Das ist allerdings noch keine Erklärung für die 2000-fach schnellere Hydrolysegeschwindigkeit unter basischen Bedingungen. Die Erklärung hierfür liegt in der Stabilisierung des anionischen Übergangszustandes durch das polarisierbare Schwefelatom. Betrachtet man bei der Ausbildung des Übergangszustandes das Phosphoratom als Zentrum der negativen Ladung, das an anionischem Charakter zunimmt, so kann eine Ladungsverteilung durch das benachbarte Schwefelatom stattfinden und somit kann der Übergangszustand TS1 stabilisiert werden. Dieser Effekt steht sowohl in Einklang mit der beobachteten Steigerung der Hydrolysegeschwindigkeit bei der basenkatalysierten Hydrolyse, das ein anionisches Nukleophil benötigt, wie auch mit der nur geringen Steigerung der Hydrolysegeschwindigkeit bei der säurekatalysierten Hydrolyse, bei der das Nukleophil eine neutrale Hydroxylgruppe ist<sup>[39]</sup>.

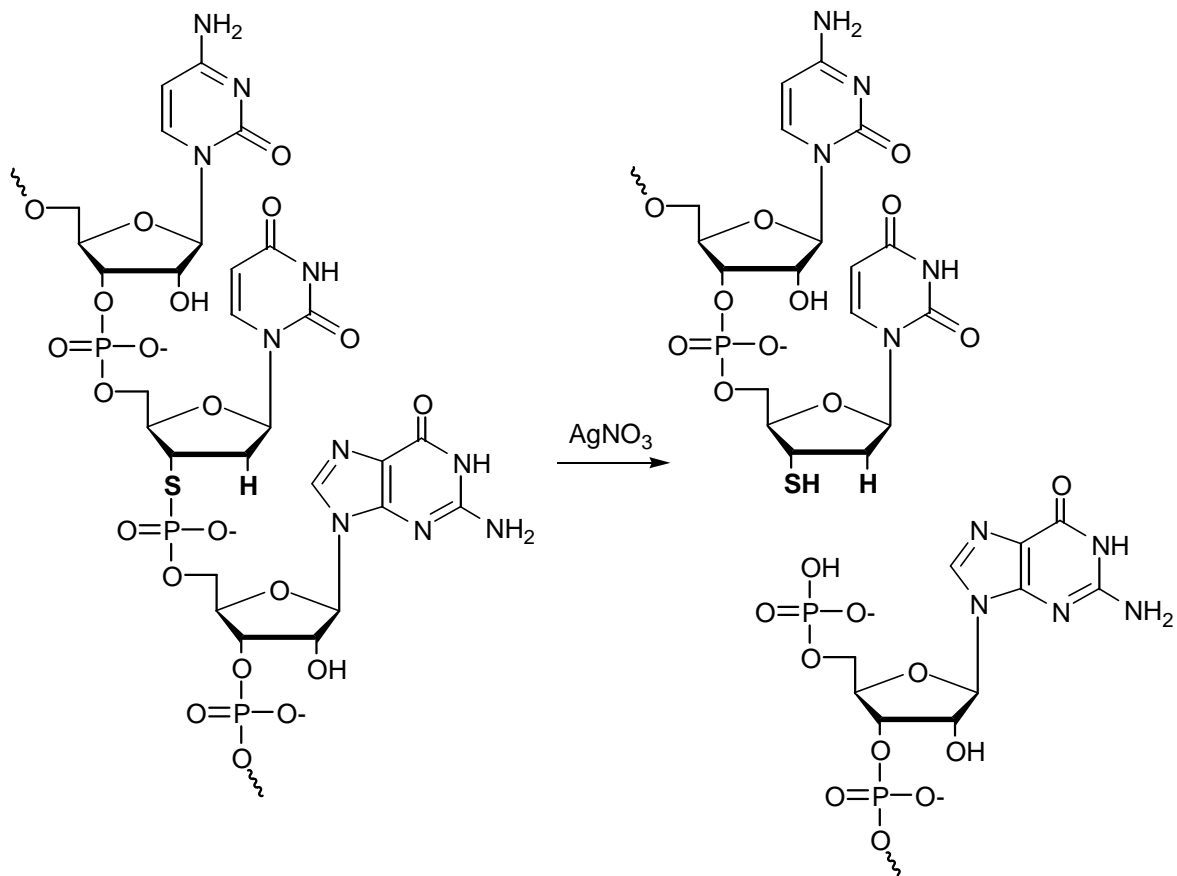
Sind die Nichtbrückensauerstoffatome durch Schwefel substituiert, treten diese Effekte nicht auf. Hier werden Hydrolysegeschwindigkeiten vergleichbar mit denen unmodifizierter RNA gemessen. Die Nichtbrückenschwefelatome besitzen eine komplett lokalisierte negative Ladung und sind nicht in der Lage, eine zusätzliche negative Ladung zu kompensieren und so den Übergangszustand zu stabilisieren.

Ein weiterer Grund für die geringe Steigerung der Hydrolysegeschwindigkeit bei der säurekatalysierten Hydrolyse liegt darin, daß die RNA (i) in der Form (ix) „gefangen“ ist ((i) → (ii) → (viii) → (ix)). Die Hydrolyse endet in einer „Sackgasse“, solange nicht die reversible Rückreaktion zu (i) stattfindet.

#### **1.6.4 Silberspaltung von Phosphorothiolaten**

Die Phosphor-Schwefel-Bindung besitzt eine Eigenschaft, die für die Entwicklung eines neuen Modifikationsinterferenzverfahrens entscheidend ist. Diese Bindung kann selektiv in Gegenwart der Sauerstoff-Phosphorbindung gespalten werden (Abb.10). Die Spaltung findet in Gegenwart von wäßriger Silbernitratlösung oder einer Jodlösung in wäßrigen organischen Lösungsmitteln quantitativ statt<sup>[40]</sup>. Die Phosphor-Schwefel-Bindung wird dagegen nicht von Nuklease P1 gespalten<sup>[39]</sup>.





**Abbildung 10:** Darstellung der quantitativen Silberspaltung der Phosphorothiolat-Bindung.

## 1.7 Modifikationsinterferenzanalysen

Modifikationsinterferenzanalysen dienen der Identifikation jener Nucleotide innerhalb einer RNA, die für eine bestimmte Reaktion essentiell sind, vorausgesetzt, daß die RNA als Substrat in der Reaktion dienen kann und daß Reaktionsprodukte und -edukte voneinander trennbar sind.

Untersuchungen an modifizierten Nucleinsäuren haben zu einem erweiterten Verständnis von Funktion und Struktur beigetragen. Mit selektiven Modifikationen funktioneller Gruppen werden Wechselwirkungen mit anderen Nucleinsäuren, Proteinen oder Ionen untersucht. Die Vorgehensweise besteht darin, alle zugänglichen Positionen einer Nucleinsäure zu modifizieren. Dabei werden die Synthesebedingungen so gewählt, daß ein Gemisch an modifizierten Molekülen entsteht, bei dem jedes Molekül im statistischen Mittel nur eine Modifikation aufweist. Ein geringer Modifikationsgrad ist wichtig, damit strukturelle Veränderungen minimal gehalten werden. Das Gemisch wird anschließend auf die interessierenden Eigenschaften hin untersucht.

Bei den ersten Modifikationsinterferenzanalysen wurden die Modifikationen chemisch während oder nach der Synthese eingeführt. Es wurden verschiedene Reagenzien verwendet, um Modifikationen an den Basen der RNA einzuführen<sup>[41]</sup>:

- Diethylpyrocarbonat reagiert mit Purinen
- Hydrazin entfernt Pyrimidine
- Dimethylsulfat modifiziert A, C und G
- Kethoxale modifizieren G-spezifisch
- 1-Cyclohexyl-2-morpholinocarbodiimid-metho-*p*-toluoylsulfonate reagiert U- und G-spezifisch

Der Vorteil dieser Methoden gegenüber den früher durchgeführten Punktmutationsanalysen liegt darin, daß mit wenigen Experimenten die Informationsmenge erhalten wird die aus einer Vielzahl von Punktmutationsanalysen erhalten wurde. Die Nachteile dieser Methode liegen darin, daß zum einen nur jene funktionellen Gruppen untersucht werden können, die von den Reagenzien umgesetzt werden können, und zum anderen können nur jene Modifikationen detektiert werden, die eine Veränderung hinterlassen, die durch reverse Transkription oder Strangbrüche nachweisbar sind. Ferner ist diese Methode ebenso wie die klassische Punktmutationsanalyse nicht in der Lage jedes essentielle Nukleotid zu identifizieren, da die Beteiligung der Ribose an der Funktionalität einer RNA nicht untersucht werden kann.

Ein konzeptionelle Alternative bildet die Interferenzanalyse auf Grundlage von Phosphorothioaten. Nukleosidphosphorothioate werden dabei in ein wachsendes RNA-Transkript eingebaut<sup>[42, 43]</sup> oder durch chemische Festphasensynthese generiert<sup>[44]</sup>. Phosphorothioate, bei denen eines der beiden Nichtbrückensauerstoffatome gegen Schwefel substituiert ist, werden zur Identifikation von essentiellen RNA-RNA- oder RNA-Metallionen-Wechselwirkungen verwendet. Die Phosphorothioat-Bindung wird in Gegenwart von Iod gespalten und aus dem resultierenden Sequenzmuster können die wichtigen Positionen abgelesen werden.

Eine Erweiterung dieser Methode stellt die Verwendung von Phosphorothioaten als Marker für eine zweite Modifikation dar. Mit dieser Methode wurden die für die Wechselwirkung von tRNA mit RNase P essentiellen 2'-Hydroxylgruppen identifiziert<sup>[45]</sup>. In den folgenden Jahren wurde diese Methode zur Interferenzanalyse von Nukleotidanaloga (*NAIM, nucleotide analog interference mapping*) weiter entwickelt<sup>[46]</sup>. Hierbei handelt es sich um eine Technik, die es ermöglicht, Nukleinsäuren in einem Hochdrucksatzverfahren nach essentiellen funktionellen Gruppen zu untersuchen. Phosphorothioatmarkierte Nukleotidanaloga wurden als Triphosphate synthetisiert und nach dem Zufallsprinzip an allen Positionen der Nukleinsäure

eingeführt. Nach erfolgter Reaktion werden aktive Nukleinsäuren von inaktiven getrennt. Im Anschluß findet die Spaltung der Phosphorothioatbindung mit Iod statt und die interferierende Positionen können durch hochauflösende Gelelektrophorese ermittelt werden. Diese Studien wurden schon erfolgreich zur Untersuchung von Tetrahymena-Gruppe-I-Introns<sup>[46-50]</sup> oder dem Hairpin-Ribozym<sup>[51]</sup> durchgeführt.

Diese Methode hat den Vorteil, daß eine Vielzahl an Modifikationen untersucht werden kann. Die Modifikationen unterliegen keinen Beschränkungen (außer denen, der chemischen Synthetisierbarkeit der Triphosphate), da sie vor der Synthese der RNA eingeführt werden. Eine Schwierigkeit ergibt sich allerdings, wenn zwischen einer Phosphorothioatinterferenz und einer Interferenz des Nukleotidanalogons unterschieden werden muß. Interferenzen an Positionen an denen eine Phosphorothioatinterferenz vorliegt, können durch Zugabe von thiophilen Kationen wie Mangan oder Cadmium kompensiert werden. Hierzu ist es aber notwendig zusätzlich Experimente durchzuführen. Die Grenzen eines NAIM-Assays liegen aber darin, daß die anderen Positionen uninformativ bleiben<sup>[52]</sup>.

Ein NAIM-Experiment kann und hat viel zum Verständnis von Katalyse, Protein- oder Ligandenbindung, Sekundär- und Tertiärstrukturbildung wie auch Konformationsänderungen von Nukleinsäuren beitragen, denn fast jede funktionelle Gruppe ist in diesem Assay zugänglich<sup>[48]</sup>. Dennoch unterliegt auch diese Methode Beschränkung in Bezug auf die Zugänglichkeit der zu untersuchenden interferierenden Modifikationen.