

Katalyse organischer Reaktionen durch Ribonucleinsäuren

Christian Frauendorf und Andres Jäschke*

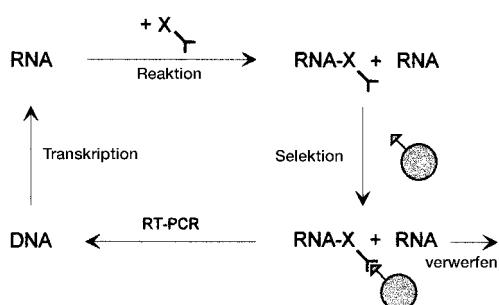
Seit Anfang der achtziger Jahre ist bekannt, daß Ribonucleinsäuren (RNAs) neben ihrer traditionellen Rolle in der Weitergabe der genetischen Information auch als Katalysatoren in chemischen Reaktionen wirken können.^[1] Diese Entdeckung, die 1989 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde, belebte frühere Hypothesen über die Existenz einer präbiotischen „RNA-Welt“. Darin werden genetische Informationen mit Hilfe der RNA gespeichert und chemische Reaktionen durch sie kontrolliert.^[2] Während die Suche nach weiteren natürlichen Ribozymen in den letzten Jahren nicht zu wesentlichen Neuentdeckungen führte, wurden durch die Anwendung der in-vitro-Selektion und -Evolution wichtige Erkenntnisse über das katalytische Potential der RNA gewonnen.^[3]

Die erfolgreichste Methode zur Selektion von RNA-Katalysatoren ist die direkte Selektion. Dabei werden aus RNA-Bibliotheken diejenigen Mitglieder selektiert, die bei der Umsetzung mit einem Substrat (X, Schema 1) beschleunigt mit diesem reagieren und somit Substrat- und Katalysatoreigenschaften in einem Molekül vereinen. Das Substrat X enthält eine Ankergruppe, die in unmodifizierter RNA nicht

Während in den ersten Jahren bei der Aufklärung des katalytischen Potentials Reaktionen an den funktionellen Gruppen der RNA im Vordergrund standen (Acylierungen, Alkylierungen, Phosphorylierungen von RNA),^[4] erschienen kürzlich mehrere Arbeiten, in denen die Beschränkung auf Selbstmodifizierungsreaktionen der RNA überwunden wurde, indem linkergekoppelte Reaktanten eingesetzt wurden. Hier werden Anwendungen in der Diels-Alder-Reaktion, der Synthese von Carbonsäureamiden und -estern sowie der Peptidsynthese vorgestellt, die besonders für Synthesechemiker interessant sind.

Eaton und Mitarbeitern gelang es, durch direkte Selektion mit linkergekoppelten Reaktanten, Katalysatoren für die Diels-Alder-Reaktion zu finden.^[5] Trotz ihrer untergeordneten biochemischen Bedeutung^[6] stand diese zentrale Reaktion der organischen Synthese immer wieder im Zentrum innovativer Ansätze in der Katalyseforschung. So wurde mehrere Jahre vergeblich versucht, durch Selektion von RNA-Molekülen mit hoher Affinität zu Übergangszustandsanaloga Katalysatoren für die Diels-Alder-Reaktion zu generieren.^[7] Eatons Selektionsschema ging von einem Pool von 10^{14} RNA-Molekülen aus. Diese bestanden aus 100 randomisierten Positionen, die von zwei konstanten Sequenzbereichen flankiert waren (Schema 2a). Die RNA-Moleküle wurden enzymatisch mit einem Polyethylenglycol(PEG)-Linker der mittleren Molmasse von 2000 verknüpft, an den das Dien, ein Hexadienol, gebunden war. Durch den hochflexiblen PEG-Linker ist das Dien ähnlich beweglich wie die freie Verbindung in Lösung und kann theoretisch mit allen Bereichen eines gefalteten RNA-Moleküls wechselwirken. Dieser Pool von RNA-Linker-Dien-Konjugaten wurde in Gegenwart verschiedener Metallionen mit einem biotinylierten Maleinimid als Dienophil inkubiert. Die an die RNA gebundenen biotinylierten Cycloadditionsprodukte wurden danach mit Hilfe von Streptavidin, einem Biotin-bindenden Protein, von den unmodifizierten RNAs abgetrennt und enzymatisch amplifiziert. Für letzteres ist wichtig, daß der randomisierte Bereich der RNA von zwei Primerbindungsstellen konstanter Sequenz flankiert wird. Nach erneuter Einführung des an einen Linker gebundenen Diens wurde der erhaltene angereicherte Pool weiteren Selektionsrunden unterzogen.

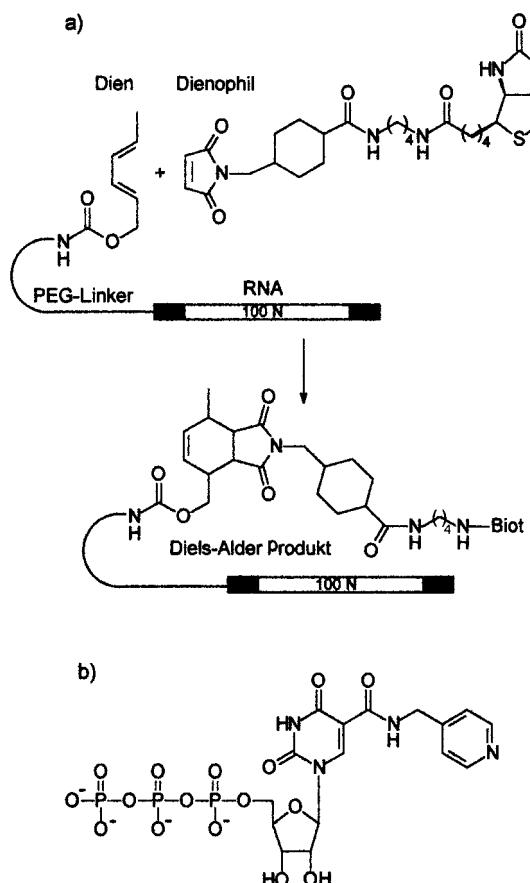
Von besonderer Bedeutung für die Katalyse war auch, zusätzliche Funktionalitäten in die RNA einzuführen.^[8] So wurde bei der enzymatischen RNA-Synthese anstelle von Uridin-5'-triphosphat (UTP) das Analogon 5-[(4-Pyridylmethyl)carbamoyl]-UTP (Schema 2b) verwendet, um in der RNA zusätzliche Möglichkeiten für hydrophobe und dipolare Wechselwirkungen, für Wasserstoffbrückenbindungen sowie für Metallionenkoordinationen zu erzeugen. Nach zwölf Selektions- und Amplifizierungsrunden waren die aktiven Moleküle stark angereichert, und acht Sequenzfamilien wurden identifiziert, die die Reaktion bis zu 800fach gegen-



Schema 1. Allgemeines Prinzip der direkten Selektion mit einer kombinatorischen RNA-Bibliothek.

vorhanden ist (z.B. eine Thiol- oder Biotinylgruppe). Anschließend werden durch Affinitätschromatographie die RNA-Moleküle isoliert, die kovalent mit dem Substrat, das die Ankergruppe enthält, verknüpft sind. Die RNA-Moleküle werden enzymatisch amplifiziert, indem sie durch reverse Transkription in DNA umgeschrieben und diese dann durch Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt wird. Aus der doppelsträngigen DNA wird durch Transkription wieder die RNA generiert, die erneut der Selektion unterzogen wird. Dieser Cyclus wird so lange wiederholt, bis nur noch wenige RNAs den Pool dominieren.

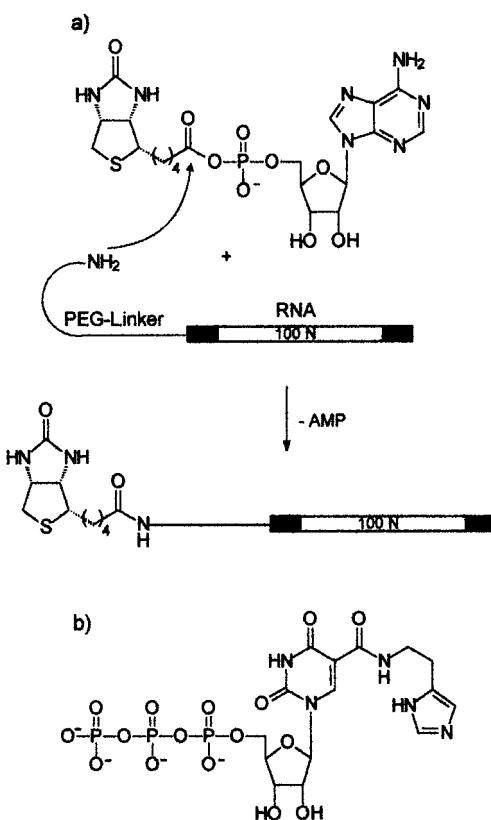
[*] Dr. A. Jäschke, Dipl.-Chem. C. Frauendorf
Institut für Biochemie der Freien Universität
Thielallee 63, D-14195 Berlin
Fax: (+49) 30-838-6413
E-mail: jaschke@chemie.fu-berlin.de



Schema 2. a) Reaktionsschritt zur Selektion einer Diels-Alderase aus einer kombinatorischen RNA-Bibliothek. Biot-OH = Biotin. b) 5-[(4-Pyridylmethyl)carbamoyl]-UTP, das anstelle von Uridintriphosphat (UTP) bei der enzymatischen RNA-Synthese eingesetzt wurde.

über der unkatalysierten Hintergrundreaktion beschleunigten. Sehr wichtig für die katalytische Aktivität war die oben beschriebene Uridylmodifizierung; unmodifizierte RNA-Moleküle gleicher Nucleotidsequenz waren erwartungsgemäß inaktiv, da sie sich in andere dreidimensionale Strukturen falten und die zusätzlichen Wechselwirkungsmöglichkeiten entfallen. Der am gründlichsten charakterisierte Katalysator war nur in Gegenwart von Cu^{2+} -Ionen aktiv. Da Diels-Alder-Reaktionen durch Lewis-Säuren katalysiert werden,^[9] vermuten die Autoren, daß die RNA diese Kupferionen, möglicherweise über die Pyridylreste, koordiniert.

Mit der RNA-katalysierten Amidsynthese beschreiben Eaton und Mitarbeiter die Anwendung dieser Katalyse in einer weiteren wichtigen Reaktion, wobei sie ein ähnliches Selektionsschema nutzten.^[10] Sie kuppelten ein primäres aliphatisches Amin an das Ende des PEG-Linkers und setzten den so erhaltenen RNA-Pool mit dem Anhydrid aus Biotin und Adenosinmonophosphat (AMP) um (Schema 3a). Anschließend wurden die kovalent mit Biotin verknüpften Konjugate isoliert und amplifiziert. Es wurden ebenfalls modifizierte Nucleotide eingesetzt; so war die 5-Position des Uracils mit dem (5-Imidazolylethyl)carbamoyl-Rest derivatisiert, von dem verbesserte Eigenschaften in der allgemeinen Säure/Base-Katalyse sowie bei der Metallionenkoordination erwartet wurden (Schema 3b). In den Selektionsrunden



Schema 3. a) Reaktionsschritt zur Selektion einer Amidsynthetase. b) 5-[(5-Imidazolylethyl)carbamoyl]-UTP, das anstelle von Uridintriphosphat (UTP) bei der enzymatischen RNA-Synthese eingesetzt wurde.

wurde durch Herabsetzung der Konzentrationen der Reaktanten und durch Verkürzung der Reaktionszeit der Selektionsdruck erhöht, um die aktivsten RNAs zu isolieren. Nach 16 Selektionsrunden ergab die kinetische Charakterisierung einzelner selektierter RNAs bis zu 110000fache Reaktionsbeschleunigungen. Auch hier war die Reaktionsbeschleunigung durch die für eine detaillierte Charakterisierung ausgewählte RNA stark von der Modifikation der Nucleotide und von der Konzentration verschiedener Metallionen abhängig. Interessanterweise wird der Adeninrest, der im freien Reaktanten Biotin-AMP enthalten ist, nicht für die Substraterkennung benötigt. Die Geschwindigkeitskonstanten, die mit den analogen Verbindungen Uridinmonophosphat-Biotin und Ribose-5-Phosphat-Biotin ermittelt wurden, waren nahezu identisch zu der, die für Biotin-AMP erhalten wurde.

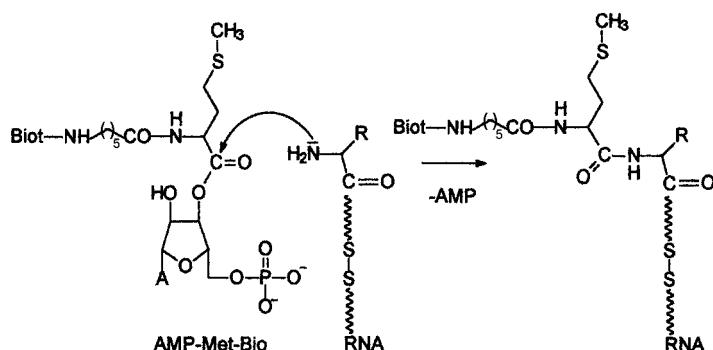
Diese beiden Arbeiten der Gruppe um Eaton zeigen die erfolgreiche Anwendung der direkten Selektion auf synthetisch wichtige Reaktionen. Eine Reihe interessanter Fragen bleiben jedoch unbeantwortet und geben Raum für weiterführende Untersuchungen: Können die selektierten RNAs nicht nur gegenüber Reaktanten, die an Linker gebunden sind, sondern auch als echte Katalysatoren mit zwei freien Reaktanten wirken? Können diese Moleküle mit multiplem Turnover arbeiten? Wie wird – insbesondere bei der Diels-Alder-Reaktion – die Stereochemie der Reaktion beeinflußt? Lenken unterschiedliche RNAs die Reaktion zu verschiedenen Produkten?

Auch Zhang und Cech verwendeten linkergekoppelte Reaktanten bei der Suche nach RNA-Molekülen, die Peptidbindungen knüpfen.^[11] Nachdem bereits gezeigt worden war, daß RNAs ihr eigenes 3'-Ende aminoacylieren können und daß eine an RNA gebundene Aminosäure auf ein anderes RNA-Molekül übertragen werden kann,^[4a,b] wurde nun untersucht, ob RNAs die Kupfung von Peptidbindungen ähnlich wie im Ribosom katalysieren können.^[12] Die RNAs des Pools wurden an ihrem 5'-Ende über einen kurzen Cystamin-Spacer, der eine reduktiv spaltbare Disulfidbrücke enthält, an Phenylalanin ($R = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, Schema 4) gebunden. Des-

tät zeigen, wurden ausschließlich Ribozyme selektiert, die die Übertragung der biotinylierten Aminosäure vom Acyldonor-molekül auf eine bestimmte interne 2'-Hydroxygruppe der RNA katalysieren. Möglicherweise wurden unter den angewandten Selektionsbedingungen Aminoacyltransferasen bevorzugt angereichert, wohingegen die Population von peptid-bindungsknüpfenden Ribozymen im Laufe der Selektion eliminiert wurde. Im Rahmen der kinetischen Charakterisierung gelang es, das ursprünglich isolierte Ribozym in einen intermolekular wirksamen Katalysator umzuwandeln, der die Aminoacylierung eines externen Oligonucleotids in Gegenwart des Acyldonor-moleküls katalysiert.

Die dargestellten Beispiele zeigen, daß die katalytischen Fähigkeiten der RNA weit über Modifizierungsreaktionen an den funktionellen Gruppen von Ribonucleinsäuren hinausgehen. Die Möglichkeit, Katalysatoren mit gezielt einstellbaren Eigenschaften und mit beeinflußbarer Spezifität herzustellen, machen diese Techniken über das Gebiet der präbiotischen Chemie hinaus attraktiv, zumal es möglich und gebräuchlich ist, ein einmal gefundenes aktives Sequenzmotiv zum Ausgangspunkt für erneute Selektionen nach veränderten Eigenschaften zu nutzen. Es ist durchaus vorstellbar, katalytisch wirksame RNAs in bioorganischen oder auch in kombinatorischen Synthesen einzusetzen. Für den praktischen Einsatz von Ribozymen in der Synthese sind jedoch noch umfangreiche Untersuchungen nötig. Die hier vorgestellten Strategien, aber auch alternative Methoden^[14] könnten dabei eine bedeutende Rolle spielen.

Stichwörter: Katalyse • Oligonucleotide • Ribozyme • RNA • Selektion



Schema 4. RNA-katalysierte Peptidbindungs-Knüpfung. Biot-OH = Biotin; $R = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$.

sen freie Aminogruppe fungiert als Aminoacylacceptor. Als freier Reaktant und Aminoacyldonor diente der aktivierte Aminoacylester 2'(3')-[6-(Biotinylamido)caproyl-L-methionyl]adenosin-5'-monophosphat (AMP-Met-Bio), ein einfaches Modell der natürlichen *N*-Formylmethionyl-tRNA. Die biotinylierte RNA wurde mit Hilfe von trägegebundenem Streptavidin durch Affinitätschromatographie isoliert und durch reduktive Spaltung der Disulfidbrücke im Linker wieder freigesetzt. Bei diesem Schritt gelang es, selektiv die RNAs freizusetzen, bei denen die Reaktion am gebundenen Phenylalanin erfolgte. Nebenprodukte, bei denen das Biotin mit internen Positionen der RNA verknüpft war, wurden abgetrennt, da sie auch nach Spaltung der Disulfidbrücke immobilisiert blieben. Nach 19 Selektionsrunden wurden die aktiven RNAs isoliert und sequenziert. Mindestens zwei Klassen von Sequenzen ließen sich unterscheiden. Die kinetische Untersuchung einer RNA ergab gegenüber der unkatalysierten Reaktion eine Beschleunigung von etwa 1:10⁶, wobei hohe Magnesiumionenkonzentrationen erforderlich waren. Der Linker ist ebenfalls essentiell für die Reaktionsbeschleunigung, vermutlich sorgen spezifische Kontakte zwischen RNA und Linker für die exakte Ausrichtung des gebundenen Reaktanten. Im freien Reaktanten (AMP-Met-Bio) ist das AMP, nicht jedoch das Biotin oder die Aminosäure an der Erkennung beteiligt, so daß auch andere Aminosäuren aus entsprechenden AMP-Derivaten auf den Acceptor übertragen werden.

Interessanterweise kamen Jenne und Famulok mit einem sehr ähnlichen Ansatz zu einem ganz anderen Ergebnis.^[13] In ihrem Fall wurde die an den Linker gebundene Aminosäure ignoriert: Statt Verbindungen, die Peptidyltransferaseaktivitä-

- [1] K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, *Cell* **1982**, *31*, 147–157; C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *ibid.* **1983**, *35*, 849–857.
- [2] W. Gilbert, *Nature* **1986**, *319*, 618; S. A. Benner, A. D. Ellington, A. Tauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 7054–7058.
- [3] P. Burgstaller, M. Famulok, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1303–1307; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1188–1192; L. Jaeger, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 324–335; J. R. Lorsch, J. W. Szostak, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 103–110; R. R. Breaker, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 371–390.
- [4] a) M. Illangasekare, G. Sanchez, T. Nickles, M. Yarus, *Science* **1995**, *267*, 643–647; b) P. A. Lohse, J. W. Szostak, *Nature* **1996**, *381*, 442–444; c) J. R. Lorsch, J. W. Szostak, *ibid.* **1994**, *371*, 31–36; d) C. Wilson, J. W. Szostak, *ibid.* **1995**, *374*, 777–782.
- [5] T. M. Tarasow, S. L. Tarasow, B. E. Eaton, *Nature* **1997**, *389*, 54–57.
- [6] S. Laschat, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 313–315; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 289–291.
- [7] K. N. Morris, T. M. Tarasow, C. M. Julin, S. L. Simons, D. Hilvert, L. Gold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 13028–13032.
- [8] M. P. Robertson, S. L. Miller, *Science* **1995**, *2680*, 702–705; B. E. Eaton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 10–16.
- [9] S. Otto, F. Bertoncini, J. B. F. N. Engberts, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7702–7707.
- [10] T. W. Wiegand, R. C. Janssen, B. E. Eaton, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 675–683.
- [11] B. Zhang, T. R. Cech, *Nature* **1997**, *390*, 96–100.
- [12] H. F. Noller, V. Hoffarth, L. Zimniak, *Science* **1992**, *256*, 1416–1419.
- [13] A. Jenne, M. Famulok, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 23–34.
- [14] B. Seelig, A. Jäschke, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7729–7732; F. Hausch, A. Jäschke, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 885–890.