

1. Einleitung

Eine fundamentale Eigenschaft von jeglichen lebenden Systemen ist die Fähigkeit der Weitergabe von Informationen und die der Replikation. RNA ist sowohl in der Lage, die genetische Information als eigene Bauanleitung zu speichern als auch stabile Strukturen ausbilden zu können. Gerald Joyce fasste 1989 die Indizien zusammen, die für eine RNA-Welt sprechen [Joyce, 1989]. Die Hypothese der RNA-Welt beinhaltet, daß in einem Zeitabschnitt der Entwicklung des Lebens die genetische Kontinuität durch Replikation von RNA gesichert war, die Watson-Crick-Basenpaarung die Grundlage der Replikation bildete und genetisch codierte Proteine nicht als Katalysatoren auftraten.

Mit der Entdeckung der ersten katalytischen RNA – dem Gruppe I Intron [Cech, 1981] und der RNase P [Guerrier-Takada, 1983] – wurde klar, daß auch RNA neben Proteinen katalytisches Potential aufweisen kann.

Seither ist auf dem Gebiet der RNA-Forschung eine Vielzahl neuer Erkenntnisse gewonnen worden. Die Zahl der natürlichen Ribozyme wurde um das Gruppe II Intron [Michel, 1995], das Hammerhead- [Prody, 1986], das Hairpin- [Feldstein, 1990; Hampel, 1990], Neurospora Virus Satellit- [Guo, 1995], und Hepatitis Delta Virus Ribozym [Kuo, 1988] erweitert. Die neuesten Röntgenkristallstrukturuntersuchungen deuten darauf hin, daß es sich bei der Aminoacylierung im Ribosom auch um eine ribozym-vermittelte Reaktion handelt, da das katalytische Zentrum nur aus RNA besteht [Ban, 1999; Nissen, 2000]. Mit der Kenntnis der geeigneten Amplifizierungsstrategien war es auch möglich geworden, aus kombinatorischen RNA-Bibliotheken funktionelle Moleküle zu isolieren, die bestimmte (Bindungs-) Eigenschaften aufwiesen. Die *in vitro* Selektion [Tuerk, 1990; Robertson, 1990; Ellington, 1990] von RNA-Molekülen wurde zum etablierten Verfahren, um spezifische RNA-Liganden zu bestimmten Molekülen zu finden. Mit Hilfe dieser Techniken war es außerdem gelungen, das Spektrum der katalytischen Aktivitäten der RNA wesentlich zu erweitern. Auch jetzt schon überwiegt die Anzahl der über *in vitro* Selektionen gefundenen Ribozyme die Zahl der natürlich vorkommenden Ribozyme um ein mehrfaches.

RNA ist ein aus 4 Bausteinen bestehendes Copolymer und weist damit gegenüber Proteinen mit mindestens 20 Bausteinen eine reglementiertere Struktur auf. Nichtsdestoweniger ist die Zahl der RNA-Faltungsmuster immens. RNA kann doppelsträngige Bereiche aufweisen, Haarnadelschleifen (engl. loops), Ausstülpungen und innere Schlaufen (bulges), Verbindungsstellen (3 way/ 4 way junctions) und Pseudoknoten (pseudoknots) bilden.

RNA ist in der Lage, komplexe Gesamtstrukturen einzunehmen und verfügt über Mechanismen der Tertiärstrukturstabilisierung [Batey, 1999]. RNA kann Bindungstaschen und katalytische Zentren ausbilden, sowie mit einer Vielzahl von Molekülen wechselwirken. Damit sind die Voraussetzungen für katalytische Aktivität gegeben.

1.1 *In vitro* Selektion von Ribonucleinsäuren

Die gebräuchlichste Methode zur Isolation von Nucleinsäuren mit bestimmten Bindungseigenschaften für gegebene Substrate ist die Affinitätschromatographie mit einer mit dem Zielmolekül (also dem entsprechenden Substrat) derivatisierten Festphase. Die kombinatorische Nucleinsäurebibliothek wird durch automatische Festphasensynthese als einzelsträngige DNA generiert, wobei die 3'- und 5'-Enden konserviert sind und die sich dazwischen befindlichen Positionen durch den Einsatz einer Mischung jeder der 4 Nucleosidphosphoramidite zufällige Sequenzen ergeben. Über PCR mit einem Primer, der auch den T7-Promotor codiert, wird ein doppelsträngiges Template erzeugt, welches mittels der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus dem Phagen T7 in die entsprechende RNA-Bibliothek umgeschrieben wird. Diese wird mit der Festphase inkubiert, die mit dem entsprechenden Zielmolekül derivatisiert ist. Nachdem die Festphase excessiv gewaschen wird, um nicht bindende Moleküle abzutrennen, wird mit einer Lösung des freien Zielmoleküls kompetitiv eluiert.

Diese selektierten RNA-Moleküle werden über den Umweg der DNA amplifiziert. Durch erneutes Umschreiben in RNA erhält man eine neue RNA-Bibliothek, die an potentiellen Bindern angereichert ist [Burgstaller, 1995]. Gewöhnlich beträgt der Anreicherungsgrad 10^2 - 10^3 pro Selektions-

runde, während die Ausgangskomplexität meist in der Region von 10^{13} - 10^{15} verschiedenen RNA-Molekülen liegt. Man wiederholt diesen Zyklus solange, bis die das Zielmolekül bindenden Species die Bibliothek dominieren, identifiziert diese über Sequenzierung der entsprechenden DNA und versucht, gemeinsame Strukturmotive zu finden.

Die Tabelle 1 verdeutlicht den Erfolg dieser Methode.

Zielmolekül	K_d [μ M]	kleinste Motivgröße	Referenz
L-Valin	12000	-	[Majerfeld, 1994]
L-Citrullin	65	44	[Famulok, 1994]
L-Arginin	0.33	-	[Geiger, 1996]
D-ATP	14	40	[Sassanfar, 1993]
L-Adenosin	1.7	58	[Klußmann, 1996]
Riboflavin	0.5	35	[Burgstaller, 1994]
NMN/NAD	2.5	-	[Lauhon, 1995]
Guanin	1.3	32	[Kiga, 1998]
Theophyllin	0.1	38	[Jenison, 1994]
Cibacron Blau 3G-A (CB)	<100	-	[Ellington, 1990]
Dopamin	2.8	-	[Mannironi, 1997]
Cyanocobalamin	0.088	35	[Lorsch, 1994a]
Biotin	6	-	[Wilson, 1998]
Tobramycin	0.009	27	[Wallis, 1995]

Tab. 1: RNA mit Bindungseigenschaften für kleine organische Moleküle (adaptiert aus [Jäschke, 1999])

Besonders hervorzuheben ist die Identifizierung einer Theophyllin bindenden RNA als Beispiel für die hochspezifische molekulare Erkennung von Liganden durch RNA. Dieses Aptamer kann zwischen Theophyllin und Coffein unterscheiden, das lediglich eine Methylgruppe zusätzlich aufweist. Die Diskriminierung (das Verhältnis der Bindungs- bzw. Dissoziationskonstanten) zwischen beiden Substraten beträgt etwa 10 000 [Jenison, 1994].

Auch auf diese Spezifität ist gezielt selektiert worden, indem man im Selektionsschritt vor der kompetitiven Elution mit dem Zielmolekül mit

einem ungewünschten Analogon eluierte. Dieses Verfahren wird Counter- bzw. Gegenselektion genannt und führte auch bei der Selektion von RNA auf Bindung an L-Adenosin zu einem Aptamer, das hochselektiv zwischen L- und D-Adenosin unterschied [Klußmann, 1996].

1.2 Die direkte Selektion

Als die Methode der *in vitro* Selektion von RNA nach Bindungsverhalten etabliert war, versuchte man, sie auch auf das katalytische Potential der RNA anzuwenden [Osborne, 1997; Breaker, 1997]. Die Strategie der direkten Selektion beruht auch hier auf dem sequenziellen Selektieren und Amplifizieren (Abb.1).

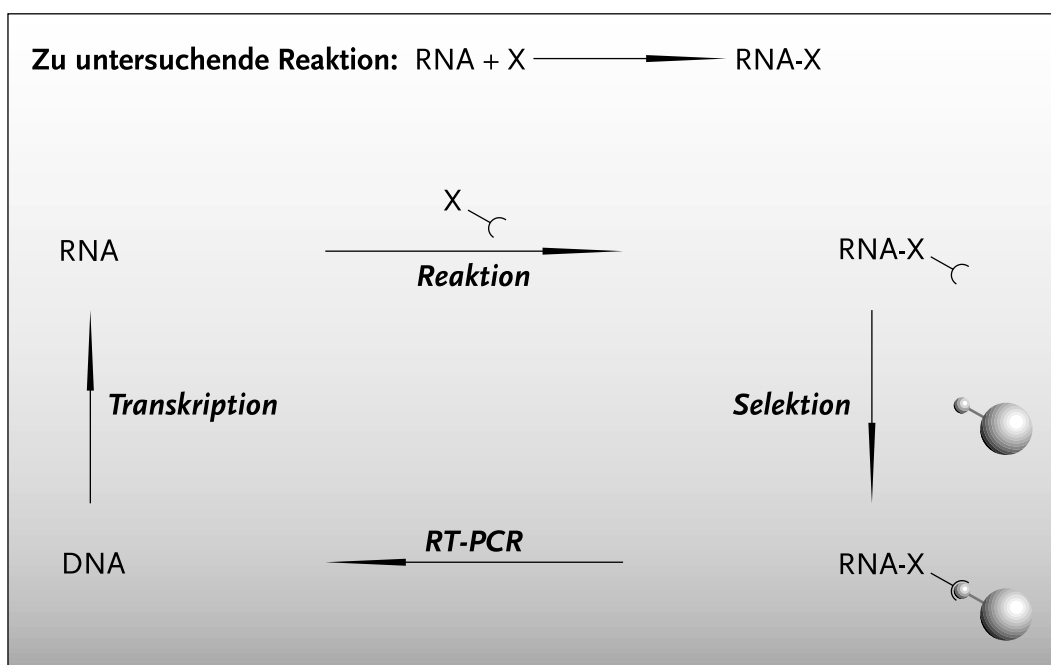


Abb. 1: Direkte Selektion katalytischer RNA

Die RNA-Bibliothek wird mit einem Reaktanden inkubiert, der eine selektierbare Funktionalisierung – Ankergruppe genannt – aufweisen muß, um eine Unterscheidung zwischen Edukten und Produkten zu gewährleisten. Durchgesetzt haben sich hier vor allem Biotin- bzw. Thiolmodifizierungen. Diejenigen RNA-Moleküle, die die Reaktion zwischen sich selbst und dem Reaktanden beschleunigen, erhalten über die kovalente Verknüpfung mit dem Reaktanden gleichzeitig die Ankergruppe desselben, so daß sie mittels geeigneter Matrices (z.B. Streptavidin- bzw. aktivierte Thiofestphasen) immobilisiert – also vom großen Überschuß an nicht umgesetzter RNA separiert – werden können. Die gebundenen RNA-

Moleküle werden isoliert und enzymatisch über RT-PCR amplifiziert. Der Cyclus wird solange wiederholt, bis aktive Species die Bibliothek dominieren (Abb. 1).

Die isolierten Moleküle beschleunigen Selbstmodifizierungsreaktionen, da ein Reaktionspartner ja immer die RNA selbst ist. Im strengen Sinne sind sie keine Katalysatoren, da sie aus der Reaktion nicht unverändert hervorgehen und die Reaktion nur ein einziges Mal durchführen können. Selbst wenn es nach intensiven Sekundärstrukturanalysen gelingen kann, die Selbstmodifizierer in Katalysator- und Substratdomäne zu trennen, war eine universell anwendbare Strategie zur Selektion von Katalysatoren bimolekularer Reaktionen, bei denen nicht die RNA auch den einen Reaktionspartner stellt, noch nicht gefunden. Die Nachteile der direkten Selektion liegen darin, daß es einerseits mit diesem Ansatz nicht möglich ist, auf Katalyse von Reaktionen zwischen zwei kleinen Reaktanden zu selektieren und andererseits gehen diejenigen Species während der Selektion verloren, die zwar ausgezeichnete Reaktionsbeschleuniger sind, jedoch über schlechte Substrateigenschaften verfügen. In der Tabelle 2 ist eine Auswahl durch *in vitro* Selektionen gewonnener Ribozyme dargestellt, die ein breites Spektrum an chemischen Reaktionen abdecken.

katalysierte Reaktion	Reaktionsbeschleunigung	Referenz
Phosphorylierung	100 000	[Lorsch, 1994b]
RNA-Ligation	700	[Ekland, 1995]
RNA-Spaltung		[Santoro, 1997]
DNA-Spaltung	1 000 000	[Carmi, 1996]
Aminoacylierung	>100 000	[Illangasekare, 1995]
Aminoacyltransfer	>2 000	[Lohse, 1996]
Porphyrinmetallierung	460	[Conn, 1996]
	1 400	[Li, 1996]
N-Alkylierung	> 1 000 000	[Wilson, 1995]
S-Alkylierung	2 420	[Wecker, 1996]
Umesterung		[Jenne, 1998]
Amidbindungsknüpfung	1 000 000	[Zhang, 1997]
	10 000	[Wiegand, 1997]
Diels-Alder-Reaktion	800	[Tarasow, 1997]
	20 000	[Seelig, 1999a]

Tab. 2: Auswahl organischer Reaktionen, die durch Oligonucleotide katalysiert werden können (adaptiert aus [Jäschke, 1999])

1.3 Die direkte Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden

Einen Ausweg bietet die direkte Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden (Abb.2), die parallel in der Arbeitsgruppe von B.E. Eaton und in unserer entwickelt wurden [Tarasow, 1997; Wiegand, 1997; Seelig, 1999a; Übersicht: Frauendorf, 1998].

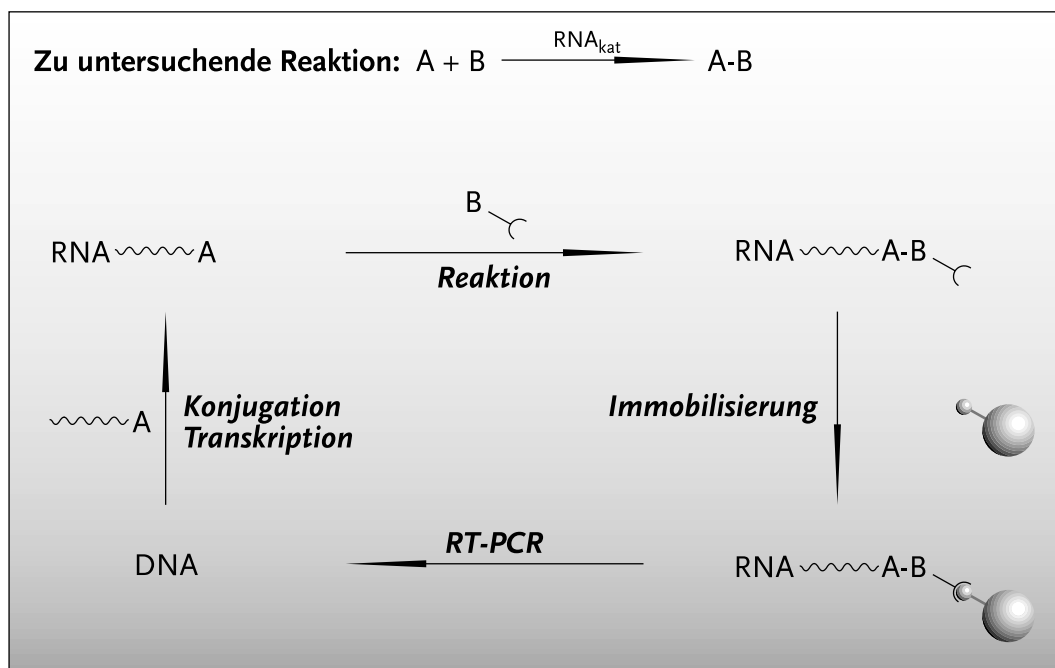


Abb. 2 : Direkte Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden

Will man nun auf die Katalyse einer bimolekularen Reaktion zwischen zwei nicht-RNA-Substraten selektieren, muß der eine potentielle Reaktand über einen flexiblen Linker (wie Polyethylenglycol) mit jedem RNA-Molekül der kombinatorischen RNA-Bibliothek verknüpft sein. Der Linker dient der flexiblen Positionierung von RNA und Substrat. Nach Inkubation mit einem anderen Reaktanden, der über eine selektierbare Ankergruppe verfügen muß, werden diejenigen RNA-Moleküle, die die betreffende Reaktion katalysieren, ebenfalls die Ankergruppe tragen. Dadurch können sie von dem Überschuß an nicht katalysierender RNA abgetrennt bzw. selektiert werden.

Die Amplifikationsstrategien sind kongruent mit denen der direkten Selektion, wobei in jeder Selektionsrunde der eine Reaktand stets an die neue RNA-Bibliothek gebunden werden muß (Abb. 2). Hier wird die Katalyse zwangsläufig wieder auf eine intramolekulare Modifizierung zurückgeführt.

Allerdings ist hier die räumliche Trennung von Substrat- und Katalysator-domäne gewährleistet. Das Endziel ist die RNA-vermittelte Katalyse von freien Reaktanden. Wie jüngst gezeigt werden konnte [Seelig, Keiper, Stuhlmann, Jäschke, unveröffentlichte Ergebnisse], führte der Ansatz der direkten Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden tatsächlich zur Isolation von "richtigen" Katalysatoren, die die Diels-Alder-Reaktion mit multiplem Turnover katalysieren.

1.4 Methoden zur Einführung von Reaktanden in RNA: Darstellung ternärer RNA-Konjugate

Die direkte Selektion mit linkergekoppelten Reaktanden setzt Strategien zur selektiven Einführung des Reaktanden voraus. Während bei der chemischen Festphasensynthese von Oligonucleotiden Modifizierungen an prinzipiell jeder beliebigen Position möglich sind, ist man bei der Derivatisierung von kombinatorischen RNA-Bibliotheken auf enzymatische Verfahren angewiesen.

Für die 5'-Modifizierung wurde der Einbau kurzer modifizierter Guanosinbausteine (wie etwa Guanosinmonophosphat und -monothiophosphat, das Cap-Analogon m⁷GpppG, pApG) [Gaur, 1997a,b] mittels Transkriptionsinitiation während der enzymatischen RNA-Synthese beschrieben, da die T7-RNA-Polymerase bestimmte chemische Modifikationen während – und nur während – des Initiationsschrittes toleriert [Pitulle, 1992]. Diese Technik konnte auch für die Einführung größerer und komplexerer Konjugate erfolgreich genutzt werden [Seelig, 1997, 1999b; Sengle, 2000].

Auch die T4-RNA-Ligase ist bekannt für die Erkennung kleiner Nucleinsäuren als Substrat, welches z.B. bei der radioaktiven Markierung von RNA am 3'-Ende durch Ligation mit ³²P-pCp ausgenutzt wird [England, 1978, 1980]. Erst in den letzten Jahren wurde über die Einführung auch größerer Gruppen wie ein direkt mit Fluorescein derivatisiertes Dinucleotid berichtet [Igloi, 1996].

In unserer Arbeitsgruppe wurden zwei universell einsetzbare Dinucleotidanaloga entwickelt [Hausch, 1997, 1998], die sowohl die Substraterkennung durch die Ligase gewährleisten, als auch die Derivatisierung mit Reaktanden ermöglichen. Hierbei ist das Dinucleotid über einen langen flexiblen Linker (3-5 Hexaethylenglycol (HEG)-Einheiten) mit einem Amino- bzw. einem Carbonsäurerest verbunden, die über verschiedene Aktivierungsstrategien modifizierbar sind.

In den HEG-Linker ist zusätzlich eine photolytische Spaltstelle eingefügt, die die Freisetzung der RNA in Selektionsexperimenten ermöglicht und deshalb ein hochselektives Selektionskriterium darstellt.

1.5 Die enzymatische Nucleotidsynthese

Für die Biosynthese von Nucleinsäuren ist die Bindungsknüpfung zwischen Nucleobase und Zucker der entscheidende Schritt. Die Schlüsselverbindung ist stets das 5-Phosphoribosyl-1- α -pyrophosphat (PRPP). Der nucleophile Stickstoff der Nucleobase greift die aktivierte C1-Position des Zuckers an und bildet eine neue C-N-Bindung unter Inversion der Konfiguration am C1 und Freisetzung einer Pyrophosphatgruppe. β -Phosphoribosylierte Nucleobasen werden erhalten (Abb.3).

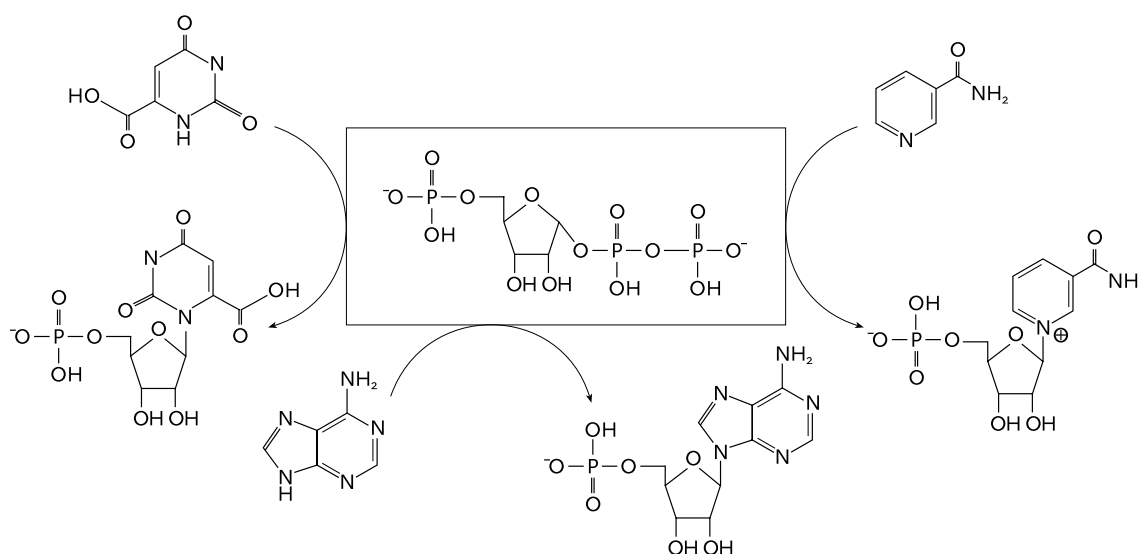


Abb. 3: PRPP als zentrale Komponente bei der de novo Nucleotidsynthese

Der Mechanismus der von Phosphoribosyltransferasen (Typ I) katalysierten Reaktion stellte sich bislang als hochsequenziell heraus. Im Falle der Orotidinmonophosphat-Synthetase wurde ein Zufallsmechanismus postuliert [Bhatia, 1990; Wang, 1999], der über einen Übergangszustand mit hohem Anteil an ionischem Oxycarbeniumcharakter (S_N1) am C_I verläuft. Die Reaktion wird in beide Richtungen katalysiert.

Während schon über eine durch RNA katalysierte C-N-Bindungsknüpfung (N-Alkylierung [Wilson, 1998]) berichtet wurde, war es bei Beginn dieser Arbeit noch unklar, ob RNA auch N-glycosidische Bindungen knüpfen kann. Dieses war das eigentlich im Rahmen dieser Arbeit zu studierende System. Später sollte außerdem untersucht werden, ob sich durch Kombination der allosterischen Ribozyme mit der Technik der "molecular beacons" ein System zur Analyse von Konzentrationen kleiner organischer Moleküle etablieren läßt.

1.6 Das Hammerheadribozym und Fluoreszenzenergietransfer-Messungen

Das Hammerheadribozym ist eines der kleinsten natürlichen und auch eines der bestuntersuchten Ribozyme [Stage-Zimmermann, 1998; Carola, 1999]. Es handelt sich hierbei um ein kleines RNA-Motiv, das sich an einer spezifischen Phosphodiesterbindung unter Freisetzung eines 2'-,3'- cyclischen Phosphat- und eines 5'-Hydroxylendes selbst spaltet. Die Sekundärstruktur des Hammerheadribozyms (Abb. 4) besteht aus drei Helices beliebiger Sequenz und Länge, die ein 15 Nucleotide langes katalytisches Zentrum determinierter Sequenz einschließen.

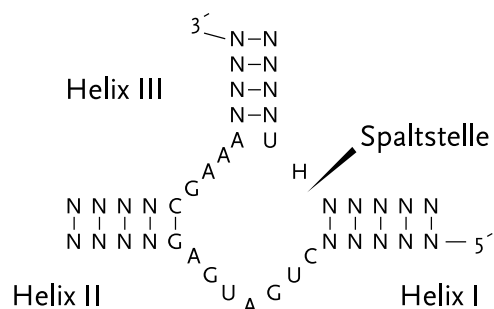


Abb. 4: Konsensussekundärstruktur des Hammerheadribozyms
(die Enden der Helices können durch Loops eingefasst sein, N- alle Nucleotide, H- C, U oder A)

Die Kinetiken der Spaltungsraten des Hammerheadribozyms sind mit $< 5 \text{ min}^{-1}$ gegenüber Proteinenzymen relativ langsam und können so mit manuellen Pipettiermethoden gemessen werden. In der Regel wurden radioaktiv markierte Substrate eingesetzt und die Spaltungseffizienzen über gelelektrophoretische Separierung für jeden einzelnen Datenpunkt in jedem Experiment analysiert. Durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Substratsträngen war es möglich geworden, die Hammerheadaktivitäten in Echtzeit zu messen [Jenne, 1999; Singh, 1999]. Dieses Verfahren liefert mehr Messdaten in kürzerer Zeit und eignet sich demzufolge ausgezeichnet für apparative Messverfahren.

Molekulare Leuchtfeuer ("molecular beacons") [Tyagi, 1986, 1998] werden einzelsträngige modifizierte Oligonucleotide genannt, die zum spezifischen Nachweis von Nucleinsäuresequenzen verwendet werden können. Diese modifizierten Oligonucleotide verändern ihre Konformation, wenn sie an ihr Zielmolekül binden (Abb. 5). Ursprünglich liegen sie in einer Doppelhelix-Schleifen-Struktur vor, wobei die Sequenz der Schleife zur Zielsequenz komplementär ist. An den Enden des doppelsträngigen Bereichs befinden sich jeweils ein Fluorophor und ein fluoreszenzlöschender Farbstoff (Quencher).

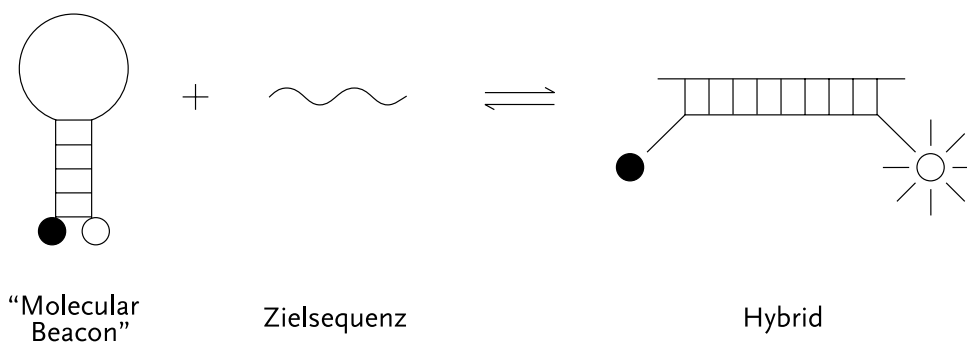


Abb. 5: Mechanismus der "molecular beacons"

Durch die räumliche Nähe des Fluorophors und des Quenchers wird die Fluoreszenz durch Energietransfer intramolekular gelöscht. Da als Quencher ein selbst nicht fluoreszierender Farbstoff gewählt wurde, wird die Energie, die er erhält, als Wärme an die Umgebung abgegeben. Es wird keine

Fluoreszenz freigesetzt. Wenn die "molecular beacons" an die Zielsequenz hybridisieren, ist der doppelsträngige Bereich länger und stabiler als die Doppelhelix des "molecular beacons". Deshalb verändert sich die Konformation des "molecular beacons" und führt zur Dissoziation des doppelsträngigen Bereiches (Abb. 5). Der Fluorophor wird vom Quencher räumlich getrennt, es kommt zur Freisetzung von Fluoreszenz.

Dieses Verfahren findet hauptsächlich Anwendung bei der Echtzeitverfolgung der Nucleinsäuresynthese. Anwendungen zur Lokalisierung spezieller RNAs in Zellen sind beschrieben [Matsuo, 1998].

Die Technik des Fluoreszenzresonanzenergietransfers (FRET) beruht ebenfalls auf der Abhängigkeit des Fluoreszenzenergietransfers von der räumlichen Entfernung der Fluorophore, wobei im Gegensatz zu den "molecular beacons" der Quencher durch einen weiteren Fluorophor ersetzt wird. Hierbei wird der erste Fluorophor angeregt und die Emission der Fluoreszenz des zweiten Fluorophors gemessen, dessen Anregung nur auf FRET beruht.

Dieses Verfahren wurde zur Bestimmung von RNA-Strukturen und von Ribozymaktivitäten genutzt [Tuschl, 1994; Bassi, 1999; Walter, 1997, 1998].

1.7 Allosterische Ribozyme

Mit den Erfolgen der Selektion von RNA bezüglich molekularer Erkennung, dem Fortschritt der Strukturanalyse von RNA-Molekülen über NMR, Röntgenkristallographie und über FRET-Messungen waren die Informationen gegeben für das rationale Design einer neuen Generation von RNA-Molekülen: der allosterischen Ribozyme [Soukup, 1999c, Marshall, 1999]. Bislang war bekannt, daß Ribozymaktivitäten zwar durch einige Antibiotika [Hermann, 1998] wie auch durch Oligonucleotide mittels Basenpaarung an das katalytische Zentrum beeinflusst werden können. Das ließ den Schluß zu, daß die Funktion von Ribozymen auch unter Kontrolle von kleinen organischen Effektormolekülen über allosterische Interaktion gebracht werden kann.

R.Breaker berichtete über das erste rational entworfene allosterische Ribozym, das er aus der Verknüpfung des sich selbst spaltenden Hammerheadribozyms – als katalytisches Zentrum – mit dem ATP-Aptamer – als regulatives Zentrum – über die Helix II des Hammerheadribozyms erhielt. Er beobachtete, daß dieses Aptamer-Ribozym-Konstrukt tatsächlich in Gegenwart von ATP etwa um den Faktor 17 inhibiert wird [Tang, 1997, 1998]. Verantwortlich sind sterische Wechselwirkungen der Tertiärstrukturen von Aptamer- und Ribozymbereich, hervorgerufen durch eine Konformationsänderung der Aptamerregion, die natürlicherweise unstrukturiert ist und erst durch Bindung des ATP eine definierte Struktur einnimmt.

In Analogie zu allosterisch regulierten Proteinenzymen bindet das modifizierte Ribozym den Effektor also an einer von dem katalytischen Zentrum entfernten Stelle (Abb. 6).

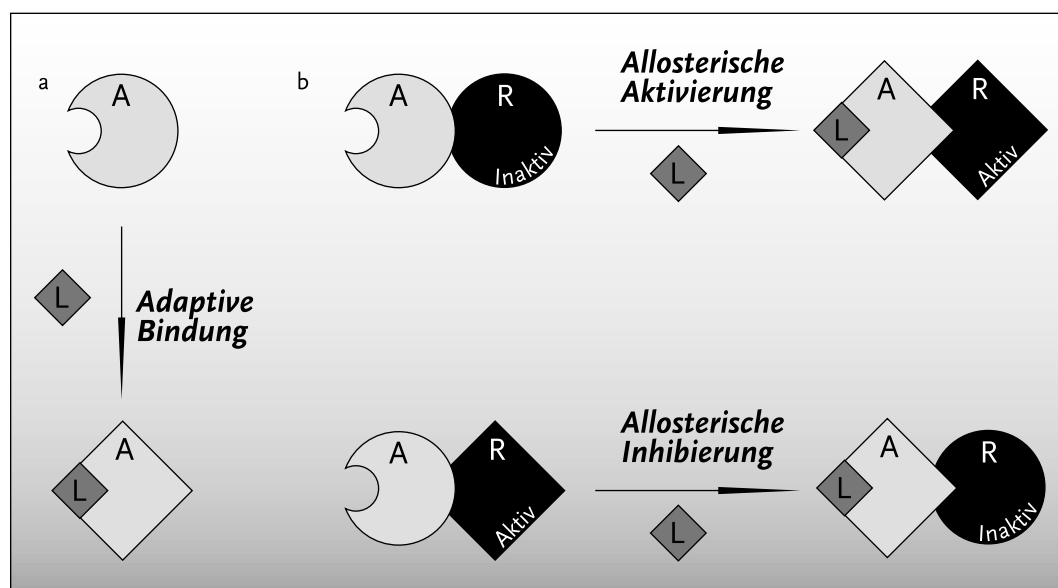


Abb. 6: Allosterische Ribozymaktivierung bzw. -inhibierung (L-Ligand, R-Ribozym, A-Aptamer)

Mit der Fusion von FMN-Aptamer und Hammerheadribozym über die Helix II konnten Araki et al. über eine Variation der Länge der Helix II eine positive Regulation der Hammerheadaktivität erreichen, allerdings lediglich um den Faktor 2-6 [Araki, 1998].

R. Breaker entwickelte weiterhin eine neue Generation von allosterischen Ribozymen, indem er zwischen Aptamer- und Ribozymbereich eine randomisierte Region von 4 bp setzte und auf Spaltung in Gegenwart bzw. Abwesenheit des Effektors selektierte [Soukup, 1999b]. Die gefundene Sequenz dient als Kommunikationsmodul zwischen dem aktiven Zentrum und dem Regulationsmodul. Das Kommunikationsmodul ist als solches universell: es funktioniert sowohl beim FMN-, Theophyllin- als auch beim ATP-Aptamer als molekularer Schalter [Soukup, 1999b].

Bei diesen betrug die allosterische Modulierung 100-270, eine gleiche Größenordnung findet man auch bei Proteinenzymen.