

## 4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung eines partiell charakterisierten Nukleotids, das aus der Nebenniere von Rindern isoliert wurde. Im Laufe der vorangegangenen Untersuchungen konnte mit Hilfe der MALDI-MS festgestellt werden, dass die Molekülmasse dieser Substanz 973 Da beträgt (Ebbert, 1999). Der Einsatz der PSD-MALDI-Massenspektrometrie erlaubte die Einordnung der Substanz als ein Tri-Ribonukleotid, bestehend aus einem Guanosinmonophosphat (GMP) und zwei Cytidinmonophosphaten (CMP). Die nach Inkubation mit der alkalischen Phosphatase aufgezeichneten MALDI- und PSD-MALDI-Massenspektren des Nukleotids bestätigten diese Vermutungen zusätzlich. Es wurde angenommen, dass die Gesamtformel der möglichen Nukleotidisomere GpCpCp lautet. Die Fragen nach der Anordnung der einzelnen Bestandteile innerhalb des Moleküls, nach den Bindungen zwischen diesen Bestandteilen und somit nach der endgültigen Molekülstruktur des untersuchten Wirkstoffs konnten noch nicht beantwortet werden. Es blieb somit auch unklar, welches der sechs theoretisch möglichen Isomeren, die in der Tabelle 9 präsentiert sind, der wahren Struktur des Trinukleotids mit dem Molekulargewicht von 973 Da entspricht.

Mit Hilfe enzymatischer Analytik sollten die noch offenen Fragen zur chemischen Struktur des gesuchten Trinukleotids in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden. Die dafür benötigten Enzyme wurden zuerst an anderen, authentischen Nukleotiden getestet.

In dieser Arbeit wurde eine neue biochemisch-analytische Methodenkombination entwickelt, um mit dieser Methode die noch nicht geklärten Fragen zur Struktur des aus der Rinder-Nebenniere isolierten Nukleotids zu beantworten. Die Neuheit der Methode besteht darin, dass die zu analysierende Substanz mit einem immobilisierten Enzym in salzfreier wässriger Lösung inkubiert wird. Durch diese Maßnahme gelingt es, die Zwischen- und Endprodukte einer spezifischen enzymatischen Spaltung zu erhalten, die anschließend mit der MALDI-MS nachgewiesen werden können. Wird nach der Inkubation der zu analysierenden Substanz die Masse der erwarteten Reaktionsprodukte gemessen, so geht man davon aus, dass die vermutete funktionelle Gruppe von dem Enzym umgesetzt wurde. Damit gilt als

nachgewiesen, dass die untersuchte Substanz diese funktionelle Gruppe in ihrer Struktur beinhaltet. Es wurden auch Enzyme verwendet, die keine funktionellen Gruppen umsetzen, sondern bestimmte chemische Bindungen spezifisch spalten. Auch in diesen Fällen wurde durch die MALDI-Analyse überprüft, ob sich die erwarteten Reaktionsprodukte nachweisen lassen.

Die in dieser Arbeit neu entwickelte Methode wurde zuerst an bekannten Nukleotiden getestet. Die dazugehörigen MALDI-Massenspektren sind in den Abbildungen 8-17 dargestellt. Die Tabellen 1-8 geben eine Übersicht über die Interpretationen der darin enthaltenen Signale.

Die alkalische Phosphatase wurde an dem Coenzym A-Glutathion-Disulfid (CoASSG) getestet. Die alkalische Phosphatase spaltet von Molekülen mit einer endständigen Phosphatgruppe einen Phosphatrest mit der Molekülmasse von 80 Da ab. Somit kann die Aktivität dieses Enzyms z.B. MALDI-massenspektrometrisch nachgewiesen werden, indem beim Vergleich der Substanzspektren vor und nach der Enzyminkubation ein Signal mit der Molekülmasse [Substanzmolekülmasse – 80 Da] festgestellt wird. In der Abbildung 8, die das MALDI-Massenspektrum des CoASSG wiedergibt, sieht man seine Molekülmasse von 1073.67 Da. Die Abbildung 9 zeigt das MALDI-Massenspektrum des CoASSG nach seiner Inkubation mit der alkalischen Phosphatase. Hier taucht ein Signal mit der Molekülmasse von 993.55 Da auf, das sich genau um 80 Da von dem CoASSG-Molekül unterscheidet. Damit handelt es sich bei diesem Signal um das Dephospho-CoASSG. Die Aktivität der immobilisierten alkalischen Phosphatase gilt somit als nachgewiesen.

Die NADase wurde an einem NAD-Molekül getestet. Es wurde erwartet, dass während der enzymatischen Reaktion ein Nicotinamid-Fragment abgespalten wird, dessen Molekülmasse 122.0 Da beträgt. Die Abbildung 10 präsentiert ein MALDI-Massenspektrum des Nicotinamidsäure-Adenin-Dinukleotids (NAD); die Abbildung 11 ist ein vergrößerter Ausschnitt daraus. In diesem Spektrum sieht man die Masse eines NAD-Moleküls, die 664.4 Da beträgt. Die Abbildungen 12 und 13 zeigen Massenspektren des NAD nach seiner Inkubation mit der NADase. In der Abbildung 12 kommt das erwartete Signal mit der Masse von 122 Da vor; außerdem ist in den Abbildungen 12 und 13 ein Signal mit der Masse von

542.1 Da zu sehen, welches die Molekülmasse von [NAD – Nicotinamid] darstellt. Das beweist, dass das NAD-Molekül durch die NADase gespalten wurde. Das getestete Enzym ist also auch in seiner immobilisierten Form funktionsfähig.

Die Aktivität der immobilisierten 3'-Phosphodiesterase wurde an dem Trinukleotid ApCpC getestet. Um die Aktivität dieses Enzyms nachzuweisen, sollte gezeigt werden, dass das Testmolekül vom 3'-Ende her gespalten wurde. In der Abbildung 14 sieht man die Molekülmasse von ApCpC, die 878.6 Da beträgt. In der Abbildung 15 ist das MALDI-Massenspektrum dieses Trinukleotids nach seiner Inkubation mit der 3'-Phosphodiesterase dargestellt. Wie man der Tabelle 6 entnehmen kann, wurde das Signal mit der Masse von 549.10 Da durch ein CpC-Molekül verursacht. Die Differenz zu der Masse des ursprünglichen ApCpC-Moleküls beträgt 392.32 Da, was einem [AMP – H<sub>2</sub>O]-Element entspricht. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das ApCpC-Molekül durch die 3'-Phosphodiesterase in CpC und [AMP – H<sub>2</sub>O] gespalten wurde. Die Aktivität der immobilisierten 3'-Phosphodiesterase ist somit nachgewiesen.

Die Aktivität der immobilisierten 5'-Phosphodiesterase wurde anhand des Dinukleotids Ap<sub>5</sub>A getestet. Es wurde erwartet, dass die Ausgangssubstanz durch das Enzym vom 5'-Ende her gespalten wird. In der Abbildung 16 ist das Massenspektrum des Dinukleotids Ap<sub>5</sub>A vor der Inkubation, in der Abbildung 17 das nach der Inkubation mit der 5'-Phosphodiesterase präsentiert. Den Tabellen 7 und 8 kann man die Interpretationen der darin enthaltenen Signale entnehmen: 917 Da ist die Molekülmasse von Ap<sub>5</sub>A, 348 Da ist die des Adenosinmonophosphats (AMP) und 587.7 Da ist die Masse von Ap<sub>4</sub>. Die Summe der beiden letzteren Massen ergibt [917 + 18] Da, was der Molekülmasse von Ap<sub>5</sub>A plus der eines Wassermoleküls entspricht. Daraus folgt, dass die 5'-Phosphodiesterase das Ap<sub>5</sub>A-Molekül in ein AMP- und ein Ap<sub>4</sub>-Fragment unter Einlagerung eines H<sub>2</sub>O-Moleküls gespalten hat. Dies beweist die Funktionstüchtigkeit des immobilisierten Enzyms.

Die Abbildung 18 zeigt das PSD-MALDI-Gesamtmassenspektrum des zu untersuchenden Trinukleotids mit dem Molekulargewicht von 973 Da. Die Interpretationen der Signale dieses Spektrums liefern Informationen über das komplette, noch nicht gespalte Trinukleotidmolekül, das in den Interpretationstabellen als M bezeichnet wird. Wie man der

Tabelle 10 entnehmen kann, beträgt die Gesamtmolekülmasse des Nukleotids 973.92 Da, was der berechneten Masse des GpCpCp von 974.0 Da entspricht. Unter Molekülfragmenten befinden sich Cytosin (= 112.29 Da), Guanin (= 152.29 Da), Cytidin – 2 H<sub>2</sub>O (= 209.11 Da), Cytidinmonophosphat (CMP) (= 325.33 Da), Diphosphodiribose (RpRp) (= 390.28 Da) und Cytidindiphosphat (CDP) (= 405.14 Da). Zu diesen Fragmenten korrespondiert die Existenz von Molekülfragmenten M – Cytosin (= 865.00 Da), M – G – CMP (= 500.37 Da), M – Cytidin – H<sub>2</sub>O (= 714.05 Da), M – CMP (= 652.86 Da) und M – CDP (= 572.57 Da). Diese Ergebnisse stützen die Annahme der Gesamtformel GpCpCp des untersuchten Trinukleotids.

In der Abbildung 19 ist das MALDI-Massenspektrum des Trinukleotids nach seiner Inkubation mit der alkalischen Phosphatase dargestellt. Außer dem Gesamtnukleotid mit der Masse von 975.11 Da sieht man hier eine Substanz mit der Molekülmasse von 895.06 Da. Die Differenz beträgt hierbei 80.05 Da; das entspricht der Masse eines anorganischen Phosphatrestes (= 80 Da). Da die alkalische Phosphatase nur randständige Phosphatgruppen abspalten kann, beweist dies, dass die untersuchte Substanz eine solche Phosphatgruppe besitzt. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der Arbeit „Isolierung und Identifizierung von Isomeren des Trinukleotids GCC aus der bovinen Nebenniere“ von Stefanie Ebbert.

Nach der Inkubation des Nukleotids mit der alkalischen Phosphatase wurde das PSD-MALDI-Massenspektrum der Abbildung 20 aufgezeichnet. Die Tabelle 12 liefert die Interpretationen der Molekülfragmente dieses Spektrums. Das Signal mit der Masse von 895.53 Da entspricht dem Gesamtmolekül mit einem abgespaltenen Phosphatrest: M – H<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> (= GpCpC). Es sind auch andere Molekülfragmente zu sehen, die sich von den im PSD-MALDI-Massenspektrum der Abbildung 18 dargestellten Signalen um 80 Da unterscheiden und somit durch die Aktivität der alkalischen Phosphatase entstanden sind: RpR mit der Masse 310.00 Da, CDP + 2 H<sub>2</sub>O (438.80 Da), M – CDP + H<sub>2</sub>O (590.29 Da), M – CMP – H<sub>2</sub>O (633.68 Da), M – GMP + H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>+</sup> + 3 H<sub>2</sub>O (761.3 Da) und M – G – 2 H<sub>2</sub>O (785.87 Da). Die Existenz der Fragmente CDP (= 404.24 Da) und M – CDP (= 573.15 Da) bei gleichzeitiger Abwesenheit von Fragmenten GDP oder M – GDP spricht für die Annahme der Strukturformel pCpCpG oder GpCpCp (Strukturisomere 1 und 2 der Tabelle 9).

Die Inkubation des Moleküls mit dem Molekulargewicht von 973 Da mit der 3'-Phosphodiesterase führte zur Entstehung von drei Endreaktionsprodukten: GpCp mit der Molekülmasse von 670.2 Da, GpC (589.74 Da) und die CMP-Ribose (456.53 Da) (siehe Abb. 21-23).

Die Abbildung 21 präsentiert ein PSD-MALDI-Massenspektrum des Trinukleotids nach seiner Inkubation mit der 3'-Phosphodiesterase. Dieses Enzym besitzt Spezifität für Phosphoesterbindungen mit der 3'-Ribose. Wie man der Tabelle 13 entnehmen kann, wurde das Signal mit der Masse 670.2 Da als  $M - \text{CMP} + \text{H}_2\text{O}$  (= GpCp) interpretiert. Die Entstehung dieses Signals bedeutet, dass das untersuchte Nukleotid durch die 3'-Phosphodiesterase gespalten wurde, und dass es folglich über eine 3'-Phosphoesterbindung verfügt. Da dabei ein  $\text{C}^3\text{MP}$ -Fragment abgespalten wurde, und weil ein phosphatbesetztes 3'-Ende die 3'-Phosphodiesterase hemmt, könnte es sich bei dem gesuchten Nukleotid nur um die pCpGpC - oder pGpCpC -Isomere handeln (Strukturvorschlag 3 bzw. 5 der Tabelle 9), wobei der Strukturvorschlag 3 durch Arbeit von Ebbert mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden konnte (s. Einleitung der vorliegenden Dissertation).

Das zweite Reaktionsprodukt, das nach weiterer Substanzinkubation mit der 3'-Phosphodiesterase entstand, ist in dem PSD-MALDI-Massenspektrum der Abbildung 22 dargestellt. In der Tabelle 14 wird das Signal mit der Masse 589.74 Da dem Molekülfragment  $M - \text{CDP} + \text{H}_2\text{O}$  (= GpC) zugeordnet. Die Existenz dieses Signals zeugt davon, dass das gesuchte Trinukleotid eine zweite 3'-Phosphoesterbindung besitzt, die durch die 3'-Phosphodiesterase gespalten wurde. Die Abspaltung eines  $\text{C}^3\text{DP}$ -Fragmentes ist nur erklärbar, wenn man von den Strukturmodellen pCpCpG oder GpCpCp ausgeht (die Isomeren 1 und 2 der Tabelle 9).

Die Abbildung 23 zeigt das MALDI-Massenspektrum, welches das dritte Reaktionsprodukt enthält, das nach weiterer Inkubation des untersuchten Trinukleotids mit der 3'-Phosphodiesterase entstanden ist. Laut Tabelle 15 entspricht das Signal mit der Masse 456.53 Da dem Molekülfragment  $M - \text{GDP} - \text{C} + 2 \text{H}_2\text{O}$  (= CMP-Ribose). Damit ein  $\text{G}^3\text{DP}$ -Fragment abgespalten werden konnte, muss es sich bei dem Trinukleotid um das cGpCpC- oder CpCpGp-Isomere gehandelt haben (Strukturvorschläge 5 und 6 der Tabelle 9).

Im nächsten Versuch wurde die zu untersuchende Substanz mit der 5'-Phosphodiesterase inkubiert. Dabei entstanden drei Endreaktionsprodukte: ein Molekülfragment  $M - G - H_2PO_4$  mit der Molekularmasse von 727.9 Da, ein CDP-Molekül (405.36 Da) und ein GMP-Molekül (364.19 Da) (s. Abb. 24-26).

Die Abbildung 24 zeigt das PSD-MALDI-Massenspektrum des ersten Reaktionsproduktes. Das Signal mit der Masse 727.9 Da wird in der Tabelle 16 als  $M - G - H_2PO_4^+$  interpretiert. Anhand dieses Versuchs kann man keine Struktureingrenzungen vornehmen.

Ein weiteres Reaktionsprodukt, das nach der Inkubation des Trinukleotids mit der 5'-Phosphodiesterase entstand, präsentiert das in der Abbildung 25 dargestellte PSD-MALDI-Massenspektrum. Wie die Tabelle 17 aufzeigt, wurde das Signal mit der Masse von 405.36 Da durch ein CDP-Molekül verursacht. Das abgespaltene  $C^{5'}DP$ -Teilmolekül spricht für das pCpCpG als Ursprungssubstanz (Strukturvorschläge 1 und 2 der Tabelle 9).

Die dritte PSD-MALDI-Messung nach der Inkubation des gesuchten Wirkstoffs mit der 5'-Phosphodiesterase ergab das in der Abbildung 26 zu sehende Massenspektrum. Der Tabelle 18 kann entnommen werden, dass es sich bei dem Signal mit der Masse 364.19 Da um ein GMP-Molekül handelt. Das  $G^{5'}MP$ -Fragment konnte entweder aus dem GpCpCp- oder dem CpCpGp-Molekül abgespalten werden (Isomere 1 und 5 der Tabelle 9).

Da sich im Verlauf der durchgeführten Untersuchungen die Isomeren 1, 2, 5 und 6 der Tabelle 9 als theoretisch mögliche Strukturformeln des isolierten Trinukleotids mit dem Molekulargewicht von 973 Da erwiesen, ist es nicht möglich, die Struktur der untersuchten Substanz eindeutig zu identifizieren. Das Vorkommen mehrerer Isomeren in MALDI-Massenspektren der gleichen Substanz legt die Vermutung nahe, dass der isolierte Wirkstoff keine reine Substanz, sondern ein Isomerengemisch darstellt.

Im Zusammenhang mit der Erkenntnis, dass es sich bei dem aus der bovinen Nebenniere isolierten Molekül der Masse 973 Da um Isomere des Trinukleotids pCCG handelt, können verschiedene allgemeinere Fragestellungen behandelt werden:

1. Woher stammen die Ribonukleotide?
2. Welche Funktionen erfüllen die nachgewiesenen Ribonukleotide innerhalb des Organismus?
3. Wie werden diese Trinukleotide metabolisiert?

Ad 1. Es sind zwei grundsätzliche Wege der Ribonukleotidentstehung im Organismus vorstellbar. Zum einen kann es sich bei diesen Trinukleotiden um Abbauprodukte von mRNA handeln, zum anderen könnten sie auf dem Wege einer Neusynthese entstehen.

Im Falle einer Synthese sind wiederum zwei Möglichkeiten denkbar. Trinukleotide könnten aus energiereichen Mononukleotiden, wie beispielsweise ATP, im Zytoplasma der Zellen synthetisiert werden. Die andere Möglichkeit wäre, dass Trinukleotide auf der DNA kodiert sind und nach der Transkription auf den mRNA-Strängen erscheinen. Anschließend könnten diese Stränge in einzelne Tri-Ribonukleotide enzymatisch hydrolisiert werden.

Ad 2. Wenn man von der Hypothese ausgeht, dass die nachgewiesenen Trinukleotide in der Zelle keine Metabolismusprodukte sind, stellt sich die Frage nach der Funktion dieser Substanzen innerhalb des Organismus. Man könnte sich unterschiedliche Aufgabenbereiche der Trinukleotide vorstellen. Sie könnten am Energiestoffwechsel der Zelle beteiligt sein, im Bereich des Erbguts eine wichtige Rolle spielen oder als Botenstoffe der Signaltransduktion im Organismus dienen.

Es ist vorstellbar, dass Trinukleotide Teile der Introns darstellen. Introns sind nichtcodierende DNA-Sequenzen, von denen codierende Abschnitte (Exons) der Eukaryontengene unterbrochen sind. Die Größe der Intronbereiche schwankt von 100 Basenpaar bis weit über 10 000 bp. Die DNA-Menge der Introns übertrifft im Allgemeinen die der Exons.

Die RNA entsteht, indem einzelne Gene transkribiert werden. Dabei entstehen zuerst heterogene Kern-RNA-Stränge (hnRNA), die in den meisten Fällen genauso lang sind wie die Gene, an denen sie gebildet wurden. Die intervenierenden Intronsequenzen sind in dem gesamten Genom in unterschiedlicher Anzahl und Größe enthalten, das erklärt unter anderem die beträchtliche Lage und Heterogenität der RNA im Zellkern der Eukaryonten. Die nach der Gentranskription entstehenden Primärtranskripte werden anschließend prozessiert, das heißt,

im Zellkern findet das Spleißen der hnRNA statt, bei dem die Intronsequenzen aus dem Transkript entfernt werden. Das Ergebnis dieses Spleißvorgangs ist die reife mRNA, die somit die einzelnen Exons der kopierten Gene in ihrer ursprünglichen Reihenfolge und ohne Intronintervention darstellt. Die Translation der mRNA an den Ribosomen führt schließlich zur Synthese biologisch aktiver Proteine.

Die Funktion der herausgespleißten Introns ist bis heute nicht geklärt. Die nicht codierenden Abschnitte machen bis zu 80% der hnRNA aus und werden innerhalb weniger Minuten nach ihrer Entstehung durch Nucleasen hydrolysiert. So scheint es ein verschwenderischer Prozess zu sein, dass nur 20% der hnRNA in mRNA umgewandelt werden. Wenn man annehmen würde, dass die isolierten Trinukleotide Bestandteile der Introns sind, käme man einer Erklärung dieses Phänomens näher. In diesem Fall entstünden beim Zusammenschneiden der mRNA gleichzeitig auch Botenstoffe in Form kurzkettiger RNA-Moleküle, die zum Beispiel eine weitere Translation des Proteins induzieren oder inhibieren könnten.

Außer den Introns enthalten die Eukaryontengenome auch andere vielzählige und scheinbar nicht essentielle Sequenzen, die in der Regel keine Proteine codieren. Es handelt sich dabei um sogenannte repetitive Sequenzen, die 30% des Erbguts betragen. Die Funktion vieler dieser Sequenzen ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig erforscht. Es stellt sich die Frage, ob die Tri-Ribonukleotide in dieser Form auf der DNA codiert sein könnten.

Ein Drittel von diesen sich wiederholenden DNA-Abschnitten bilden hochrepetitive Sequenzen, d.h. Sequenzen von 6-250 bp Länge, die als Satelliten-DNA bezeichnet werden. Satelliten-DNA wird für gewöhnlich nicht transkribiert. Ein Beispiel für die Satelliten-DNA stellt das konstitutive Heterochromatin dar, das mit der Zentromerregion assoziiert ist.

Die restlichen zwei Drittel der repetitiven Sequenzen des Genoms werden als einfach repetitiv bezeichnet. Sie bestehen aus 300 bis 400 bp, und ihre Aufeinanderfolge wird durch einmalige Sequenzen unterbrochen (interspersed repeated sequences). Sie können über das gesamte Chromosom verteilt sein. Diese verstreut liegenden Sequenzwiederholungen werden hauptsächlich nach ihren Repeat-Längen unterteilt. Danach enthalten die SINEs (short interspersed repeats) Sequenzen von 100 bis 600 bp und die LINEs (long interspersed repeats) Einzelsequenzen von 6000 bp und mehr.



Gleich orientierte Sequenzwiederholungen innerhalb eines DNA-Moleküls werden als direkte Sequenzwiederholungen (direct repeats) bezeichnet. Sind solche repetitiven Sequenzen ohne Unterbrechung hintereinander angeordnet, nennt man sie Tandemwiederholungen. Diese finden sich häufig zwischen Genen und in Introns. Zahlreiche Gene für rRNA sind in Tandemform hintereinandergeschaltet und befinden sich auf den kurzen Armen aller Satelliten-DNA-tragenden Chromosomen, mit Ausnahme des Y-Chromosoms.

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen repetitiven Sequenzen und den Tri-Ribonukleotiden erregen besonders die verstreut liegenden Sequenzwiederholungen die Aufmerksamkeit.

Die Frage danach, ob die gefundenen Trinukleotide Spaltprodukte der mRNA darstellen, könnte man angehen, indem man in weiterführenden Studien die Datenbank von Genkartierungen nach repetitiven Trinukleotid-Sequenzen kritisch durchsehen würde.

Es ist zwar theoretisch auch möglich, dass ein Trinukleotid, welches innerhalb der DNA einzeln codiert ist, beliebig oft transkribiert wird. Es erscheint jedoch Erfolg versprechender, nach repetitiven Trinukleotid-Sequenzen zu suchen.

Sollte sich die These bestätigt finden, dass die Triribonukleotide von repetitiven DNA-Sequenzen abstammen, könnte ein kausaler Bezug zu manchen Erbkrankheiten angenommen werden. Es sind nämlich heutzutage eine Reihe so genannter „Trinucleotide-Repeat-Krankheiten“ bekannt, die alle dominant vererbt werden. Charakteristisch für diese Erkrankungen ist, dass die Schwere der Symptomausprägung mit der Länge der expandierenden Triplet-Repeats positiv korreliert (Singer, 1998). Bei Gesunden kommen meistens zwischen 5 und 40 sich wiederholende Nukleotid-Triplets vor, während klinisch unauffällige Überträger solcher Krankheiten 50 bis 150 lange, als Prämutation bezeichnete, Repeats aufweisen. Die Länge dieser Nucleotide-Triplet-Repeats ist keine stabile Größe, sie nimmt mit jeder Generation zu.

Bei klinisch manifesten Patienten ist die Länge der Triplet-Wiederholungen je nach Erkrankung und jeweiliger Ausprägung unterschiedlich. Beispielsweise besteht die Mutation bei der myotonen Dystrophie in einer Expansion von 200-2000 CTG-Trinukleotid-Repeats auf dem Chromosomen-Locus 19q13.3 (Kramer et al., 1996). Bei Chorea Huntington finden

sich expandierende CAG-Repeats auf dem Chromosom 4p15.1 (Persichetti et al., 1995; Jenkins et al., 1998). Bei der spinobulbären Muskelatrophie Typ Kennedy wiederholen sich ebenfalls die CAG-Trinukleotid-Repeats, jedoch sind sie bei dieser Krankheit auf dem Xq12-Chromosom lokalisiert (aus Löffler & Petrides, 1997). Das Krankheitsbild des fragilen X-Chromosoms (Martin-Bell-Syndrom) ist mit einer CGG-Wiederholung auf dem X-Chromosom vergesellschaftet (aus Löffler & Petrides, 1997).

Die Nukleotid-Triplet-Repeats sind sowohl innerhalb als auch außerhalb des betroffenen Gens anzutreffen. Im Zusammenhang mit der aufgestellten Hypothese, dass die isolierten Trinukleotide aus repetitiven Introns stammen, erscheinen die myotone Dystrophie und das Syndrom des fragilen X-Chromosoms besonders interessant. Bei diesen beiden Erkrankungen befinden sich die oben genannten Trinukleotid-Wiederholungen auf nichtcodierenden Genabschnitten. Somit könnte keine Translation dieser Triplets in schädigende Proteine die Krankheitsursache darstellen.

Ad 2b. Die Trinukleotide könnten nach ihrer Entstehung im Organismus als Botenstoffe wirksam werden. Sie könnten an der intra- und extrazellulären Signaltransduktion beteiligt sein, indem sie an Rezeptoren binden.

Bei einigen Nukleotiden sind die Funktionen bereits bekannt. So sind beispielsweise Purinnukleotide als extrazelluläre Signalmoleküle von großer Bedeutung. Von dem am besten erforschten Purinnukleosid, dem Adenosin, ist bekannt, dass es die Durchblutung vieler Gewebe reguliert. Als intrazelluläre Signalüberträger dienen die second messenger Cyclo-AMP (cAMP) und Cyclo-GMP (cGMP) (aus Löffler & Petrides, 1997). Einen weiteren Botenstoff aus der Gruppe der Nukleotidderivate stellt die Cyclo-ADP-Ribose dar. Der Wirkmechanismus der cADPR besteht darin, dass sie eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration durch Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern bewirkt. Adenosin-Cytidin-Dinukleotide (ApCp) konnten 1993 aus Neurofibrom-Typ 1-Gewebe isoliert werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass ApCp-Dinukleotide eine der Hauptkomponenten bei der Wachstumsförderung von Neuroblastomzellen darstellen (Hotta et al., 1993). Der Pathomechanismus der Entstehung der autosomal-dominant vererbten Neurofibromatosis generalisata konnte jedoch noch nicht endgültig geklärt werden. Im engen Zusammenhang mit diesen Nachforschungen steht die Frage, auf welche Weise Dinukleotide

an proliferativen Prozessen beteiligt sind. Eine Antwort darauf könnte eventuell die Annahme stützen, dass auch Trinukleotide als Signalüberträger in Zellen und Geweben wirksam sind.

Eine Beteiligung der Trinukleotide an Regulationsmechanismen im Organismus ist bei den verschiedensten Vorgängen vorstellbar. Zum Beispiel wäre es möglich, dass diese Substanzen die Funktion der Coaktivatoren bzw. Corepressoren bei der Genexpression erfüllen. In diesem Fall könnten Trinukleotide an regulatorische Proteine binden und so, eventuell durch eine Konformationsänderung ähnlich wie bei Steroidhormonen, den Transkriptionsprozess initiieren bzw. verhindern. Diese Rezeptor-Agonist-Komplexe würden Enhancer der Transkriptionsaktivität darstellen, die unabhängig von der Position und Orientierung der zugehörigen Promotoren induziert werden können. Auf diese Weise wäre eine frühzeitige Kontrolle der Genexpression gegeben. Es wäre außerdem denkbar, dass Trinukleotide an Regulierungsmechanismen der posttranslationalen Modifikationen beteiligt sind, indem sie als Ribonukleotid-Hormone durch Bindung an entsprechende Rezeptoren phosphorylierende, acetylierende, methylierende oder ADP-riboselierende Enzyme aktivieren.

Ad 3. Um die Metabolismuswege der Trinukleotide zu erforschen, markiert man sie mit Hilfe von radioaktiven Substanzen und inkubiert sie dann mit Blut, Zellen (wie z.B. Thrombozyten, Endothelzellen etc.) und Zellfraktionen (Cytosol, Membranfraktionen usw.). Auf diese Weise lassen sich zentrale Orte und eventuell Halbwertszeiten der Trinukleotid-Verstoffwechslung bestimmen. Es wäre vorstellbar, dass die isolierten Trinukleotide in Vesikeln gespeichert werden, wo sie bis zu ihrer extrazellulären Sekretion vor Hydrolyse geschützt sind. Diese Annahme wird durch die Tatsache bekräftigt, dass die Trinukleotide aus den Ursprungszellen und -geweben überhaupt isoliert werden konnten.

Das System der Ribonukleotidhormone, das hier als Hypothese formuliert wurde, kann möglicherweise das evolutionell gesehen älteste Schema der Signaltransduktion darstellen. Es wird allgemein auf Grund von verschiedenartigen Untersuchungen angenommen, dass die RNA vor der DNA existierte und die Grundlage der ersten codierenden Systeme bildete. Sowohl Prokaryonten als auch Eukaryonten besitzen RNA, wobei der mRNA, tRNA und rRNA eine zentrale Rolle in der Proteinsynthese aller Organismen und im Funktionieren des genetischen Codes zukommt. Es liegt folglich die Vermutung nahe, dass RNA-Moleküle

bereits vor der entwicklungsgeschichtlichen Trennung der Organismen in Pro- und Eukaryonten existiert haben müssen. Diese Hypothese wird durch die Entdeckung autokatalytisch aktiver RNA zusätzlich untermauert. Dabei handelt es sich um kurze RNA-Moleküle, die an einer RNA-Matrize ohne zusätzliche enzymatische Wirkung von Proteinen synthetisiert werden können. Außerdem können autokatalytisch aktive RNA-Moleküle selbst als Enzyme wirken und so die RNA verändern. So besitzen einige RNA-Moleküle die Fähigkeit, sich selbst zu spleißen. Ein Vertreter dieser RNA-Gruppe ist der 26s-rRNA-Vorläufer aus Tetrahymena. Es wäre denkbar, dass das von Spleißosomen katalysierte mRNA-Spleißen sich aus diesem älteren Prinzip des Selbstspleißens entwickelt hat (aus Stryer, 1991). Die Existenz von Ribozymen spricht ebenfalls für eine Welt von ausschließlich RNA-besitzenden Organismen in der frühen Evolutionsphase. Ein anderer Hinweis darauf ist das vermutete hohe entwicklungsgeschichtliche Alter der Introns. Es wurde die Tatsache nachgewiesen, dass in vielen Genfamilien die Zahl und Position der Introns gleich, die Länge und Sequenz hingegen variabel sind. Daraus wird die Schlussfolgerung gezogen, dass Introns genauso alt wie Urgene sind, dass sie jedoch keinem Selektionsdruck unterlagen (aus Singer & Berg, 1992). Dieses Modell findet seine Unterstützung in einer These, die die Entstehung von Genen durch Vervielfachung und Umordnung von Exons propagiert. Diese These besagt, dass Introns die zuerst entstandenen Strukturen darstellen. Die Begründung wird darin gesehen, dass Introns helfen, Exons neu zu verknüpfen, und dabei die codierenden Genomabschnitte unangetastet lassen. Bedingt durch das schnelle Wachstum und die Vermehrung soll es bei den Prokaryonten im Zuge der Zellverdopplung zu einem Intronverlust gekommen sein. Dessen ungeachtet, finden sich Introns heutzutage nicht nur in Eukaryontengen. Zum Beispiel konnten Introns in dem Gen für die Thymidylatsynthetase des Bakteriophagen T4 gefunden werden, sowie in Genen des Archaeobakteriums für tRNA<sup>Ser</sup> und für die große rRNA (aus Singer & Berg, 1992). Die Gesamtheit dieser Beobachtungen unterstützt die Hypothese des Vorhandenseins von Introns bereits in den ersten Genen. Auch die Präsenz der strukturell und eventuell auch funktionell ähnlichen Ap<sub>x</sub>A-Dinukleotide in Prokaryonten könnte ein Indiz für eine frühe Beteiligung der RNA an der Signaltransduktion in der molekulargenetischen Evolution sein.

Sollte es gelingen, das beschriebene Schema der Signalübertragung zu verifizieren, könnte dadurch ein bedeutender Beitrag zum Verständnis der evolutionären Genomentwicklung

geleistet werden. Unabhängig davon würde die Beantwortung der in der Arbeit gestellten Fragen grundlegende Zusammenhänge der intra- und extrazellulären Signaltransduktion im Organismus liefern. Außerdem könnte das zur Aufklärung von Ursachen und Pathomechanismen von vielen Erbkrankheiten führen. Im Zusammenhang mit dem aufgezeigten System der Ribonukleotid-Hormone erscheint die Tumorgenese-forschung besonders Erfolg versprechend.