

5 Diskussion

Etablierung des neuen Interferenzverfahrens

Modifikationsinterferenzanalysen wurden in den letzten Jahren erfolgreich zur Identifikation von essentiellen Wechselwirkungen in Nukleinsäuren angewandt. Diese Untersuchungen haben zu einem erweiterten Verständnis von Struktur und Funktion geführt. Darüberhinaus können Informationen, die über essentielle funktionelle Gruppen erhalten werden, dazu verwendet werden, die Funktionalität oder die Nukleaseresistenz von RNA-Molekülen zu erhöhen.

Das in dieser Arbeit entwickelte Interferenzverfahren verwendet 3'-S-Phosphorothiolate zur Markierung (*tagging*). Bei diesen Nukleinsäuren ist das 3'-Brückensauerstoffatom gegen ein Schwefelatom substituiert worden (Abb.28). Die 3'-Phosphorothiolatmodifikation wird hier als Marker benutzt, um eine zweite Modifikation zu detektieren, wenn diese einen interferierenden Effekt besitzt.

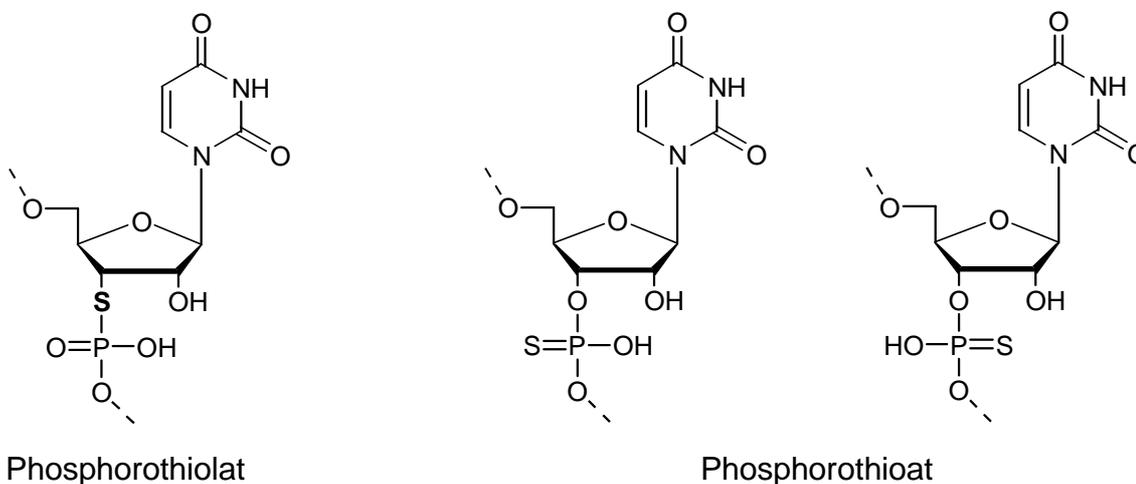


Abbildung 28: Struktur von Phosphorothiolaten und Phosphorothioaten.

Das Verfahren wurde mit partiell modifizierten Oligonukleotiden durchgeführt, die durch chemische Festphasensynthese dargestellt wurden. Die 3'-Phosphorothiolat-Internukleotid-Verbindung wurde dabei über die entsprechend modifizierten Amidite in die Oligonukleotide eingebracht. Für die modifizierten Amidite wurde der Syntheszyklus optimiert und es konnten Kopplungsausbeuten von etwa 40% erreicht werden. Anhand eines Modell-

Oligonukleotids wurden die vollständige Modifikation, die partielle Modifikation und die Spaltung durch Silberionen untersucht. Durch HPLC-Untersuchungen und Nukleosidanalysen konnte gezeigt werden, daß die Spaltung der 3'-Phosphorothiolat-Internukleotidbindung mit Silbernitrat quantitativ verläuft. Ein wichtiges Kriterium für Interferenzanalysen stellt der Modifikationsgrad der zu untersuchenden RNA-Moleküle dar, denn im statistischen Mittel sollte jedes Molekül nur eine Modifikation aufweisen^[41]. Es wurden Synthesebedingungen erarbeitet mit denen der gewünschte Modifikationsgrad erreicht werden konnte.

Das neue Verfahren wurde exemplarisch am Hammerhead-Ribozym durchgeführt. Der Effekt von 2'-Desoxymodifikationen an den Uridinen des konservierten Bereichs wurde anhand von partiell modifizierten Substratsträngen untersucht. Diese Stränge wurden zunächst der Hammerhead-Spaltung unterzogen. Der Ribozymstrang wurde mit einer Konzentration des zehnfachen K_M -Wertes eingesetzt und die Spaltung nach 20% Umsatz gestoppt. Im Anschluß wurden gespaltene und ungespaltene Substratstränge voneinander getrennt, der Silberspaltung unterzogen und durch hochauflösende, denaturierende Gelelektrophorese analysiert. Die Interferenzen konnten aus den Spaltungsmustern ermittelt werden. An den Positionen, an denen die fehlende 2'-Hydroxylgruppe einen negativen Effekt auf die Hammerhead-Spaltung ausübte, war die Bandenintensität in der Produktpur reduziert, während die Bandenintensität in der Eduktpur erhöht war. Die Vollständigkeit der Silberspaltung ermöglichte eine direkte Quantifizierung der Bandenintensitäten. Experimente mit singular modifizierten Substratsträngen lieferten die Bestätigung der Ergebnisse dieser Interferenzanalyse. Darüberhinaus konnte anhand von Kontrollexperimenten gezeigt werden, daß die 3'-S-Phosphorothiolat-Modifikation keinen Einfluß auf die Hammerhead-Aktivität ausübt.

Das neue Verfahren stellt eine Verbesserung gegenüber bisher etablierten Interferenzanalysen dar. Die ursprünglichen Interferenzverfahren beruhten auf der chemischen Modifikation von RNA mit Reagenzien wie Diethylpyrocarbonat, DMSO oder Hydrazin^[41]. Die Grenzen dieser Methoden sind allerdings schnell erreicht; es können nur jene funktionellen Gruppen analysiert werden, die für die chemischen Reagenzien zugänglich sind. Darüberhinaus besteht eine weitere Beschränkung in der Detektierbarkeit dieser Modifikationen nur über Strangspaltung oder reverse Transkription.

Eine Weiterentwicklung der Interferenzmethoden bildete der Einsatz von Phosphorothioaten^[42, 44, 48]. Die Substitution eines Nichtbrückensauerstoffatoms gegen ein Schwefelatom wird bei dieser Methode als Marker benutzt, um essentielle funktionelle Gruppen zu identifizieren. Phosphorothioatmarkierte Nukleotidanaloga werden entweder enzymatisch durch Polymerasen^[42, 48] oder über chemische Festphasensynthese^[44] in ein

RNA-Transkript eingebaut werden. Da die zu untersuchende Modifikation unabhängig von der Phosphorothioat-Markierung ist, wurden eine Vielzahl solcher Nukleotidanaloga synthetisiert und für Interferenz-Experimente mit Nukleotidanaloga (NAIM) eingesetzt^[49, 52]. Obwohl dieser Interferenzassay gegenüber den chemischen Interferenzmethoden schon enorme Vorteile besitzt, treten jedoch Schwierigkeiten auf, wenn zwischen einer Phosphorothioatinterferenz und einer Interferenz des Nukleotidanalogs unterschieden werden muß. Phosphorothioatinterferenzen treten auf, wenn die Nichtbrückensauerstoffatome an funktionellen Wechselwirkungen beteiligt sind. In diesem Fall geht jegliche Information für diese Position verloren, sie bleibt uninformativ^[52]. Dieser Effekt wird durch die Verwendung von 3'-S-Phosphorothiolaten verhindert. Im Gegensatz zu den Phosphorothioaten, bei denen durch die Schwefelsubstitution ein neues Stereozentrum am Phosphoratom generiert wird, ist das Phosphoratom der 3'-S-Phosphorothiolate achiral. Die Verwendung von Phosphorothiolaten hat gegenüber den Phosphorothioaten noch weitere, nicht zu vernachlässigenden, Vorteile. Nukleinsäuren, die eine 3'-Phosphorothiolatbindung enthalten sind isopolar und isosterisch im Vergleich zur unmodifizierten Nukleinsäure; zwei Eigenschaften, die Phosphorothioate nicht aufweisen. Ein weiterer Vorteil liegt darin, daß das 3'-Sauerstoffatom nicht maßgeblich an der Struktur oder Funktion einer Nukleinsäure beteiligt ist. Es liegt hier also eine Modifikation vor, die keinen wesentlichen Einfluß auf das native Verhalten einer RNA ausübt^[72]. Die Substitution des 3'-Sauerstoffatoms gegen ein Schwefelatom bewirkt eine Verlängerung der Bindung zwischen C3' und dem Phosphoratom des betreffenden Nukleotids um ca. 0,1 nm, infolge der Änderung der Bindungslängen: C-S 0,182 nm, C-O 0,143 nm, S-P 0,195 nm, O-P 0,157 nm^[39]. Eine Winkeländerung zwischen C3'-S-H hat zur Folge, daß sich der Abstand von Nukleophil zum reaktiven Phosphat verringert, und somit der erste Schritt der Bindungsspaltung erleichtert wird. Das intermediäre zyklische 2',3'-Phosphorothiolat kann somit stabilisiert werden, woraus wiederum eine Herabsetzung der Energie des Übergangszustands resultiert. Diese Eigenschaften stellen eine mögliche Erklärung für die quantitative Spaltung der Schwefel-Phosphorbindung durch Silberionen dar^[40]. Die vollständige Spaltbarkeit ermöglicht eine direkte Auswertung des Spaltungsmusters des neuen Interferenzverfahrens. Eine solche Auswertung ist bei der Phosphorothioat-Methode nicht möglich, da die Spaltung mit Iod nicht vollständig verläuft.

Interferenzanalyse des Hammerhead-Ribozyms

Für die Etablierung des neuen Interferenzverfahrens wurde das Hammerhead-Ribozym als Modellsystem gewählt. Aus bereits veröffentlichten Daten wurde die 2'-Hydroxylgruppe der Uridine als zu untersuchende funktionelle Gruppe gewählt. Über die 2'-Hydroxylgruppe an U16.1 ist bekannt, daß sie absolut essentiell für die Hammerhead-Spaltung ist^[65], wohingegen die 2'-Hydroxylgruppe an U7 keinen und an U4 nur einen leichten Einfluß auf die Hammerhead-Aktivität besitzt^[66, 67].

Die Interferenzanalyse wurde mit zwei unterschiedlich radioaktiv markierten Substratsträngen durchgeführt. Die 5'-markierten Substratstränge wurden für die Untersuchung der Position U16.1 verwendet, die 3'-markierten Substratstränge für die Untersuchung der Positionen U7 und U4. Als Ergebnis wurde eine eindeutige Interferenz für die Position U4 erhalten. Im Silberspaltungsgel war eine stark verminderte Bandenintensität zu erkennen. Für die Positionen U16.1 konnte dagegen keine und für U7 nur eine geringe Interferenz detektiert werden. Ein Vergleich der Bandenintensitäten zwischen Substratbahn und Produktbahn ergab für die Position U4 eine um 89% und für die Position U7 eine um 50% verminderte Intensität. Mit singular modifizierten Substratsträngen wurden *single turnover*-Kinetiken durchgeführt und die jeweiligen k_{cat} - und K_M -Werte bestimmt. Die Daten der Kinetiken konnten die Ergebnisse der Interferenzanalyse bestätigen. Ein Vergleich der k_{cat} -Werte ergab, bezogen auf das unmodifizierte Hammerhead-Ribozym, folgende Ergebnisse: das Hammerhead-Ribozym mit der dU7-Modifikation zeigte eine Aktivität von 84%, das Hammerhead-Ribozym mit der dU4-Modifikation hatte nur noch eine Aktivität von 5% und bei der dU16.1-Modifikation war keine Aktivitätsminderung zu messen.

Die Ergebnisse, die mit dem neuen Verfahren erhalten wurden und durch Experimente mit singular modifizierten Oligonukleotiden bestätigt werden konnten, zeigen Abweichungen zu vorherigen Untersuchungen^[65-67]. Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von F. Eckstein im Herbst 1999 führten zu dem Ergebnis, daß diese 2'-Hydroxylgruppe an Position U16.1, entgegen der bisherigen Annahme^[65], nicht essentiell für die Hammerhead-Spaltung ist und daher auch keine wichtige Funktion bei der Hammerhead-Katalyse haben kann^[68]. Das mit dem neuen Interferenzverfahren erhaltene Ergebnis, daß die 2'-Hydroxylgruppe an der Position U16.1 keinen Effekt auf die Hammerhead-Spaltung hat, steht im Einklang mit den Daten von F. Eckstein. Die Werte, die für die Position U4 erhalten wurden, stehen ebenfalls nicht im Einklang mit bereits beschriebenen Daten^[66]. Für diese Position gibt es keine weiteren Ergebnisse.

Es stellt sich hier die Frage, ob im Rahmen der bekannten Strukturen des Hammerhead-Ribozyms eine plausible Erklärung für die Interferenz durch die 2'-Hydroxylgruppe an Position U4 gefunden werden kann. Eine Betrachtung von essentiellen funktionellen Gruppen im Zusammenhang mit der Struktur liefert oft ein erweitertes Verständnis über die Funktion oder den Mechanismus eines komplexen Moleküls. Für das Hammerhead-Ribozym existieren mittlerweile verschiedene Röntgenkristallstrukturen, die unterschiedliche Konformationen aufweisen^[21-25, 27, 80]. In Abbildung 29 ist die aktuelle Struktur von Murray *et al.* dargestellt^[21].

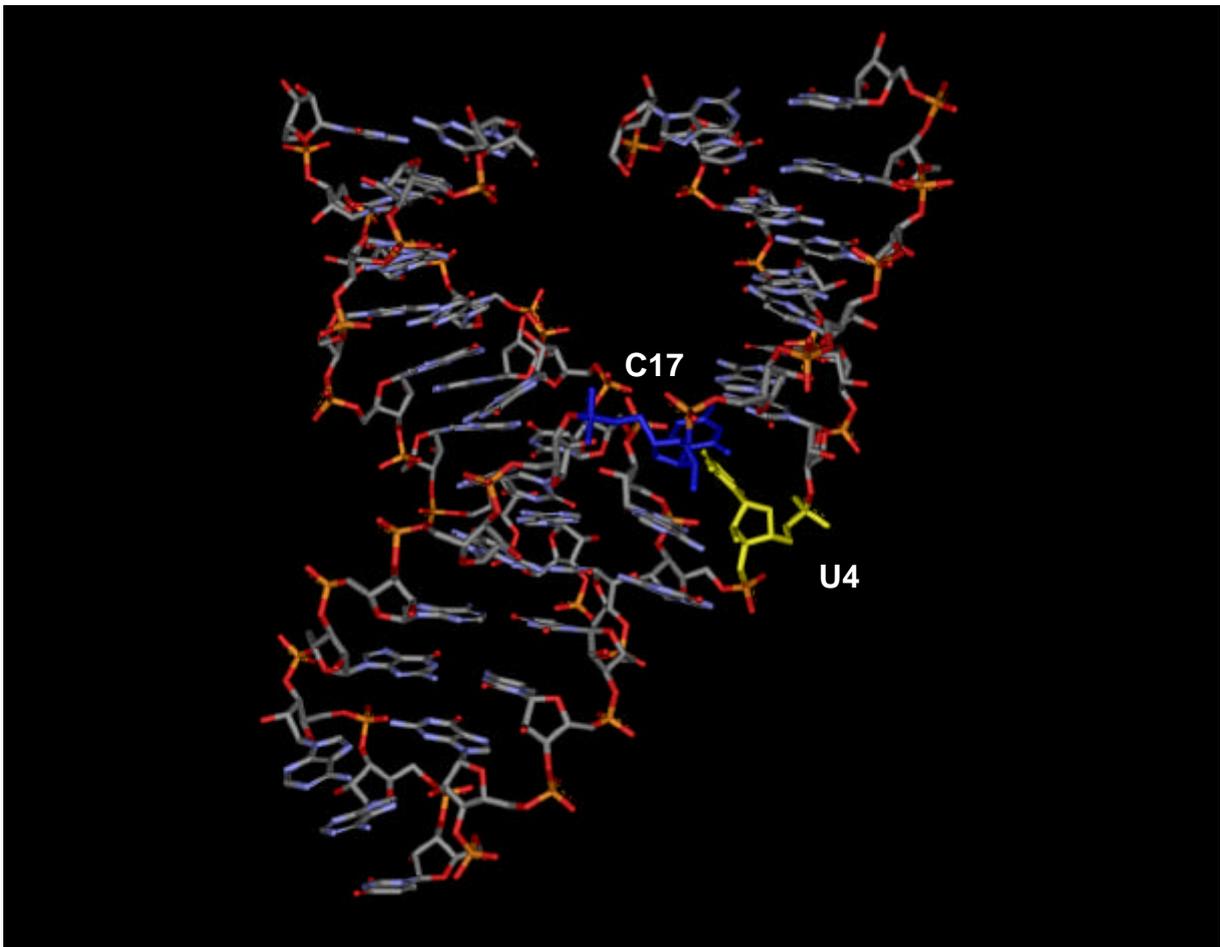


Abbildung 29: Strukturmodell des Hammerhead-Ribozyms nach Murray *et al.*^[21]. Das C17 der Spaltstelle ist blau, U4 ist gelb eingefärbt.

Die Struktur des Grundzustandes des Hammerhead-Ribozyms zeigt, daß die Spaltstelle nicht in einer Konformation vorliegt, die einen S_N2 - oder „*in-line*“-Mechanismus der Spaltung erlaubt. Für die Spaltung ist es erforderlich, daß das 2'-Sauerstoffatom an C17 mit dem Phosphoratom und dem 5'-Sauerstoffatom der Abgangsgruppe auf einer Linie liegt. Es muß eine starke Konformationsänderung stattfinden, um von Grundzustand in den aktiven Zustand

zu gelangen. Diese Konformationsänderung besteht aus einer Positionsänderung der Base und des Zuckers an der Spaltstelle um 7 Å. Dadurch wird eine Geometrie erreicht mit der ein „*in-line*“-Angriff möglich wird^[24]. Nach der Spaltung findet eine erneute Konformationsänderung statt. C17 steht dann dem Watson-Crick-Basenpaar G5-A6 der katalytischen Tasche fast senkrecht gegenüber (Abb.30)^[21].

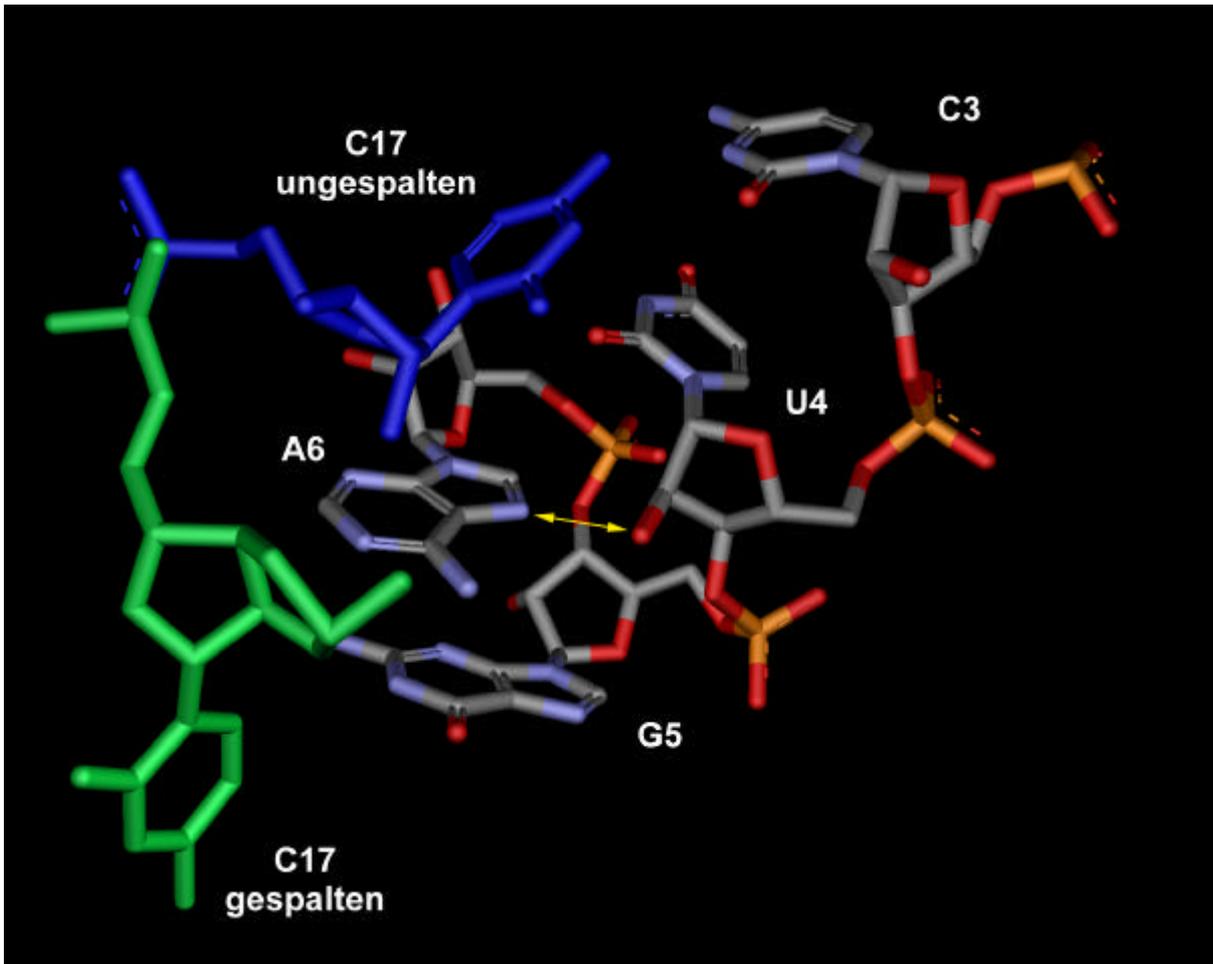


Abbildung 30: Ausschnitt aus dem Strukturmodell des Hammerhead-Ribozyms. Dargestellt ist der Bereich der Spaltstelle und des Uridin-Turns. Der gelbe Pfeil markiert die Wasserstoffbrücke zwischen der 2'-Hydroxylgruppe von U4 mit dem Stickstoffatom N7 von A6. Das Nukleotid C17 ist vor (blau) und nach (grün) der Spaltung dargestellt.

Das Hammond-Postulat besagt, daß Strukturen des Übergangszustandes bei endothermischen Reaktionen mehr die Struktur des Produktes besitzen, während bei exothermischen Reaktionen die Strukturen des Übergangszustandes die Struktur der Reaktanden besitzen^[83]. Die Daten der letzten Röntgenkristallstruktur von Murray *et al.* lassen die Annahme zu, daß einige der Wechselwirkungen, die im Ribozym-Produkt-Komplex feststellbar sind, dem Hammond-Postulat entsprechend auch im Übergangszustand auftreten. Besonders auffällig in diesem Zusammenhang ist der Uridin-Turn (U4, G5, A6, U7). Die exozyklische

Aminogruppe von A6 bildet eine Wasserstoffbrücke zu einem der Nichtbrückensauerstoffatome des pentakoordinierten Oxyphosphan-Übergangszustandes aus, und hilft so die negative Ladung zu kompensieren. Darüberhinaus gibt es Wechselwirkungen von G5 mit dem 2'-Sauerstoffatom von C17. Das Proton der 2'-Hydroxylgruppe wird auf das Sauerstoffatom 6 von G5 übertragen, die Spaltung initiiert und das Proton auf das Lösungsmittel transferiert, da die enolische Form von G5 gegenüber der ungeladenen Keto-Form energetisch benachteiligt ist^[21]. Darüberhinaus gibt es zwei stabilisierende Wasserstoffbrückenbindungen für den Uridin-Turn: (1) zwischen dem Stickstoffatom 3 von U4 und den pro- S_p -Sauerstoffatom von U7 und (2) zwischen der 2'-Hydroxylgruppe von U4 und dem Stickstoffatom 7 von A6^[80]. Diese Daten stehen im Einklang mit den Ergebnissen über die Erfordernisse von funktionellen Gruppen^[9, 66, 84-87].

Die Annahme, daß divalente Metallionen für die Funktion von Ribozymen absolut essentiell sind, konnte den Untersuchungen von Murray *et al.* nicht standhalten^[88]. Ribozyme sind auch in Gegenwart von hochkonzentrierten monovalenten Metallionen (1-4 mol/l) katalytisch aktiv. Die Rolle, die die Metallionen übernehmen muß durch diese Ergebnisse neu interpretiert werden. Die Hauptfunktion von Metallionen besteht darin, die negative Ladung des Phosphatrückgrates auszugleichen. Für die Katalyse haben sie nur eine unterstützende aber keine essentielle chemische Funktion. Die Ribozym-Modelle, die einen Durchdringungskomplex von divalenten Metallionen und RNA postulieren müssen ebenfalls neu bewertet werden. Diese Modelle beschreiben die RNA-Struktur, als ein Gerüst, in dem die katalytischen divalenten Metallionen eingepaßt werden. Die neue Interpretation geht dahin, daß Metallionen die RNA-Strukturen, die eine katalytische Funktion vermitteln, nur unterstützen.

Die mit der neuen Interferenzmethode gefundenen Daten bezüglich der 2'-Hydroxylgruppe von U4 lassen sich sehr gut mit den Daten für den Uridin-Turn in Einklang bringen. Die Wichtigkeit der Position des Stickstoffatoms 7 von A6 ist bekannt^[85]. Man kann daher davon ausgehen, daß die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der 2'-Hydroxylgruppe von U4 und dem Stickstoffatom 7 von A6 eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der aktiven Konformation des Hammerhead-Ribozyms spielt. Das Ribozym ermöglicht es sich selbst, mit Hilfe des Uridin-Turns, die katalytisch aktive Konformation zu bilden.

Ausblick

Das in dieser Arbeit vorgestellte neue Interferenzverfahren besitzt gegenüber den bisher angewandten Verfahren den Vorteil, daß die zur Markierung verwendete 3'-Phosphorothiolat-Modifikation keinen signifikanten Einfluß auf die Struktur wie auch Funktion einer RNA ausübt. Diese Interferenzmethode kann auf alle RNA- oder DNA-Moleküle angewendet werden, die sich chemisch synthetisieren und anschließend nach ihrer Funktion trennen lassen. Alle untersuchten Positionen können sofort als interferierend oder nichtinterferierend bestimmt und auch quantifiziert werden.

Die Limitation der neuen Interferenzmethoden liegt in der Beschränkung der Darstellbarkeit der Oligonukleotidlänge mittels chemischer Festphasensynthese. Um lange (> 100 nt) Oligonukleotide wie, z.B. Gruppe I-Introns, zu untersuchen wären als Ausweg Ligationstrategien denkbar. Eine andere Methode 3'-Phosphorothiolat markierte Oligonukleotide zu synthetisieren besteht im enzymatischen Einbau von Nukleosidtriphosphaten, die an der 3'-Position eine Thiolgruppe tragen. Letztere Variante hat den Vorteil, daß der zusätzliche Ligationsschritt entfällt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß das neue Interferenzverfahren eine generelle Anwendbarkeit für all jene RNA- oder DNA-Moleküle hat, bei denen nach erfolgter Reaktion Edukte und Produkte voneinander getrennt werden können. Das Tagging mit 3'-Phosphorothiolaten kann auf alle Modifikationen an den Basen oder dem Zucker angewandt werden, um gleichzeitig mehrere essentielle funktionelle Gruppen zu identifizieren. Mit dieser Methode besteht zum Beispiel die Möglichkeit aktive Zentren an Ribozymen oder bindende Regionen von Aptameren aufzufinden. Darüberhinaus kann die Methode auch dazu verwendet werden die Stabilität von RNAs gegenüber Nukleasen durch gezielte Modifikation mit funktionellen Gruppen wie 2'-O-Methyl-, 2'-Amino- oder 2'-Fluoro zu erhöhen.