

5. Diskussion

5.1 Versuche zur *in vitro* Selektion

Die Knüpfung von N-glycosidischen Bindungen zwischen einer heterocyclischen Base und einem aktivierten Zuckerphosphat ist ein Schlüsselschritt während der Nucleotidsynthese in unserer Biosphäre. Das aktivierte Zuckerphosphat PRPP ist dabei die zentrale Komponente, die mittels Proteinenzymen zu Purin-, Pyrimidin- und Pyridinnucleotiden umgesetzt wird [Hartman, 1958; Lieberman, 1955; Preiss, 1958].

In einer hypothetischen RNA-Welt nimmt man an, daß sich viele heutige Stoffwechselfvorgänge schon vor der Evolution der codierten Proteinbiosynthese etablierten und daß frühe Ribozyme metabolische Umwandlungen auf der Basis der heutigen Proteinkatalyse durchführten [Robertson, 1998].

Diese Annahme impliziert, daß RNA in der Lage sei, ein breites Spektrum chemischer Transformationen zu katalysieren, darunter auch die Ausbildung N-glycosidischer Bindungen, die essentiell für die Synthese der RNA-Bausteine und Redoxcofaktoren sind.

Wir richteten unser Interesse auf die Selektion katalytischer RNA, die in der Lage ist, Pyrimidin- und Pyridinnucleotide unter Verwendung von PRPP zu synthetisieren.

Die Erweiterung der Methode der direkten Selektion zur direkten Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden führte zur Entdeckung von Ribozymen, die bislang unzugängliche – bimolekulare – chemische Reaktionen katalysieren können.

Die Charakterisierung eines die Diels-Alder-Reaktion katalysierenden Ribozyms [Seelig, 1999a] ist ein Beispiel für den Erfolg dieser Methode, die in dieser Arbeit genutzt werden sollte, um Ribozyme mit der Fähigkeit zur Katalyse N-glycosidischer Bindungsknüpfung zu finden.

Um die Methode der direkten Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden

anzuwenden, war es zunächst erforderlich, die Nucleobasen Uracil-carbonsäure bzw. Nicotinsäure enzymatisch an die kombinatorische RNA-Bibliothek anzufügen.

Wir haben uns für die 3'-Modifizierung mittels eines geeigneten Linkers und damit für dessen Inkorporation durch die T₄-RNA-Ligase entschieden. Da die RNA-Moleküle durch Transkription hergestellt werden, enthalten sie ein 5'-Triphosphat, der Linker selbst ist 3'-blockiert, daß Nebenreaktionen bei der Ligation, wie Zirkularisierungen und Oligomerisierungen ausgeschlossen werden können [Romaniuk, 1983]. Die 3'-Modifizierung ist außerdem wichtig, da unser Selektionskriterium auf die Anknüpfung eines Riboserestes ausgerichtet ist und die RNA-Linker-Konjugate kein natives 3'-Ende aufweisen dürfen.

Der große Vorteil dieser Methode im Gegensatz zur Transkriptionsinitiation besteht auch in dem relativ geringen Verbrauch an Dinucleotidanaloga für die Einführung von Reaktanden in RNA, sowie in dem verhältnismäßig geringen synthetischen Aufwand.

Dazu wurde in unserer Arbeitsgruppe ein flexibler Linker entwickelt [Hausch, 1997], der versatil derivatisierbar ist. Zusätzlich enthält er eine photolytisch ansteuerbare Spaltstelle, die die Kontrolle über die Regioselektivität der Reaktion gewährleistet und unspezifische Interaktion der RNA mit der Festphase ausschließt. Es konnte schon gezeigt werden, daß die Verwendung einer photolytischen Spaltstelle die Anreicherung von Katalysatoren vereinfachte [Sengle, unveröffentlichte Ergebnisse].

Mit der Verwendung eines biotinylierten Dinucleotidanalogs konnte die Kompatibilität mit den enzymatischen Reaktionen (Ligation mit T₄-RNA-Ligase und Reverse Transkription) sowie die schonende Laserspaltung gezeigt werden. Er sollte sich also für *in vitro* Selektionsexperimente eignen.

Mit den NHS-Estern der Uracil-6-carbonsäure bzw. der Nicotinsäure konnte dieses Dinucleotidanalogs effizient mit diesen Nucleobasen durch Umesterung derivatisiert werden.

Die T₄-RNA-ligasevermittelte ortsspezifische Einführung jener potentielle Reaktanden tragenden Linker konnte auch an diesen Beispielen gezeigt

werden. Die Ligationsergebnisse waren vergleichbar zu der des bislang beschriebenen biotinylierten Linkers. Der universelle Einsatz dieser Dinucleotidanaloga wird hierdurch hervorgehoben.

Mithilfe eines eine cis-diol-Gruppe tragenden Linkers konnte ein spezifisches Selektionsschema zur Anreicherung von Katalysatoren der N-glycosidischen Bindungsknüpfung ausgearbeitet werden.

Das Selektionsprotokoll umfaßt die Ligation der randomisierten RNA-Bibliothek mit den nucleobasenderivatisierten Linkern, die Inkubation mit dem aktivierten Zuckerphosphat PRPP, die nachfolgende Periodatoxidation und Immobilisierung auf einer hydrazidderivatisierten Festphase und anschließende Laserspaltung, die eine Verringerung der Komplexität der kombinatorischen RNA-Bibliothek um den Faktor von etwa 10^3 gewährleistete. Die alternativ in einigen Selektionsrunden angewendete Methode der Affinitätsgelelektrophorese durch Copolymerisation von APB in denaturierende PAGE führte zu einer etwas geringeren Reduzierung der Komplexität von etwa 10^2 , bietet aber großes Potential bei der Charakterisierung von RNA-Katalysatoren der N-glycosidischen Bindungsknüpfung.

Die Durchführung der eigentlichen Selektionen führte jedoch in keinem der beiden untersuchten Fälle – auch bei deren Wiederholung nach 10-12 Selektionscyclen – zur Anreicherung von Katalysatoren.

Parallel zu unserer Arbeitsgruppe untersuchten Unrau & Bartel die RNA-vermittelte Synthese ihrer eigenen Bausteine und konnten nach 11 Selektionsrunden 3 Sequenzfamilien einer Thiouridinsynthetase isolieren [Unrau, 1998]. Sie verwendeten eine RNA-Bibliothek mit einer randomisierten Region von 228 Basen, die also fast doppelt so lang ist wie die in unserem Labor verwendete von 120 nt.

Als RNA-gebundenen Reaktanden führten sie den aktivierten Zucker über Ligation ein – jede RNA-Species war also schon von vornherein aktiviert –, während sie als zweiten Reaktanden 4-Thio-Uracil verwendeten und so auf die Anknüpfung einer Thiol-Funktion selektieren konnten.

Bei den von ihnen gefundenen Ribozymen scheiterten die durchgeführten Verkürzungsexperimente, was daraufhin deutet, daß die RNA für die Ausführung dieser komplexen Aufgabe Strukturen benötigt, die in unserer Bibliothek aufgrund ihrer vergleichsweise kurzen randomisierten Region möglicherweise nicht ausgebildet werden konnten.

Allerdings konnten Unrau & Bartel mit ihrem Ribozym auch keinen multiplen Turnover nachweisen.

Mit der Verwendung unseres Linkers, der über eine lange flexible PEG-Kette verfügt, könnte es möglich sein, Species zu finden, die die Reaktion auch intermolekular katalysieren können. Diese Erweiterung von intra- zur intermolekularen Katalyse konnte am Diels-Alder Ribozym schon gezeigt werden [Seelig, Keiper, Stuhlmann, Jäschke, unveröffentlichte Ergebnisse]. Möglicherweise wäre es uns mit dem Einsatz eines deutlich längeren Pools gelungen [Wedel, 1996; Sabeti, 1997], Katalysatoren der N-glycosidischen Bindungsknüpfung in unserem Selektionssystem anzureichern. Andererseits waren auch RNA-Bibliotheken mit einem Bereich von 100 Nucleotiden ausreichend, um die Selektion von Katalysatoren für Reaktionen zwischen zwei kleinen organischen Reaktanden zu erlauben [Wiegand, 1997; Tarasow, 1997]

5.2 Entwicklung eines Sensorsystem zur Bestimmung von Theophyllinkonzentrationen

Allosterische Ribozyme kombinieren präzise molekulare Erkennung mit ihrem katalytischen Potential in einer dynamischen Weise, daß sie sich prinzipiell für den Einsatz als Biosensoren für eine Anzahl von Zielmolekülen eignen sollten. Der Aufbau dieser allosterischen Ribozyme ist dreigeteilt und besteht aus der Substraterkennungsdomäne, dem Kommunikationsmodul und dem Hammerheadribozym als katalytischer Domäne. Der große Erfolg der *in vitro* Selektion von Aptameren zeigte die ganze Bandbreite der unterschiedlichsten Substanzklassen, die von RNA-Molekülen erkannt werden können [Schwienhorst, 1999]. Diese Aptamere können natürlich auch Verwendung als Substraterkennungsdomäne finden. Das System funktioniert tatsächlich unabhängig von der Substanzklasse [Soukup, 1999b].

Ausgehend von dem allosterischen Ribozym HH76, das gegen Theophyllin gerichtet ist, sollte ein System zur Detektion von Theophyllin entwickelt werden.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Spaltaktivität des Ribozyms von dem Analyten konnte gezeigt und auf dieser Basis ein intermolekulares System entwickelt werden (Abb. 22). Mechanistisch gesehen ist es ein verändertes Basenpaarungsmuster in der Helix II, welches die Reaktion potenziert bzw. inhibiert (Abb. 27). Durch die Bindung des Liganden wird eine Konformationsänderung induziert bzw. die Tertiärstruktur der Aptamerregion stabilisiert. Dadurch wird der eine Strang gegen den Gegenstrang um ein Nucleotid verschoben.

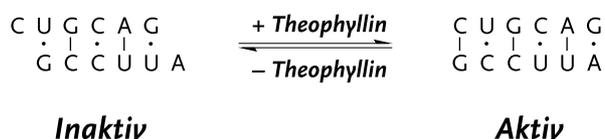


Abb. 27: Mechanismus der theophyllininduzierten Neuordnung der Basenpaarung in der Helix II

Der Substratstrang ist ein 13 nt RNA-Oligomer, welches 3'-fluoresceinmarkiert ist und am 5'-Ende eine Dabcylmodifikation enthält. Die Fluoreszenz des Fluoresceins wird durch die räumliche Nähe zu dem Fluoreszenzquencher Dabcyl intramolekular gelöscht.

Die aktive Ribozymeinheit SWI 58 besteht aus einer 58 Nucleotide langen RNA, die über die Theophyllinaptamerregion verfügt und mit dem zum Substratstrang komplementären Hammerheadribozym über das Kommunikationsmodul verbunden ist. Es wurde darauf geachtet, daß die komplementären Bereiche arm an helixstabilisierenden G-C -Basenpaaren sind, um nicht die Produktabdissoziation zu hemmen. Bei erfolgter Spaltung und Dissoziation der Spaltprodukte wird Fluoreszenz als zeitlich zu verfolgendes Signal freigesetzt, da die Fluoreszenzquenchung durch den Dabcylrest deutlich verringert wird. Nach der Förster-Gleichung ist die Fluoreszenzintensität der 6. Potenz des räumlichen Abstands des Fluoreszenz-Quencher-Paares proportional.

Es konnte aber festgestellt werden, daß Coffein unseren entwickelten Sensor nicht beeinflußt. Die Theophyllinspezifität blieb also auch trotz des angebundenen Ribozymteils erhalten.

Es ist hiermit gelungen, ein biologisch relevantes Molekül – das Hammerheadribozym – strukturell zu verändern und auf dessen Basis ein potentes und potentiell vielseitig einsetzbares dynamisches System zur Bestimmung von Analyten zu etablieren. Es bildet sicherlich eine gute Grundlage für weitere Untersuchungen und Verbesserungen, da es wünschenswert wäre, auch in niedrigere Konzentrationsbereiche des Analyten vordringen zu können. Hier bieten sich vor allem die Techniken der *in vitro* Selektion und Evolution an. Prinzipiell sollte es auch möglich sein, das Spiegelbild des hier eingesetzten Ribozym- und Substratstranges einzusetzen, da der Analyt Theophyllin ein nicht chirales Molekül ist und die L-Ribonucleotide nicht durch die in biologischen Flüssigkeiten vorhandenen Nucleasen abgebaut werden können.