



## Chemie und Biologie von Nucleinsäuren\*\*

Jens Kurreck\*

Im vergangenen Jahr wurden kleine RNAs von *Science* zum „Durchbruch des Jahres“ gekürt. Es ist daher nicht verwunderlich, dass Thomas Tuschl, der kürzlich vom Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen an die Rockefeller University in New York (USA) gewechselt ist, den Eröffnungsvortrag des 5. Cambridge-Symposiums „Nucleic Acids Chemistry and Biology“ gehalten hat. Nur kurz ging er auf seine bahnbrechende Entdeckung von 2001 ein, dass kurze doppelsträngige RNA-Moleküle, die als small interfering RNAs oder siRNAs bezeichnet werden, zur sequenzspezifischen Suppression einer Genexpression durch RNA-Interferenz in eukaryontischen Zellen eingesetzt werden können.<sup>[1]</sup> Den Schwerpunkt seines Vortrags bildeten neue Erkenntnisse über Mikro-RNAs (miRNAs). Diese sind – wie auch die siRNAs – etwa 21 Nucleotide lang, sie inhibieren aber die Synthese des Ziel-Proteins durch Bindung an eine homologe mRNA, ohne sie zu zerstören. Natürlicherweise nehmen miRNAs zahlreiche regulatorische Funktionen in den Zellen wahr. Einige hundert miRNAs konnten bislang in Säugern und *Drosophila melanogaster* identifiziert werden; derzeit wird nach weiteren miRNAs sowie deren Zielmolekülen gesucht.

Die nachfolgenden Vortragenden beschäftigten sich mit der Anwendung

von siRNAs zur Target-Validierung. François Natt (Basel, Schweiz) präsentierte Pläne der Firma Novartis, beliebige Teile des gesamten Genoms mittels RNA-Interferenz auszuschalten. In umfangreichen Vortests mit mehreren tausend siRNAs wurden Kriterien für das Design effizienter siRNAs entwickelt. Nun sollen 50 000 siRNAs synthetisiert und zur Target-Validierung eingesetzt werden. In den Diskussionen zu den Vorträgen über RNA-Interferenz in Säugerzellen gab es jedoch auch kritische Beiträge, in denen auf eine kürzlich erschienene Studie verwiesen wurde, in der eine Interferon-Induktion durch siRNAs beschrieben wird.<sup>[2]</sup>

Traditionell hat die Nucleinsäurechemie einen hohen Stellenwert bei den seit 1981 in unregelmäßigen Abständen stattfindenden Cambridge-Symposien. So wurden auch in diesem Jahr zahlreiche modifizierte Nucleotide vorgestellt. Jesper Wengel (Odense, Dänemark) hatte vor einigen Jahren Locked Nucleic Acids (LNA) als eine Modifikation mit zahlreichen vorteilhaften Eigenschaften entwickelt.<sup>[3]</sup> Mittlerweile ist es seiner Gruppe gelungen, Analoga der LNA zu synthetisieren, etwa LNAs mit einem Phosphorothioat-Rückgrat,  $\alpha$ -L-LNA, 2'-Amino-LNA oder *xylo*-konfigurierte Nucleotide. Neben Wengel berichteten auch andere Redner über den erfolgreichen Einsatz von LNAs in Antisense-Oligonucleotiden, katalytisch aktiven Desoxyribozymen, Triplex bildenden Oligonucleotiden (triplex-forming oligonucleotide, TOF), siRNAs oder Aptameren.

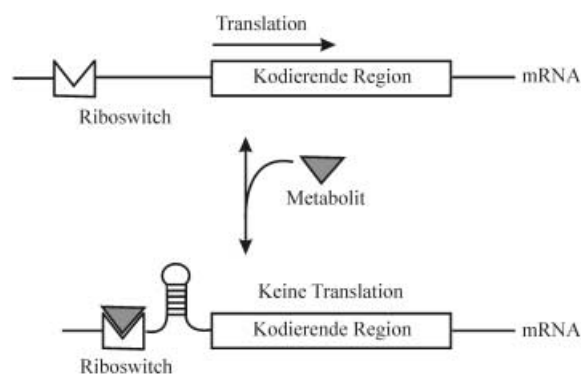
In einigen Beiträgen wurden Ergebnisse zu katalytisch aktiven Oligonucleotiden präsentiert. Eindrucksvoll war David Lilley (Dundee, Großbritannien) Demonstration, wie man mithilfe von biochemischen und biophysikalischen Methoden detaillierte Strukturinformationen auch von solchen Molekülen gewinnen kann, von denen keine Kristallstruktur bekannt ist. Das VS-Ribozym aus *Neurospora* ist das einzige der bekannten nucleolytischen Ribozyme, dessen Kristallisation bislang nicht gelungen ist. Mit Hilfe von vergleichender Gelelektrophorese, Messungen des resonanten Fluoreszenz-Energietransfers (FRET) und Mutationsstudien gelang es, die Faltung des

Ribozyms zu analysieren, das katalytische Zentrum zu lokalisieren und damit ein dreidimensionales Bild zu erstellen.<sup>[4]</sup> Sabine Müller (Bochum) stellte das in ihrer Arbeitsgruppe entwickelte Twin-Ribozym vor, das zu einem neuen Werkzeug zur RNA-Reparatur werden könnte.<sup>[5]</sup> Zwei miteinander verbundene Hairpin-Ribozyme werden hierbei eingesetzt, um ein Fragment aus einer längeren RNA herauszuschneiden. Da Hairpin-Ribozyme nicht nur Spalt-, sondern auch Ligaseaktivität besitzen, kann anschließend ein Reparatur-Oligonucleotid eingebaut werden.

Ein Höhepunkt des Symposiums war zweifelsohne Ronald Breakers (New Haven, CT, USA) Vortrag über die Metabolismus-Kontrolle durch „Riboswitches“.<sup>[6a]</sup> Schon länger hatte Breaker an künstlichen molekularen Schaltern zur allosterischen Kontrolle von Ribozymen gearbeitet. Hierzu wird ein Liganden bindendes Aptamer über ein Induktionselement an ein Ribozym gekoppelt. Die Zugabe des Liganden bewirkt eine Konformationsänderung, durch die das Ribozym aktiviert wird und ein Signal-Oligonucleotid abspaltet. Zur praktischen Anwendung können diese allosterischen Ribozyme auf Chips fixiert und als Biosensoren verwendet werden. Nun haben Breaker und seine Mitarbeiter entdeckt, dass ihnen die Natur zuvorgekommen ist: Die Regulation der meisten Stoffwechselwege findet über Proteine statt, die mit einem Metaboliten wechselwirken und dann durch Bindung an die DNA die Genexpression kontrollieren. In einigen Fällen aber ist es die mRNA selbst, die ein Zielmolekül bindet und dadurch die Proteinsynthese abschaltet.<sup>[6b]</sup> Beispielsweise wird der Purin-Stoffwechsel in *Bacillus subtilis* durch einen RNA-Biosensor reguliert. Der hierfür zentrale Riboswitch in der 5'-untranslatierten Region von mRNAs, die in den Purin-Transport und die Purin-Biosynthese involviert sind, besteht aus zwei Domänen: Eine Aptamer-Domäne bindet das Zielmolekül, und eine Kontrolleinheit reguliert nach Bindung des Zielmoleküls über allosterische Konformationsänderungen die Genexpression. Abbildung 1 zeigt ein Beispiel der verschiedenen Mechanismen der Expressionskontrolle durch Riboswitches, die sowohl die Transla-

[\*] J. Kurreck  
Institut für Chemie (Biochemie)  
Freie Universität Berlin (Deutschland)

[\*\*] 5th Cambridge Symposium, Cambridge, UK, 31. September – 3. Oktober 2003



**Abbildung 1.** Schematische Darstellung eines Riboswitch. In Abwesenheit des Zielmoleküls wird das kodierte Protein synthetisiert. Die Bindung des Metaboliten führt zu einer Konformationsänderung, durch die die Translation gestoppt wird.

tion als auch die Transkription regulieren können. Die bisher bekannten Riboswitch-Klassen kontrollieren 68 Gene oder 2% der genetischen Komponenten der Bakterien. Interessanterweise wurden mittlerweile auch Kandidaten für Riboswitches in eukaryontischen Zellen aus Pflanzen und Pilzen identifiziert.

Einen weiteren Höhepunkt stellte der Festvortrag von Stephen J. Benkovic (PA, USA) dar, dem auf diesem Cambridge-Symposium der diesjährige Nucleic Acids Award verliehen wurde. Er sprach über DNA-Replikation durch das T4-Replisom. Acht Proteine sind an diesem Prozess zentral beteiligt, deren Aufbau und Wechselwirkungen durch Crosslinking und Einzelmolekül-FRET Messungen detailliert untersucht wurden.

Eine eigene Session war DNA-Arrays gewidmet: Jörg Hoheisel (Heidelberg) stellte in seinem Übersichtsvortrag Methoden zur Herstellung der Chips sowie deren Anwendungsgebiete vor.<sup>[7]</sup> Derzeit wird ein DNA-Array entwickelt, mit dessen Hilfe mehrere Stämme des humanen Papillomavirus unterschieden werden können. Fast alle Frauen sind mit diesem Virus infiziert, und so ist es bedeutsam, diejenigen zu identifizieren, die Trägerinnen gefährlicher Stämme sind und ein erhöhtes Risiko haben, ein Cervix-Karzinom zu entwickeln. In einem weiteren Projekt sollen Einzelnucleotid-Polymorphismen (Single-Nucleotide Polymorphism, SNP) diagnostiziert werden, die eine genaue Prognose bei Krebserkrankungen ermöglichen. In weiteren Vorträgen wurde über die Weiterentwicklung von

Farbstoffen zur Detektion auf den DNA-Chips berichtet. Oliver Seitz (Berlin) und seine Mitarbeiter entwickeln Fluorophore, mit denen eine homogene Detektion möglich ist, bei der sich sowohl der Analyt als auch die Probe in Lösung befinden.

Eric Wickstrom (Philadelphia, PA, USA) berichtete über neue Ergebnisse zur nicht invasiven Tumordiagnostik mit radioaktiv markierten Oligonucleotiden. Er verwendet PNAs, die am einen Ende über einen Chelator ein Radionuklid (z.B. Technetium) und am anderen Ende ein Peptid tragen, das eine Rezeptorvermittelte Endocytose ermöglicht. Diese Konstrukte werden nur von invasiven Tumorzellen aufgenommen, die auf ihrer Oberfläche den IGF-1-Rezeptor tragen. Im Tiermodell konnte damit ein Tumor spezifisch markiert werden.

Die Firma Hybridon (Cambridge, MA, USA) entwickelt immunmodulatorische Oligonucleotide zur Therapie von Erkrankungen. Sundhir Agrawal präsentierte die Ergebnisse seiner langjährigen Forschung auf diesem Gebiet. Oligonucleotide, die ein CpG-Motiv enthalten, aktivieren das Immunsystem durch Bindung an Toll-ähnliche Rezeptoren. Diese können als antivirale Agenzien oder als Therapeutika für Krebserkrankungen eingesetzt werden, eignen sich aber auch als Hilfsstoffe zur Verbesserung der Immunantwort bei Impfungen oder zur Behandlung von Asthma und Allergien. Agrawal schloss mit einer kritischen Anmerkung zu den bisherigen klinischen Studien, die mit Antisense-Oligonucleotiden durchgeführt wurden. Diese verliefen vielfach enttäuschend und lieferten zum Teil zweifelhafte Ergebnisse. Agrawal wies darauf hin, dass hierbei Oligonucleotide mit CpG-Motiven verwendet wurden, sodass unter Umständen kein Antisense-Effekt, sondern eine Immunstimulation beobachtet wurde. In diesen Zusammenhang passt auch die enttäuschende Nachricht für die Forscher, die im Antisense-Feld arbeiten, dass kürzlich das einzige zugelassene Antisense-Medikament, Vitragen zur Behandlung von Cytomegalie-Virus induzierter Retinitis, vom europäischen Markt genommen wurde – allerdings nicht aus

medizinischen Gründen, sondern aus kommerziellen Motiven. Nicht einmal 100 Einheiten des Medikaments wurden jährlich in Europa verwendet.

Gerade wegen dieser Enttäuschungen der Vergangenheit sind die Hoffnungen, die mit den neuen zur Verfügung stehenden Techniken verbunden sind, umso größer. Mit der Methode der RNA-Interferenz scheinen sich die Effizienzprobleme traditioneller Antisense-Moleküle überwinden zu lassen. Außerdem wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche modifizierte Nucleotide mit vorteilhaften Eigenschaften wie Nuclease-Resistenz, hoher Target-Affinität und guter zellulärer Aufnahme entwickelt. Das Cambridge-Symposium bietet einen hervorragenden Rahmen, um auf diesem Gebiet arbeitende Chemiker, Molekularbiologen und Mediziner zusammenzubringen und einen fruchtbaren Austausch zwischen den Disziplinen zu fördern. Angesichts der Dynamik, die sich auf dem Gebiet der Nucleinsäurechemie in den vergangenen Jahren entwickelt hat, waren sich die Tagungsteilnehmer einig in der Hoffnung, dass die Organisatoren Mike Gait, Rick Cosstick und Shankar Balasubramanian schon bald wieder die Zeit und Kraft finden werden, ein weiteres Symposium zu organisieren.

- [1] a) M. S. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, 411, 494–498; b) D. S. Conklin, *ChemBioChem* **2003**, 4, 1033–1039.
- [2] C. A. Sledz, M. Holko, M. J. de Veer, R. H. Silverman, B. R. G. Williams, *Nat. Cell Biol.* **2003**, 5, 834–839.
- [3] M. Petersen, J. Wengel, *Trends Biotechnol.* **2003**, 21, 74–81.
- [4] D. A. Lafontaine, D. G. Norman, D. M. J. Lilley, *EMBO J.* **2002**, 21, 2461–2471.
- [5] R. Welz, K. Bossmann, C. Klug, C. Schmidt, H.-J. Fritz, S. Müller, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 2526–2530; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2424–2427.
- [6] a) W. C. Winkler, R. R. Breaker, *ChemBioChem* **2003**, 4, 1024–1032; b) M. Mandal, B. Boese, J. E. Barrick, W. C. Winkler, R. R. Breaker, *Cell J.* **2003**, 113, 577–586.
- [7] M. C. Pirrung, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1326–1341; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1276–1289.