

## Regulation der Genexpression

# Polyamide als artifizielle Transkriptionsfaktoren: neue Hilfsmittel der molekularen Medizin?

Katja Schmitz und Ute Schepers\*

### Stichwörter:

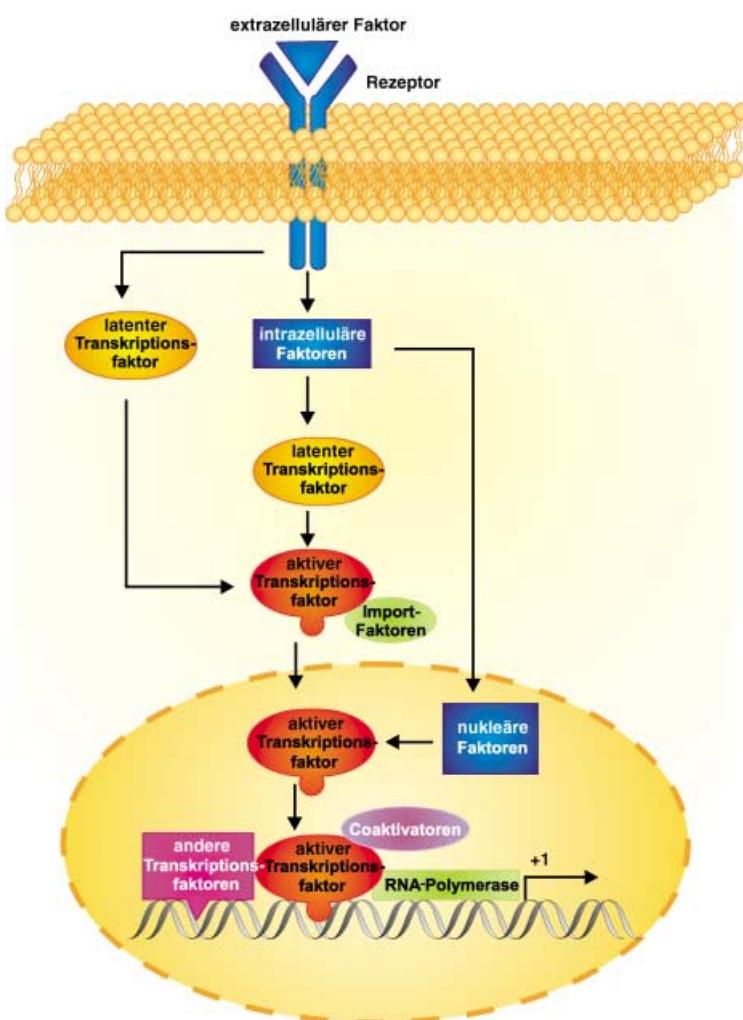
Genexpression · Polyamide · Transkriptionsfaktoren · Wirkstoff-Design · Zinkfinger

Die moderne Medizin benötigt immer mehr maßgeschneiderte Wirkstoffe, um die weit verbreiteten und facettenreichen Erkrankungen der heutigen Zeit wirksam zu bekämpfen. Deshalb konzentriert sich die chemische Forschung nicht nur auf die Entwicklung kleiner Moleküle als pharmakologisch aktive Wirkstoffe, sondern auch auf viele synthetische Verbindungen, die gezielt zelluläre Funktionen imitieren. Solche Verbindungen reichen von künstlichen Rezeptoren und ihren Liganden bis zu Molekülen, die spezifisch DNA erkennen. Letztere sind wegen ihrer potentiellen Anwendung zur Manipulation der Genexpression interessant.

In verschiedensten Organismen, von einfachen Bakterien bis hin zu höheren Eukaryonten wie dem Menschen, werden fast alle biologischen Funktionen individuell durch zeitliche und räumliche Expression der beteiligten Gene kontrolliert. Eine Vielzahl von entwicklungs- und umweltspezifischen Einflüssen aktiviert eine komplizierte Kette intrazellulärer Reaktionen, an deren Ende ein regulatorisches Molekül aus dem Zytoplasma in den Zellkern transferiert wird, wo es schließlich mit einem Gen wechselwirkt und dessen Expression verändert (Abbildung 1). Solche regulatorischen Moleküle sind entweder aktivierte Transkriptionsfaktoren oder Proteine, die ihrerseits Transkriptions-

faktoren aktivieren. Die Expression eines jeden Gens ist hoch sensibel gegenüber Veränderungen in der Zusamme-

nung der Transkriptionsfaktoren, so dass in jedem Zelltyp ein einzigartiges und charakteristisches Muster von Ge-



**Abbildung 1.** Schematische Darstellung der transkriptionellen Regulation (nach Darnell).<sup>[1]</sup> Latente Transkriptionsfaktoren werden gewöhnlich an der Zellmembran aktiviert. Die Aktivierung kann als Antwort auf Konzentrationsänderungen extrazellulärer oder intrazellulärer Moleküle erfolgen. Die aktivierte Transkriptionsfaktoren werden in den Zellkern transportiert, wo sie an den regulierten Genexpressionsorten teilnehmen. Die aktiven Faktoren binden an andere Transkriptionsfaktoren, die wiederum an Coaktivatoren und die RNA-Polymerase II binden, um die Transkription einzuleiten.

[\*] Dipl.-Chem. K. Schmitz, Dr. U. Schepers  
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie  
Universität Bonn  
Gerhard-Domagk-Straße 1  
53121 Bonn (Deutschland)  
Fax: (+49) 228-73-7778  
E-mail: schepers@uni-bonn.de

nen exprimiert wird und die Menge der jeweiligen Genprodukte dem aktuellen Bedarf angepasst werden kann. Störungen und Eingriffe in dieses Gleichgewicht führen zu einer Fehlregulation der Genexpression und damit häufig zu schweren Störungen in der Entwicklung oder zu unkontrolliertem Zellwachstum, z.B. bei Krebs. Sowohl die transkriptionelle Aktivierung bestimmter wachstumsfördernder Gene (Oncogene) als auch die transkriptionelle Repression von Tumorsuppressorgenen kann das unkontrollierte Wachstum von Zellen auslösen.<sup>[1-8]</sup> Daher wurden künstliche Aktivatoren und Repressoren der Transkription hergestellt, die eine Expression der betroffenen Gene regulieren können, um die normale Zellregulation wieder herzustellen und das unkontrollierte Wachstum zu unterbinden.

### Natürliche Transkriptionsfaktoren

Natürliche Transkriptionsfaktoren enthalten gewöhnlich zwei funktionelle Domänen, eine DNA bindende Domäne (DBD) und eine Effektor- oder Aktivierungsdomäne (AD). Die DNA bindende Domäne erkennt eine bestimmte Region der DNA, während die Aktivierungsdomäne andere Proteine der Transkriptionsmaschinerie in unmittelbarer Nachbarschaft zur DNA rekrutiert, um die Transkription zu star-

ten.<sup>[9]</sup> Versuche, die Genexpression künstlich zu kontrollieren, basieren häufig auf der Anwendung dieses grundlegenden Prinzips.<sup>[10]</sup> So entstand die Idee, neue Transkriptionsfaktoren zu erzeugen, in denen DNA bindende Domänen mit den gewünschten Bindungsspezifitäten synthetisiert und mit den entsprechenden Aktivierungsdomänen verknüpft werden.

Die Aktivierungsdomänen sind üblicherweise modular und behalten ihre Funktion auch nach Verknüpfung mit nichtnatürlichen DNA bindenden Domänen. Daher können nach Bedarf Bibliotheken künstlicher Transkriptionsfaktoren zur spezifischen Regulation zahlreicher Gene synthetisiert werden.<sup>[11]</sup> Dieser Ansatz unterscheidet sich von vielen neuartigen Methoden wie RNA-Interferenz oder der Antisense-technik dahingehend, dass mit ihm die Genexpression auch angeschaltet werden kann, statt sie ausschließlich zu unterdrücken.<sup>[12]</sup>

### Chemisch induzierte artificielle Transkriptionsfaktoren

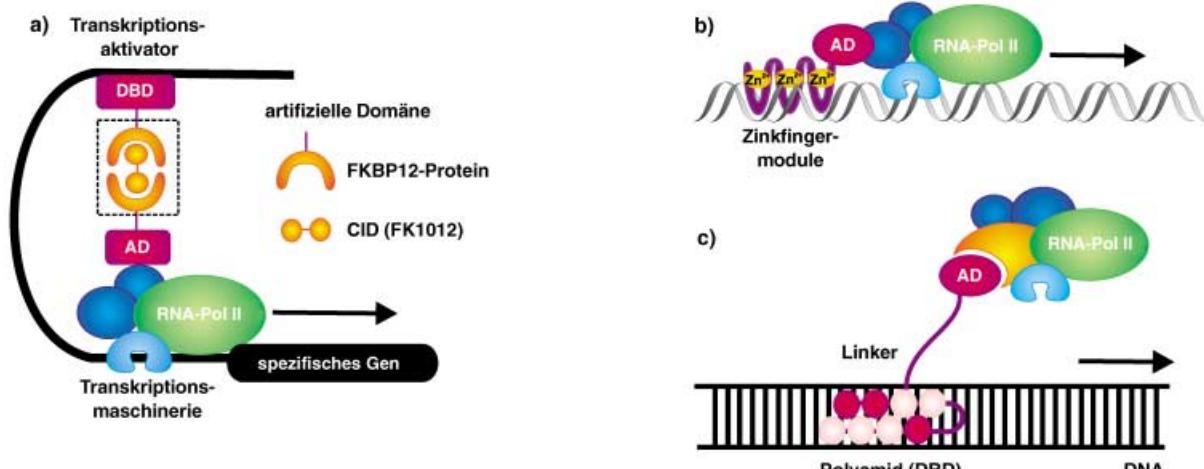
Erste Ansätze, die transkriptionelle Regulation zu beeinflussen, stammen von Schreiber et al. Sie trennten die DNA bindende Domäne von der Aktivierungsdomäne und verknüpften beide Einheiten mit dem FK-Bindungsprotein-12 (FKBP12). Dieses kann in Ge-

genwart seines synthetischen dimeren Substrats FK1012, eines zellpermeablen chemischen Induktors (CID = chemical inducer), dimerisieren. CIDs, die die Dimerisierung von FKBP12 induzieren, wurden zur Zusammenführung und Verknüpfung von Aktivierungs- und DNA-Bindungsdomänen eingesetzt, was zur Hochregulierung der Genexpression führte<sup>[6,7]</sup> (Abbildung 2a).

### Zinkfingermotive als Module in artificiellen Transkriptionsfaktoren

Seit den Anfängen wurden viele unterschiedliche Strategien verwendet, um die Genexpression zu modulieren. Unter anderem wurden Zinkfingermotive als DNA bindende Module in künstlichen Transkriptionsfaktoren genutzt<sup>[10,11]</sup> (Abbildung 2b). Mehrere Proteine der transkriptionellen Regulation haben Zinkfinger als hochselektive DNA bindende Domänen, die über ihre individuelle fingerartige Struktur drei spezifische Basenpaare erkennen können.<sup>[13]</sup>

Der große Vorteil von Zinkfingermotiven in neuartigen Transkriptionsfaktoren ist ihre Fähigkeit, wohlstrukturierte Module auszubilden. Eine Aneinanderreihung von drei Fingern aus jeweils 30 Aminosäuren ergibt drei aufeinanderfolgende DNA bindende Domänen, die jeweils eine unterschied-



**Abbildung 2.** Aktivierung der Transkription durch artificielle Transkriptionsfaktoren. a) Schematische Ansicht der CID-induzierbaren transkriptionellen Aktivierung. Die DNA bindende Domäne (DBD) und die Aktivierungsdomäne (AD) sind voneinander getrennt und jeweils mit FKBP12 fusioniert. Nach Zugabe von FK1012 assoziieren die beiden FKBP12-Domänen und vereinen beide Teile des Transkriptionsfaktors. b) Künstliche Zinkfingermotive als DBD sind an eine geeignete AD gekoppelt. c) Die künstliche DBD besteht aus einem Haarnadel-Pyrrol-/Imidazolpolyamid, das an die kleine Furche bindet. Die DNA bindende Domäne ist über einen Linker mit der Aktivierungsdomäne verknüpft.

liche Folge von drei Basenpaaren erkennen können. Kürzlich haben zwei Arbeitsgruppen mehrere dieser Module miteinander kombiniert und damit mehr als 100000 künstliche Zinkfingerproteine mit unterschiedlichen DNA-Bindungsspezifitäten erzeugt, die jeweils mit einer Aktivator- oder Repressordomäne verknüpft wurden.<sup>[13–15]</sup> Dies war die erste Beschreibung einer genomweiten Methode, die Transkriptionsfaktoren verwendet, um Genfunktionen in Zellen zu induzieren oder zu unterdrücken. Bei der Analyse unterschiedlicher Phänotypen sollten damit neue Modulatoren von Zellwachstum und -entwicklung identifiziert werden.

Der Einsatz dieser künstlichen Transkriptionsfaktoren als Therapeutika bringt zahlreiche Herausforderungen mit sich, z.B. müssen sie am gewünschten Zielort verfügbar sein und dürfen keine Immunantwort auslösen. Nach Barbas et al. kann das Problem der Verfügbarkeit mit Retroviren gelöst werden. Allerdings birgt diese Methode Risiken, etwa unerwünschte und nicht vorhersagbare Mutationen des Genoms, wie sie zuweilen bei der retroviralen Gentherapie beobachtet werden. Daher könnten niedermolekulare Stoffe als künstliche Transkriptionsfaktoren für therapeutische Anwendungen besser geeignet sein<sup>[11,12]</sup> (Abbildung 2c).

## Polyamide als Module für artifizielle Transkriptionsfaktoren

Heute ist das allgemeine Augenmerk auf die Entwicklung kleinerer organischer Moleküle gerichtet, die ebenso mit der DNA wechselwirken wie ihre natürlichen und halbsynthetischen Vorbilder. In so genannten artifiziellen Transkriptionsfaktoren (ATFs) werden natürliche DNA bindende Domänen durch synthetische Varianten wie Triplex bildende Peptidnukleinsäuren (PNAs) und Haarnadelpolyamide ersetzt, die mit Aktivierungsdomänen verknüpft werden.<sup>[10,11]</sup>

Dervan gehörte zu den ersten Chemikern, die derartige DNA bindende Domänen aus Polyamiden herstellten. Das Design basierte auf der Struktur natürlicher Verbindungen, von denen bekannt ist, dass sie an DNA binden und dabei eine Art Tripelhelix bilden. Zu

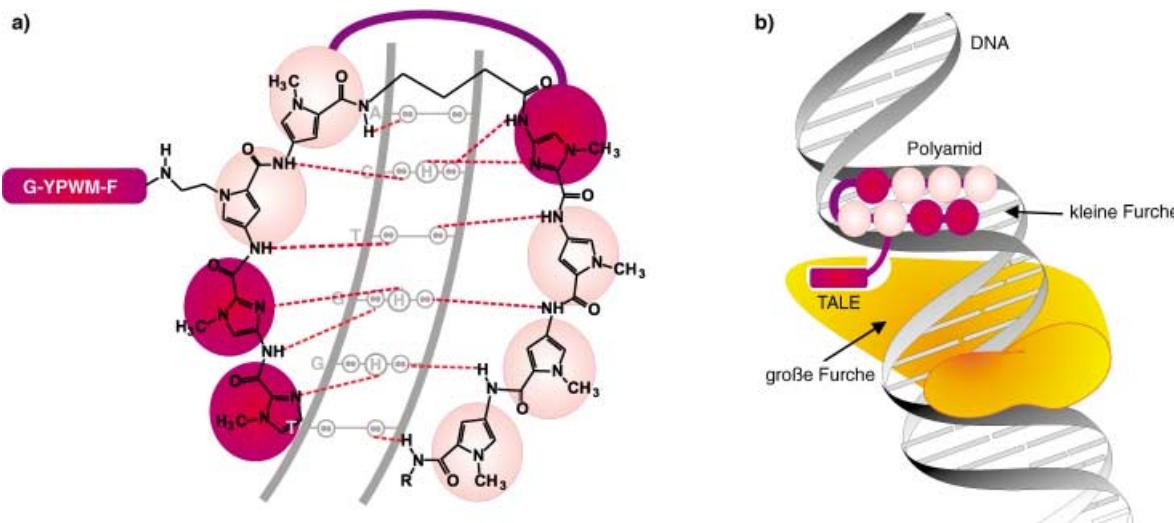
diesen zählt das sichelförmige Distamycin, das ein Rückgrat aus drei aufeinander folgenden Aminosäuren mit einem N-Methylpyrrolrest (Py) hat. Kristallographische Untersuchungen am Distamycin-DNA-Komplex ergaben eine antiparallele Dimerisierung des Distamycins in einer AT-reichen Region in der kleinen DNA-Furche. Mit Distamycin als Leitstruktur nahm Dervan weitere Modifikationen am Rückgrat vor, um ähnliche antiparallele Strukturen herzustellen, die andere Sequenzen in der kleinen Furche der DNA erkennen. Ein Austausch des Pyrrol- gegen einen Imidazol- (Im) oder Hydroxypyrrrolrest (Hp) erlaubte die Erkennung und Unterscheidung der anderen DNA-Basen G und C. Eine Verkürzung der antiparallelen Moleküle durch einen γ-Aminobuttersäurerest führte zu einem U-förmigen Haarnadelpolyamid, das das antiparallele Distamycindimer imitiert. Mit Hilfe einfacher Basenpaarungsregeln – Py/Im erkennt C-G, Py/Hp erkennt A-T, HP/Py erkennt T-A und Im/Py erkennt G-C – wurden maßgeschneiderne DNA bindende Domänen hergestellt, die viele, aber nicht alle getesteten DNA-Sequenzen mit Affinitäten im nanomolaren Bereich binden und so mit den natürlichen Transkriptionsfaktoren konkurrieren können. Die Bindung solcher Polyamide führt häufig zur Verdrängung des entsprechenden Transkriptionsfaktors und damit zu einer Inhibition der Genexpression. Durch chemische Ligation zweier Haarnadelpolyamide (Tandem-Hairpins) kann die Spezifität und Affinität der DNA-Bindung weiter erhöht werden, sodass längere Sequenzen erkannt werden.<sup>[16]</sup> Haarnadelmonomere mit Alkin- und Azidfunktionen können bei 37°C eine intrazelluläre 1,3-dipolare Cycloaddition eingehen. Die höhere Affinität von Tandem-Hairpins kann auf eine kooperative kombinatorische Assoziation der Polyamide zurückgeführt werden. Sie imitieren das natürliche Phänomen, bei dem regulatorische Proteine durch Di- oder Oligomerisierung von DNA-Erkennungselementen kooperieren, die jeweils 4–6 Basenpaare besetzen und benachbarte Stellen in der DNA erkennen.<sup>[17]</sup>

## Polyamide als artifizielle Regulatoren in der Entwicklungsbiologie

Die DNA bindenden Eigenschaften von Polyamiden wurden genutzt, um neuartige Transkriptionsinhibitoren herzustellen, indem man sie an DNA-intercalierende Agentien wie Acridin koppelte. Nach Bindung des Polyamids an die kleine Furche orientiert sich das Acridin in Richtung der großen Furche, was zur Deformation einer benachbarten Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren führt.<sup>[18]</sup> Daher stellte sich die Frage, ob solche Polyamide auch an transkriptionelle Aktivierungsdomänen gekoppelt werden können, um die Genexpression hochzurregulieren. Es zeigte sich, dass Haarnadelpolyamide, die über einen flexiblen aliphatischen oder einen starren Poly-L-prolin-Linker mit einem Peptid aus einer Aktivierungsdomäne verknüpft sind, die komplexe Transkriptionsmaschinerie zusammenstellen und in einem zellfreien System die Expression von Genen erhöhen können.<sup>[19–21]</sup> Kürzlich wurde diese Methode erfolgreich in vitro angewendet, um einen DNA bindenden Komplex zu imitieren, der essenziell für die richtige Entwicklung von *Drosophila melanogaster* ist.<sup>[22]</sup>

Transkriptionelle Regulatoren aus der Familie der Homöobox(Hox)-Proteine haben eine charakteristische triplexhelicale DNA bindende Domäne (Homöodomäne), die sich durch Polyamide ersetzen lässt. Hox-Proteine interagieren oft mit einer ringförmigen Erweiterung aus drei Aminosäuren (TALE, „Three Amino Acid Loop Extension“) und bilden dabei ein Hox-TALE-Heterodimer zur kooperativen DNA-Bindung<sup>[23]</sup> (Abbildung 3). Die beiden Homöobox-Proteine interagieren über eine kurze konservierte YPWM-Peptiderkennungsstelle, die über einen variablen Linker mit dem N-Terminus der Homöobox verbunden ist.

Wird der Hox-Transkriptionsfaktor durch ein Polyamid ersetzt, das eine YPWM-Peptiderkennungsstelle imitiert, so kann damit der zugehörige TALE-Transkriptionsfaktor zu einer passenden DNA-Region rekrutiert werden. Das YPWM-Polyamid bindet an die DNA und exponiert gleichzeitig eine Bindungsstelle aus DNA und Peptid, die die Affinität zum TALE-Transkriptionsfaktor erhöht.



**Abbildung 3.** Künstliche Entwicklungsregulatoren: a) Struktur des Haarnadel-Pyrrol-/Imidazolpolyamids, das an ein Erkennungspeptid (YPWM) für das Homöoboxprotein gekuppelt wurde. b) Rekrutierung des TALE-Homöoboxproteins an die große Furche der DNA durch das peptidgekoppelte Polyamid.

Die Daten deuten auf eine neue Klasse transkriptioneller Regulatoren hin, die im Zusammenspiel mit natürlichen Transkriptionsfaktoren funktionieren. Dennoch ist es noch ein weiter Weg, ehe solche künstlichen Verbindungen in der Therapie eingesetzt werden können. Zurzeit gibt es noch Probleme mit der zellulären Aufnahmeeffizienz und der Kernlokalisierung sowie besonders mit der Zugänglichkeit der kleinen DNA-Furche in den dicht gepackten Regionen des Genoms (Chromatin).

Trotz einiger Erfolge in In-vivo-Anwendungen ließ sich mit konfokaler Mikroskopie an lebenden Zellen eine überwiegende Lokalisation von Polyamid-Farbstoff-Konjugaten im Zytoplasma nachweisen und nicht im Kern, wo sie benötigt werden. Dennoch ist es wahrscheinlich, dass die transkriptionellen Regulatoren Potenzial für neue therapeutische Anwendungen zur Behandlung verschiedener Erkrankungen wie Krebs haben. Cisplatin-gekoppeltes Distamycin war in ersten Experimenten wirksamer bei der DNA-Quervernetzung als freies Cisplatin, was für einen künftigen Einsatz von Polyamiden als Regulatoren der Genexpression spricht.<sup>[24]</sup> Es ist eine Herausforderung, das Design und die Synthese nichtnatürlicher Faktoren für Anwendungen in Biologie und Humanmedizin weiter zu verbessern.

- [1] J. E. Darnell, Jr., *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2, 740–749.
- [2] P. P. Pandolfi, *Oncogene* **2001**, 20, 3116–3127.
- [3] C. M. Perou, T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lonning, A. L. Borresen-Dale, P. O. Brown, D. Botstein, *Nature* **2000**, 406, 747–752.
- [4] O. Nyanguile, M. Uesugi, D. J. Austin, G. L. Verdine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 13402–13406.
- [5] S. N. Ho, S. R. Biggar, D. M. Spencer, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Nature* **1996**, 382, 822–826.
- [6] P. J. Belshaw, S. N. Ho, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 4604–4607.
- [7] D. M. Spencer, T. J. Wandless, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Science* **1993**, 262, 1019–1024.
- [8] V. M. Rivera, T. Clackson, S. Natesan, R. Pollock, J. F. Amara, T. Keenan, S. R. Magari, T. Phillips, N. L. Courage, F. Cerasoli, Jr., D. A. Holt, M. Gilman, *Nat. Med.* **1996**, 2, 1028–1032.
- [9] Z. Wu, G. Belanger, B. B. Brennan, J. K. Lum, A. R. Minter, S. P. Rowe, A. Plachetka, C. Y. Majumdar, A. K. Mapp, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12390–12391.
- [10] R. R. Beerli, C. F. Barbas III, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 135–141.
- [11] A. Z. Ansari, A. K. Mapp, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 7635–772.
- [12] A. Z. Ansari, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 242–24.
- [13] K. S. Park, D. K. Lee, H. Lee, Y. Lee, Y. S. Jang, Y. H. Kim, H. Y. Yang, S. I. Lee, W. Seol, J. S. Kim, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1208–1214.
- [14] P. Blancafort, L. Magnenat, C. F. Barbas III, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 269–274.
- [15] K. H. Bae, Y. D. Kwon, H. C. Shin, M. S. Hwang, E. H. Ryu, K. S. Park, H. Y. Yang, D. K. Lee, Y. Lee, J. Park, H. S. Kwon, H. W. Kim, B. I. Yeh, H. W. Lee, S. H. Sohn, J. Yoon, W. Seol, J. S. Kim, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 275–280.
- [16] A. T. Poulin-Kerstien, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 15811–15821.
- [17] D. S. Goodsell, A. J. Olson, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, 29, 105–153.
- [18] E. J. Fechter, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8476–8485.
- [19] A. Z. Ansari, A. K. Mapp, D. H. Nguyen, P. B. Dervan, M. Ptashne, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 583–592.
- [20] A. K. Mapp, A. Z. Ansari, M. Ptashne, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 3930–3935.
- [21] P. S. Arora, A. Z. Ansari, T. P. Best, M. Ptashne, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 13067–13071.
- [22] H. D. Arndt, K. E. Hauschild, D. P. Sullivan, K. Lake, P. B. Dervan, A. Z. Ansari, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13322–13323.
- [23] J. M. Passner, H. D. Ryoo, L. Shen, R. S. Mann, A. K. Aggarwal, *Nature* **1999**, 397, 714–719.
- [24] H. Loskotova, V. Brabec, *Eur. J. Biochem.* **1999**, 266, 392–402.