

Synthetische Ribozyme und das erste Desoxyribozym

Petra Burgstaller und Michael Famulok*

Hatte man sich in der Anfangsphase des „protein engineering“ noch auf das Ziel beschränkt, die Funktionsweise von Enzymen zu verstehen, so besteht die Herausforderung der heutigen Zeit im de-novo-Design künstlicher Enzyme. Dafür stehen aber seit der Entdeckung natürlicher katalytischer RNAs vor über zehn Jahren^[1] nicht mehr nur Proteine zur Verfügung. Vor allem mit der Entwicklung der Methoden der in-vitro-Selektion und der in-vitro-Evolution eröffnete sich die Möglichkeit, nicht nur die Funktionalität und Spezifität natürlicher Ribozyme zu verändern oder zu verbessern, sondern auch RNA-Katalysatoren mit neuen Funktionalitäten zu entwickeln. Die Strategien, wonach dies geschieht, unterscheiden sich bislang – bis auf eine Ausnahme^[2] – von denen, die etwa zur Isolierung katalytischer Antikörper angewendet werden. In diesem Fall werden Antikörper isoliert, die spezifisch an Übergangszustandsanaloga (transition state analogues, TSAs) binden und eine Bindungstasche enthalten, die der Struktur des Übergangszustands einer bestimmten chemischen Reaktion besser angepaßt ist als den Strukturen der Produkte oder Edukte, wodurch die entsprechende Reaktion katalysiert werden kann^[3]. Im Gegensatz dazu verwendet man bei der Isolierung von Katalysatoren auf Nucleinsäurebasis die Methode der „direkten Selektion“, bei der ein randomisierter, hochkomplexer Pool von Nucleinsäuren einem Konkurrenzkampf unterworfen wird, den nur diejenigen Moleküle bestehen, die eine bestimmte Reaktion katalysieren können. Man nutzt dabei dieselben Prinzipien, die auch in der Evolution im Sinne Darwins zur Geltung kommen. Das geschieht auf der Basis von in-vitro-Selektion und in-vitro-Evolution, Techniken, deren Funktionsweise bereits mehrfach – auch in dieser Zeitschrift – detailliert beschrieben wurde^[4]. Wir stellen in diesem Highlight einige der neuesten aufregenden Ergebnisse auf diesem Gebiet vor, das sich mit wahrhaft rasanter Geschwindigkeit entwickelt.

Einen Meilenstein hatten vor zwei Jahren Bartel und Szostak gesetzt. Es gelang ihnen, aus einem synthetischen RNA-Pool Ribozyme zu isolieren, die in der Lage sind, ein Oligonucleotid unter Abspaltung von Pyrophosphat an ihr 5'-Ende zu ligieren^[5]. Der dieser Reaktion zugrundeliegende Mechanismus entspricht der der Wirkungsweise der RNA-abhängigen RNA-Polymerasen. Das Selektionsschema ging von einem Pool mit einer

sehr langen randomisierten synthetischen Sequenz von 220 Nucleotiden aus. Mit dieser Länge wollte man die Wahrscheinlichkeit erhöhen, katalytisch aktive Sequenzen zu isolieren (Schema 1).

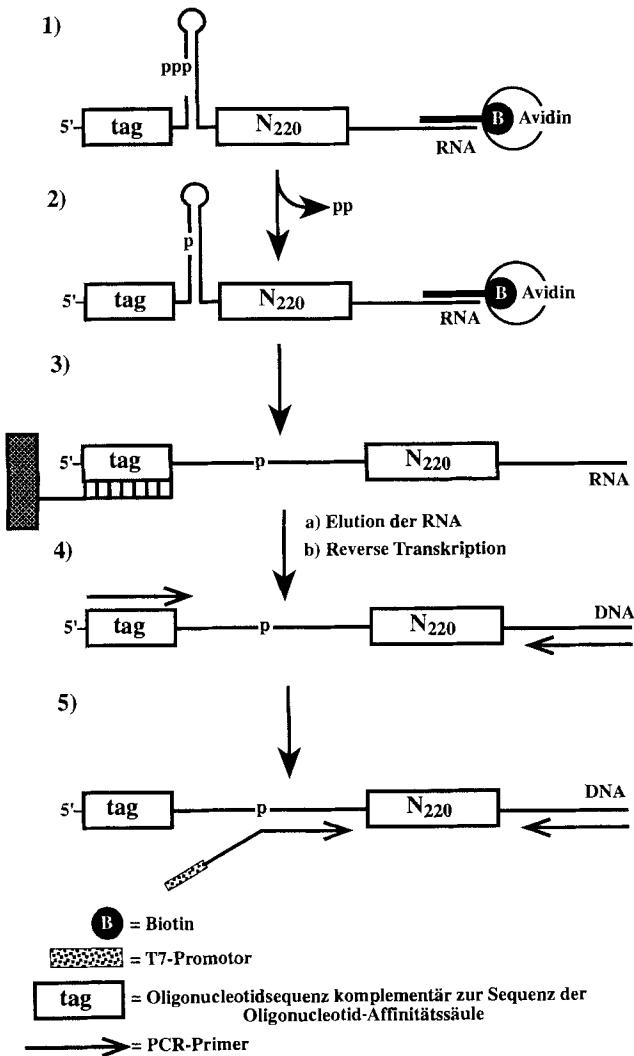
Um die 3'-Hydroxygruppe des Oligonucleotids in die Nachbarschaft des Triphosphats am 5'-Ende des RNA-Pools zu bringen, wurde ein Bereich in der konstanten Region des 5'-Primers so konstruiert, daß sowohl das Substrat-Oligonucleotid als auch das 5'-Ende des Pools daran hybridisieren konnten. Katalytisch aktive Moleküle wurden in zwei Schritten angereichert. Nach Inkubation mit dem Oligonucleotid wurde der Pool über eine Oligonucleotid-Affinitätssäule gereinigt, an die nur erfolgreich ligierte Sequenzen binden konnten. Diese wurden eluiert, revers transkribiert und in einer PCR-Reaktion mit einem Primer amplifiziert, der komplementär zur Sequenz des ligierten Oligomers ist. In einer zweiten PCR-Reaktion wurde dann die ursprüngliche, unligierte Struktur wiederhergestellt, aus der anschließend ein angereicherter RNA-Pool für die nächste Selektionsrunde transkribiert wurde. Drei der insgesamt zehn Selektionsrunden enthielten einen mutagenen PCR-Schritt, so daß „schlechtere“ Katalysatoren die Chance bekamen, sich zu „besseren“ zu entwickeln. Diese Strategie führte zu einer Erhöhung der Ligationsgeschwindigkeit von $3 \times 10^{-6} \text{ h}^{-1}$, der unkatalysierten Aktivität, auf 8 h^{-1} .

Charakteristisch für viele enzymatische Katalysemechanismen ist die spezifische Substraterkennung und -bindung sowie die Verwendung von Cofaktoren. Um zu untersuchen, ob auch RNA eine cofaktor- oder substratabhängige Katalyse durchführen kann, gingen Lorsch und Szostak von einer spezifisch ATP-bindenden RNA aus, die zuvor aus einem RNA-Pool durch Affinitätschromatographie an ATP-Agarose selektiert worden war^[6], und verwendeten sie als Basis für die Evolution einer ATP-abhängigen Oligonucleotidkinase^[7] (Schema 2). Dazu wurde ein RNA-Pool synthetisiert, bei dem die Kernsequenz des ATP-Binders zu 15% randomisiert und zudem von drei völlig randomisierten Bereichen von insgesamt 100 Basen umgeben war. Dieser Pool wurde mit ATP- γ -S inkubiert. RNAs, auf die die γ -Thiophosphatgruppe des ATP übertragen worden war, wurden vom Rest des Pools über eine aktivierte Thiopropylagarose abgetrennt, und zwar durch die spezifische Bildung einer Disulfidbindung zwischen der Thiophosphatgruppe und der Agarose. Diese kovalent gebundenen RNAs wurden durch Waschen mit β -Mercaptoethanol im Überschuß eluiert, amplifiziert und erneut selektiert.

Nach 13 Selektionsscyclen wurden sieben Klassen von Ribozymen charakterisiert, die unterschiedliche Reaktionen durch-

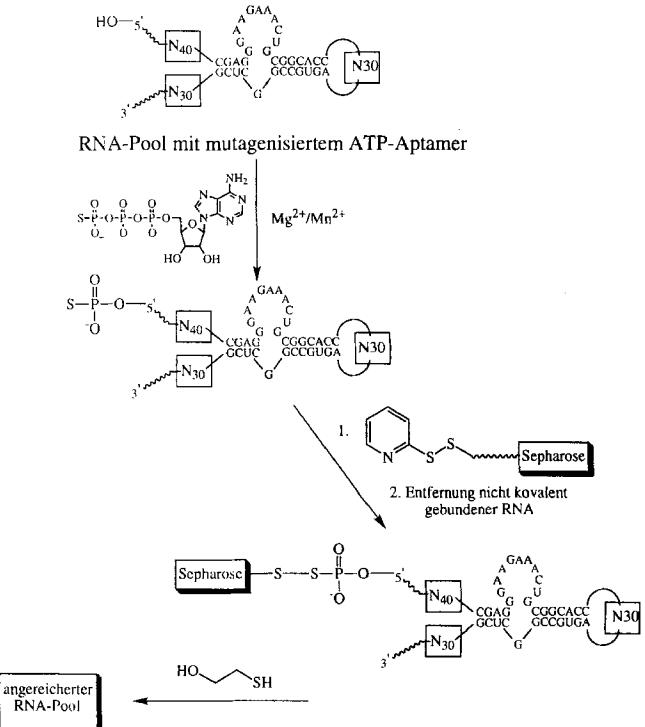
[*] Dr. M. Famulok, Dipl.-Chem. P. Burgstaller
Institut für Biochemie der Universität
Würmtalstraße 221, D-81375 München
Telefax: Int. + 89/74017 448
E-mail: FAMULOK@LMB.UNI-MUENCHEN.DE

HIGHLIGHTS



Schema 1. Selektionsstrategie zur Isolierung eines RNA-Ligase-Ribozys. 1) Die definierte Region am 5'-Ende eines synthetischen RNA-Pools mit 220 randomisierten Nucleotiden bildet eine Hairpin-Struktur aus, an die ein Oligonucleotid, das ligiert werden soll, binden kann. Dadurch werden sein 3'-Ende und die Triphosphatgruppe (ppp) am 5'-Ende des RNA-Pools in unmittelbare Nachbarschaft gebracht. Um Aggregation der RNA-Moleküle zu vermeiden, werden sie durch Hybridisierung der 3'-Primerbindungsstelle des Pools an ein biotinyliertes Oligonucleotid an Streptavidinagarose immobilisiert. 2) Nach erfolgter Ligation unter Abspaltung von Pyrophosphat (pp) wird der Pool in zwei Schritten angereichert: 3) Zunächst wird die ligierte tag-Sequenz an ein immobilisiertes komplementäres Oligonucleotid hybridisiert, wodurch ligierte von nicht ligierten Sequenzen abgetrennt werden können. Nachdem unligierte Sequenzen durch Waschen der Oligonucleotid-Affinitätsäule entfernt worden sind, werden die gebundenen Sequenzen durch Denaturierung eluiert und revers transkribiert. 4) Anschließend erfolgt eine weitere Anreicherung durch PCR mit einem Primer, der ebenfalls komplementär zur ligierten Region ist. 5) Durch eine zweite PCR wird die ursprüngliche unligierte Sequenz wiederhergestellt und der T7-Promoter für die anschließende in-vitro-Transkription eingeführt. Nach der Transkription mit T7-RNA-Polymerase (im Schema nicht gezeigt), bei der das 5'-Ende des RNA-Pools mit einer Triphosphatgruppe versehen wird, kann die resultierende RNA in einem erneuten Selektionszyklus eingesetzt werden.

führten: Fünf Klassen katalysierten die Übertragung des γ -Thiophosphats auf ihre eigene 5'-Hydroxygruppe und sind somit 5'-Kinasen, während die anderen beiden Klassen die 2'-Hydroxygruppen bestimmter interner Basenpositionen kinasierten. Ausgehend von einer dieser Sequenzen wurde ein Ribozym entwickelt, das in einer intermolekularen Reaktion Oligonucleotide an ihrem 5'-Ende phosphorylieren kann. Auf diese Weise wurde auch die ATP-abhängige, multiple Übertragungs-

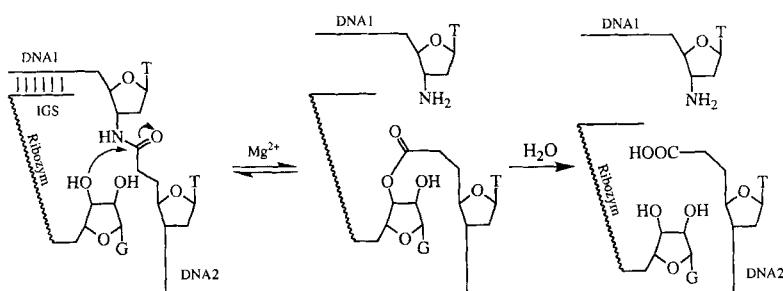


Schema 2. Schema für die Selektion eines Ribozys mit Polynukleotidkinase-Aktivität. Der RNA-Pool, der auf dem von Sasanoff und Szostak isolierten ATP-bindenden Aptamer [6] basiert, wird mit ATP-γ-S inkubiert. Moleküle, die erfolgreich kinasiert wurden, binden an aktivierte Thiopropylsepharose durch Bildung einer Disulfidbrücke und können so chromatographisch abgetrennt werden. Diese Brücke wird durch β -Mercaptoethanol im Überschuss wieder gespalten, so daß die Moleküle amplifiziert und in die nächste Selektionsrunde eingesetzt werden können.

reaktion bewiesen und gezeigt, daß die Kinetik der Katalyse der Michaelis-Menten-Gleichung folgte.

Die bisher entwickelten neuen, synthetischen Ribozyme führen wie alle bekannten natürlichen, katalytisch aktiven RNA-Moleküle Phosphodiestertransferreaktionen und -hydrolysen durch. Daß RNA aber durchaus ein breiteres Katalysepotential aufweist, zeigten Joyce et al., die kürzlich ein Ribozym beschrieben, das die Spaltung einer Amidbindung katalysiert^[8]. Dazu wurde ein DNA-spaltendes RNA-Molekül gewählt, das zuvor durch in-vitro-Evolution aus einem Pool von Varianten des *Tetrahymena*-Ribozys isoliert worden war^[9]. Man nahm an, daß das DNA-spaltende Ribozym auch in der Lage sein sollte, eine Amidbindung zu hydrolysieren, da der Übergangszustand einer Amidhydrolyse genau der Tetraederstruktur einer Phosphatgruppe entspricht. Außerdem war bereits früher durch Piccirilli et al. gezeigt worden, daß das Wildtyp-Intron der Klasse I aus *Tetrahymena* auch die Hydrolyse eines Carbonsäureesters katalysieren kann, wenn dieser dem Ribozym in Form eines Amidoacyl-Oligonucleotids als Substrat präsentiert wird^[10]. Als Substrat für die Amidhydrolyse wurde ein Oligonucleotid (DNA1) verwendet, das eine Amidgruppe enthielt, und an eine bestimmte Region des Ribozys, die „internal guide sequence“ (IGS), hybridisieren konnte. Das Ribozym, das im Vergleich zur Wildtypsequenz des *Tetrahymena*-Introns 17 Mutationen enthielt, katalysierte die Amidspaltung, während die Wildtypsequenz inaktiv war (Schema 3).

Obwohl die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse in Gegenwart des Ribozys nur 10^{-6} min^{-1} betrug, entsprach das

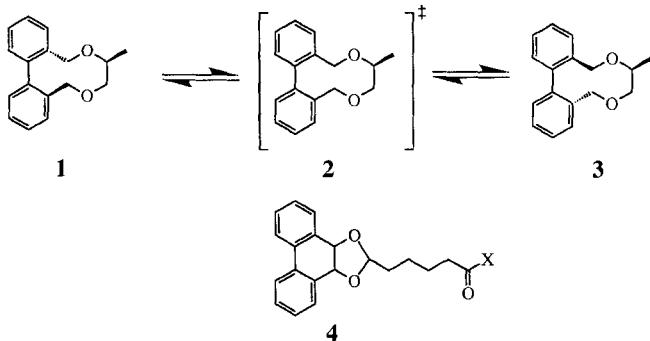


Schema 3. Mechanismus für die RNA-katalysierte Spaltung einer Amidbindung. Die Region stromaufwärts der Amidbindung (DNA1) ist komplementär zur „internal guide sequence“ (IGS) einer DNA-spaltenden Variante des *Tetrahymena*-Ribozyme. Dadurch wird die Amidbindung in die Nähe der Guanosineinheit am 3'-Ende des Ribozyme gebracht, und die 2'-Hydroxygruppe kann nucleophil an der Amidbindung angreifen. Durch spontane Hydrolyse der entstandenen Esterbindung wird das Ribozym regeneriert und DNA2 freigesetzt.

dennoch einer 1000fachen Beschleunigung gegenüber der unkatalysierten Reaktion. Die Spaltung ist unabhängig von der Natur der Substituenten an der Amidgruppe, was anhand von vier Substraten, DNA1-Methionin und DNA1-(Arginin)_n ($n = 1, 2$ oder 3), gezeigt wurde. Alle vier Substrate wurden selektiv an der unmittelbar auf die DNA1 folgenden Amidgruppe hydrolysiert. Peptidbindungen innerhalb der (Arginin)₂ oder (Arginin)₃ enthaltenden Substrate wurden nicht angegriffen.

Auch eine indirekte Selektion von Ribozymen ist möglich, wie Prudent et al.^[12] gezeigt haben. Sie isolierten RNA-Aptamere, die spezifisch an das TSA 4 der Isomerisierung eines asymmetrisch substituierten Biphenyl-Derivats binden konnten. Die Selektion erfolgte durch Affinitätschromatographie eines randomisierten RNA-Pools an dem an Agarose immobilisierten TSA. Ein solches Selektionsschema wurde bereits mehrfach angewendet, um RNA-Aptamere für die verschiedensten niedermolekularen Liganden zu isolieren^[16, 11]. Nach sieben Selektionsrunden zeigte der RNA-Pool Bindung an die TSA-Säule. Von 20 sequenzierten Klonen war eine Sequenz, die zu 75 % im selektierten Pool vorlag, in der Lage, die Reaktion gegenüber der unkatalysierten etwa um den Faktor 100 zu beschleunigen (Schema 4).

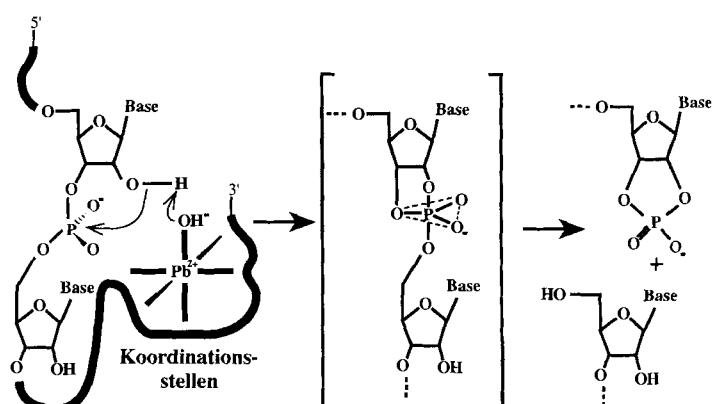
Die kinetische Untersuchung zeigte, daß zunächst ein Michaelis-Menten-Komplex gebildet wurde, gefolgt von der Isomerisierung und der Freisetzung des Reaktionsprodukts. Die Reaktion wurde durch das planare TSA 4 vollständig inhibiert. Diese Strategie ist analog zu dem Prinzip, das in vielfältiger Weise erfolgreich für die Isolierung katalytischer Antikörper angewen-



Schema 4. Isomerisierung des Biphenyl-Derivats 1 zu seinem Diastereomer 3. Diese Reaktion wird durch ein Ribozym katalysiert, das durch Bindung an das TSA 4 selektiert wurde, welches den planaren Übergangszustand 2 dieser Reaktion strukturell nachahmt.

det wurde. Mit der Isolierung von Ribozymen durch Selektion von TSA-bindenden RNAs steht eine höchst effiziente Methode zur Untersuchung der Vielfalt der durch RNA katalysierbaren chemischen Reaktionen zur Verfügung. Es gibt allerdings auch eine aktuelle Arbeit, in der RNA-Aptamere beschrieben werden, die zwar an das TSA einer Diels-Alder-Reaktion binden, nicht jedoch die entsprechende Reaktion katalysieren konnten^[12].

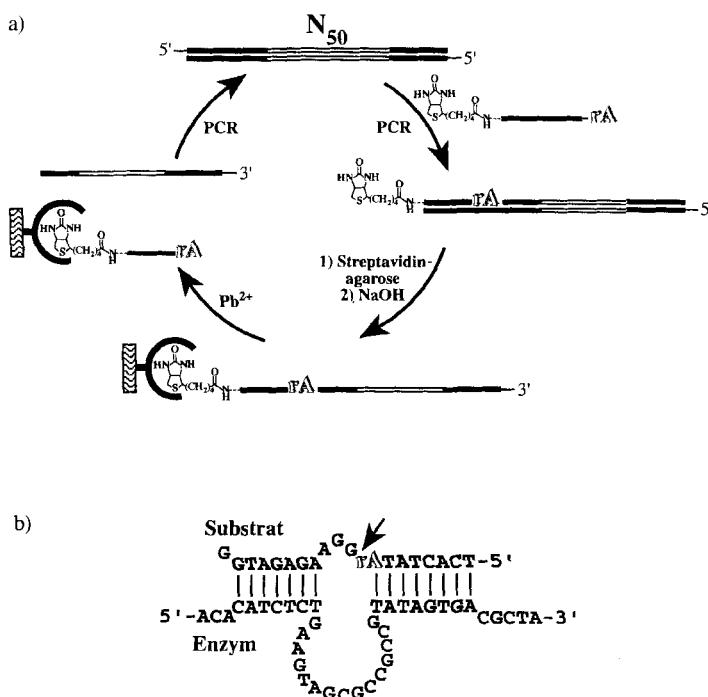
Ein ganz neuer Weg in der Entwicklung von Katalysatoren und Nucleinsäurebasis wurde von Breaker und Joyce beschritten, die kürzlich die Isolierung des ersten Desoxyribozyms beschrieben^[13]. Der damit erbrachte Beweis, daß auch DNA chemische Reaktionen katalysieren kann, kommt sicherlich nicht ganz unerwartet, zumal bereits kurz nach der Entwicklung der in-vitro-Selektionstechnik gezeigt wurde, daß auch einzelsträngige DNA-Moleküle für die Bindung an die verschiedenen Liganden selektiert werden können^[14]. Bemerkenswert ist vor allem die von Breaker und Joyce angewandte Selektionstechnik. Ihr Ziel war nämlich die Isolierung eines DNA-Enzyms, das die Phosphodiesterbindung eines Ribonucleotids spezifisch spalten konnte. Der dafür synthetisierte DNA-Pool enthielt an einer ganz bestimmten Position innerhalb einer Primerbindungsstelle ein einzelnes Ribonucleotid, um den möglichen Einfluß von RNA auf die Katalyse zu vermeiden. Außerdem gingen sie davon aus, daß eine DNA-abhängige RNA-Spaltung bei pH 7 einen Cofaktor, etwa ein Metall-Ion, benötigt. Sämtliche Ribozyme, deren Reaktionsmechanismus bisher untersucht wurde, sind Metalloenzyme. Metall-Ionen wie Mg^{2+} , Mn^{2+} oder auch Pb^{2+} im Falle der selbstspaltenden tRNA^{Ph} aus Hefe, waren dabei immer in den Katalysemechanismus involviert und dienten zudem zur Aufrechterhaltung der korrekten Faltung der RNA. Pan und Uhlenbeck hatten gezeigt, daß aus einer randomisierten Bibliothek von tRNA^{Ph}-Molekülen neue Ribozyme mit Pb^{2+} -abhängiger Phosphodiesterase-Aktivität isoliert werden konnten^[15]. Die Spezifität der Reaktion hängt dabei von der Koordination eines Pb^{2+} -Ions an einer definierten Stelle innerhalb der RNA ab (Schema 5).



Schema 5. Möglicher Mechanismus der Spaltung von RNA durch Pb^{2+} -Ionen. Das $Pb(OH)^+$ -Ion wird durch spezifische Koordination der RNA in die Nachbarschaft einer 2'-Hydroxygruppe gebracht. Durch Abstraktion des H^+ -Ions der 2'-Hydroxygruppe wird der nucleophile Angriff des Sauerstoffanions auf das benachbarte Phosphoratom ermöglicht. Dadurch ergibt sich ein Übergangszustand mit einem fünffach koordinierten Phosphoratom in trigonal-bipyramidaler Umgebung, der zur Bildung eines 2',3'-cyclischen Phosphats und einer 5'-Hydroxygruppe führt.

HIGHLIGHTS

Auch Breaker und Joyce verwendeten in ihrer Selektion Pb^{2+} als Cofaktor. Sie erzeugten einen Pool von $\approx 10^{14}$ doppelsträngigen DNAs mit einer randomisierten Region von 50 Nucleotiden. Einer der Strände enthielt eine Biotingruppe an seinem 5'-Ende, gefolgt von einer definierten 43mer Basensequenz, die in der Position 28 eine Ribose-Adenosineinheit enthielt. Die Doppelstrang-DNA wurde an Streptavidin-Agarose immobilisiert und der nicht-biotinylierte Strang durch pH-Erhöhung abgetrennt. Die immobilisierte Einzelstrang-DNA wurde anschließend mit einem Pb^{2+} -enthaltenden Puffer inkubiert, wodurch in aktiven Sequenzen die Phosphodiester-spaltung an der Ribose-Phosphatgruppe eingeleitet und somit die Bindung zum biotintragenden 5'-Ende gespalten wurde. Dadurch wurden nur die katalytisch aktiven Sequenzen von der Säule eluiert, die dann amplifiziert und erneut selektiert werden konnten (Schema 6a).



Schema 6. a) In-vitro-Selektion eines Desoxyribozym, das die Phosphodiesterbindung einer Ribonucleotidgruppe spaltet. In den definierten Bereich am 5'-Ende eines synthetischen DNA-Pools mit 50 randomisierten Nucleotiden werden über PCR ein einzelnes Ribonucleotid (rA) und am selben Strang eine Biotingruppe eingebracht. Durch Immobilisierung an Streptavidin-Agarose und pH-Erhöhung wird ein einzelsträngiger Pool erhalten, der anschließend in Gegenwart von Pb^{2+} -Ionen inkubiert wird. Sequenzen, die an rA gespalten worden sind, werden eluiert, mit PCR amplifiziert und in den nächsten Zyklus eingesetzt. b) Sekundärstruktur eines auf einer selektierten Sequenz basierenden verkürzten DNA-Enzyms, das die Phosphodiesterbindung eines Ribonucleotids in einer intermolekularen Reaktion spaltet.

Fünf Selektionsrunden ergaben eine Population von Einzelstrang-DNAs, die die Pb^{2+} -abhängige Spaltung an der Riboseposition katalysieren konnten. Diese DNAs zeigten bestimmte Gemeinsamkeiten in ihren Sequenzen. Sie enthalten, ähnlich wie die Hammerhead- und Hairpin-Ribozyme, zwei konservierte, ungepaarte Bereiche zwischen zwei Sequenzen, die mit Basen stromaufwärts und stromabwärts der Spleißstelle paaren können. Dieses Strukturmotiv diente als Basis für die Konstruktion einer verkürzten Version der Katalysator- und der Substratdomänen.

Auf diese Weise wurde gezeigt, daß die 38 Nucleotide lange katalytische Domäne das 21mer-Substrat spezifisch und mit hoher Umsatzgeschwindigkeit spalten konnte. Das Desoxyribozym ist allerdings nicht in der Lage, ein reines RNA-Substrat zu spalten, obwohl die Substratbindung an das Enzym durch zwei längere basengepaarte Regionen gewährleistet wird. Diese sind durch drei ungepaarte Basen unmittelbar nach der Spleißstelle unterbrochen (Schema 6b). Es ist jedoch geplant, dies in weiterführenden Experimenten durch in-vitro-Evolution^[9, 16] noch zu erreichen.

Die Entwicklung des von Breaker und Joyce beschriebenen Desoxyribozyms läßt an medizinische Anwendungsmöglichkeiten denken. So könnte ein Desoxyribozym, das anstelle von Pb^{2+} als Cofaktor weniger toxische Metall-Ionen, etwa Mg^{2+} oder Ca^{2+} , verwendet, unter physiologischen Bedingungen gezielt bestimmte mRNA-Targets spalten und somit als Alternative zur Antisense- und Ribozymtechnik^[17] dienen.

Vom Menschen geschaffene – oder zumindest „in die Welt gebrachte“ – Ribo- und (nun auch) Desoxyribozyme katalysieren ein bemerkenswertes Spektrum an chemischen Reaktionen. In manchen Fällen wird es diagnostische, technische oder medizinische Anwendungen geben, bei denen es von Vorteil ist, daß sie nicht auf der Basis eines Protein-Enzyms, sondern eines Nucleinsäure-Katalysators beruhen. Wir wollen nicht so weit gehen zu behaupten, daß Nucleinsäure-Enzyme die Variationsbreite der von Protein-Enzymen katalysierten Reaktionen erreichen können. Die hier vorgestellten Beispiele zeigen aber, daß ihnen ein weit größeres Potential innewohnt als das bloße Speichern von Information. Die präbiotische Evolution beinhaltet möglicherweise eine Phase der „RNA-Welt“, in der primitive Organismen existierten, deren Metabolismus und Replikation durch RNA-Enzyme gesteuert wurden und die dann in die DNA-RNA-Proteinwelt mündete. Es wird sich zeigen, ob wir jemals herausfinden werden, wie eine RNA-Welt ausgesehen oder begonnen hat. Mit Experimenten der zuvor beschriebenen Art könnte aber vielleicht schon bald ein plausibles Szenario aufgestellt werden.

Stichworte: DNA-Enzym · In-vitro-Selektionsmethoden · Katalyse · Metalloenzyme · Ribozyme

- [1] K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, *Cell* **1982**, *31*, 47–157; C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *ibid.* **1983**, *35*, 849–857.
- [2] J. R. Prudent, T. Uno, P. G. Schultz, *Science* **1994**, *264*, 1924–1927.
- [3] Siehe z.B.: D. Hilvert, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 612–617.
- [4] Übersichten in: M. Famulok, J. W. Szostak, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1001–1011; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 979–988; G. F. Joyce, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 331–336; R. R. Breaker, G. F. Joyce, *Trends Biotechnol.* **1994**, *12*, 268–275; K. B. Chapman, J. W. Szostak, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 618–622; A. D. Ellington, *Curr. Biol.* **1994**, *4*, 427; S. J. Klug, M. Famulok, *Mol. Biol. Rep.* **1994**, *20*, 97–107.
- [5] D. P. Bartel, J. W. Szostak, *Science* **1993**, *261*, 1411–1418.
- [6] M. Sasanfar, J. W. Szostak, *Nature* **1993**, *364*, 550.
- [7] J. R. Lorsch, J. W. Szostak, *Nature* **1994**, *371*, 31–36.
- [8] X. Dai, A. De Mesmaeker, G. F. Joyce, *Science* **1995**, *267*, 237–240.
- [9] A. A. Beaudry, G. F. Joyce, *Science* **1992**, *257*, 635.
- [10] J. A. Piccirilli, T. S. McConnell, A. J. Zaug, H. F. Noller, T. R. Cech, *Science* **1992**, *256*, 1420.
- [11] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818–822; M. Famulok, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3990–3991; J. Lorsch, J. W. Szostak, *Biochemistry* **1994**, *33*, 973–982; R. D. Jenison, S. C. Gill, A. Pardi, B. Polisky, *Science* **1994**, *263*, 1425–1429; M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1698–1706; P. Burgstaller, M. Famulok, *Angew. Chem.* **1994**, *6*, 1163–1166.

- Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1084–1087; C. T. Lauhon, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1246–1257.
- [12] K. N. Morris, T. M. Tharasow, C. M. Julin, S. L. Simons, D. Hilvert, L. Gold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 13028–13032.
- [13] R. R. Breaker, G. F. Joyce, *Chem. & Biol.* **1994**, *1*, 223–229.
- [14] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1992**, *355*, 850–852; L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *ibid.* **1992**, *355*, 564–566; D. E. Huizenga, J. W. Szostak, *Biochemistry* **1995**, *34*, 656–665.
- [15] T. Pan, O. C. Uhlenbeck, *Nature* **1992**, *358*, 560–563; T. Pan, O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **1992**, *32*, 3887–3895.
- [16] N. Lehman, G. F. Joyce, *Nature* **1993**, *361*, 182–185.
- [17] J. J. Rossi, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1992**, *3*, 3–7.

Die Struktur der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. gigas* und die Art ihres Nickelkomplexes

Malcolm A. Halcrow*

Das Enzym Hydrogenase nimmt im Metabolismus vieler Klassen von Bakterien und Archaeabakterien eine zentrale Rolle ein. Es fungiert dabei als Energie-Umwandler und ermöglicht die kontrollierte Bildung und Beseitigung von freien Elektronen und Protonen durch reversible Katalyse der H₂-Oxidation [Gl. (a)]^[1, 2].



Die durch die H₂-Oxidation erzeugten Protonen können unter anderem für die Aufrechterhaltung des zur ATP-Synthese benötigten Protonen-Gradienten verwendet werden, während die Elektronen der Reduktion von Elektronentransport-Cofaktoren wie Flavinen, Cytochromen oder NAD⁺ dienen und so in eine von mehreren Atmungsketten eingeschleust werden können. Der Wirkungsmechanismus dieses Enzyms ist für Biochemiker und Mikrobiologen und auch für Chemie-Ingenieure von Interesse, da er es den Organismen ermöglicht, unter Verwendung billiger Metalle wie Eisen und Nickel als Katalysatoren H₂ als Energiequelle in wäßrigem Milieu zu nutzen.

Die bei weitem häufigsten Hydrogenasen sind die [NiFe]-Enzyme, die ein Äquivalent Ni und unterschiedliche Mengen Fe und S²⁻ pro aktivem Zentrum enthalten. Eine Untergruppe, die [NiFeSe]-Hydrogenasen, enthält darüber hinaus pro Ni ein Se in Form von Selenocystein, das an das Ni-Ion gebunden ist. Eine kleine Gruppe nur Fe enthaltender Hydrogenasen ist ebenfalls bekannt, die ganz andere Eigenschaften haben als die [NiFe]-Enzyme. Trotz großer Variationen im Metallgehalt sowie in der Zusammensetzung der Untereinheiten und Cofaktoren^[1a] nimmt man an, daß die Struktur des Ni enthaltenden Zentrums in allen [NiFe]-Hydrogenasen ähnlich ist und daß die H₂-Oxidation an diesem Ni-Zentrum abläuft.

Das Ni-Zentrum der [NiFe]-Hydrogenasen weist eine komplexe Chemie auf, die wie folgt zusammengefaßt werden kann^[1, 2]: Die Enzyme werden im allgemeinen in einem von zwei inaktiven Zuständen (genannt „Ni-A“ und „Ni-B“) oder als Mischung aus beiden isoliert; beide Formen zeigen die für ein Ni^{III}-Ion mit einem d₂¹-Grundzustand typischen ESR-Spektren. Inkubation

dieser Enzyme mit H₂ oder anderen Reduktionsmitteln führt zum Verschwinden der Ni-A- und Ni-B-Spektren; es werden nacheinander eine ESR-inaktive „silent-intermediate“-Form, eine Form („Ni-C“) mit einem ESR-Spektrum, das einer Ni^{III}- oder einer Ni^I-Spezies mit einem d₂¹-Grundzustand zugeschrieben werden kann, und schließlich eine vollständig reduzierte Form („Ni-R“), die ebenfalls kein Ni-bedingtes ESR-Signal aufweist, gebildet. Das silent intermediate sowie die Formen Ni-C und Ni-R sind bezüglich H₂-Oxidation oder Protonenreduktion aktiv; das ESR-Spektrum der Ni-C-Form wurde in intakten Bakterien beobachtet. Photolyse der Ni-C-Form bei niedriger Temperatur und ihre Inkubation mit CO führen zur reversiblen Bildung neuer ESR-aktiver Spezies, die ineinander umgewandelt werden können. Die Ni-A-, Ni-B- und Ni-C-ESR-Spektren zeigen bei niedrigen Temperaturen Aufspaltungen, die mit Kopplungen zu einem benachbarten, paramagnetischen Zentrum in Einklang sind; alle genannten ESR-Signale werden zusätzlich zu denen beobachtet, die von den Eisen-Schwefel-Clustern stammen, die eine Elektronentransportkette vom und zum aktiven Zentrum bilden.

Die Struktur des Ni-Komplexes der Hydrogenase und die Zuordnung der unterschiedlichen Redox-Zustände dieses ungewöhnlichen biologisch aktiven Metallzentrums zu seiner Funktion wurden über eine Dekade kontrovers diskutiert. Eine Unmenge von ESR- und röntgenographischen (XAS) Daten führte allgemein zur Formulierung von zwei Strukturmodellen für das Ni-Zentrum der Hydrogenase: isolierte Ni-Ionen mit quadratisch-planarer oder quadratisch-pyramidal Koordination, [Ni(cys)₄L]²⁻, cysH = Cystein, L = freie Koordinationsstelle bzw. N/O-Donor (Abb. 1, A), oder (pseudo)trigonal-bipyramidal Koordination, [Ni(cys)(N/O)₃L] und [Ni(Secys)(cys)(N/O)₃L], SecysH = Selenocystein (Abb. 1, B)^[1, 2]. Einige Autoren schlugen auch das Vorliegen eines durch einen Cysteinyl- oder S²⁻-Brückenliganden kovalent mit dem Ni-Ion verknüpften [Fe₄S₄]-Clusters vor (Abb. 1, C)^[3a]. Die Zuordnung des ESR-Signals der Ni-C-Spezies zu einem Ni^{III}- oder einem Ni^I-Zentrum – wichtig für den Mechanismus der Enzymkatalyse – ist ähnlich umstritten^[1, 2]. Sorgfältige XAS-Untersuchungen an einer Hydrogenase stellten sogar die Beteiligung von Ni an jedem Redoxprozessen in Frage^[3]. Jetzt haben Volbeda et al. mit der ersten veröffentlichten Einkristall-Röntgenstrukturanalyse einer Hydrogenase, und zwar der [NiFe]-Hydrogenase aus

[*] Dr. M. A. Halcrow^[1, 2]

Department of Chemistry, University of Cambridge
Lensfield Road, CB2 1EW (Großbritannien)
Telefax: Int. +1223/336-362

[+] Der Autor ist ein Royal Society University Research Fellow.