

Vom Inhibitor zum Aktivator: ein Hammerhead-Ribozym unter der Kontrolle eines G-Quartetts^{**}

Markus Wieland und Jörg S. Hartig*

Guanosin-reiche Nucleinsäuresequenzen können sich zu viersträngigen Strukturen falten. Diese G-Quartette (oder G-Quadruplexe) setzen sich aus übereinander gestapelten Ebenen zusammen, die wiederum aus vier Guanosin-Nucleobasen bestehen.^[1,2] Solche viersträngigen DNA-Komplexe spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression in Zellen.^[3,4] Beispielsweise wurde gezeigt, dass der G-reiche Strang der Telomere unter bestimmten Bedingungen G-Quartette bilden kann und dadurch möglicherweise die Funktion dieser „genomischen Schutzhäfen“ während des Zellzyklus reguliert.^[5,6] Viele Promotorelemente im menschlichen Genom enthalten ebenfalls G-reiche Sequenzen, die an der Kontrolle der Genexpression beteiligt zu sein scheinen.^[7-9] Außerdem gibt es Beispiele, bei denen G-Quartette als regulatorische Elemente in Boten-RNA auftreten.^[10,11] Darüber hinaus wurde eine Reihe von Substanzen charakterisiert, die mit DNA-G-Quartetten wechselwirken.^[12] Einige dieser Verbindungen zeigen eine starke und hochspezifische Affinität zu G-Quartett-DNA. Es wurden z.B. Substanzen identifiziert, die die Faltung eines G-reichen DNA-Stranges zu einem Quartett ermöglichen, sogar wenn dieser mit einem komplementären, Cytosin-reichen DNA-Strang hybridisiert ist.^[13]

Die Wechselwirkungen von DNA-Quartetten mit solchen niedermolekularen Liganden wurden in den letzten Jahren detailliert beschrieben. Dagegen fanden Wechselwirkungen solcher Verbindungen mit RNA-G-Quartetten bislang weit weniger Beachtung, obwohl auch von G-reicher RNA bekannt ist, dass sie Quartette bilden kann.^[14,15] Wir interessieren uns für die Entwicklung von Nucleinsäure-Modulen, die eine Regulation von funktionalen Nucleinsäuren ermöglichen sollen. G-Quartett-Strukturen sollten sich sehr gut als Schaltelemente nutzen lassen, da sich die Konformation durch den Übergang von der ungefalteten zur kompakten, viersträngigen Struktur drastisch ändert. Es sollten sich

zudem geeignete Substanzen finden lassen, die spezifisch die Faltung dieser starren Strukturen bewirken.

Für die Suche nach Verbindungen, die einen solchen RNA-basierten Schalter auslösen können, haben wir eine G-reiche RNA-Sequenz mit einem Hammerhead-Ribozym verknüpft. In solch einem Konstrukt sollte es möglich sein, die Spaltungsreaktion des Ribozyme durch eine G-Quartett-induzierende Substanz zu regulieren. Dazu wollten wir zwei unterschiedlich regulierte Versionen des Hammerhead-Ribozyme herstellen: eine Variante, die durch einen G-Quartett-induzierenden Liganden aktiviert wird, sowie eine Variante, die durch denselben Liganden inhibiert wird. Beim Test einer Reihe von Substanzen auf ihre Wirkung gegen nichtmodifizierte Ribozyme fanden wir den bislang stärksten Inhibitor des Hammerhead-Ribozyme. Durch Verknüpfung von G-reichen Sequenzen mit dem Hammerhead-Ribozym gelang uns anschließend die Synthese einer Variante, die durch die vormals inhibierend wirkende Substanz aktiviert wird.

Das Hammerhead-Ribozym ist ein gut charakterisiertes, kleines RNA-Motiv mit Phosphodiesterase-Aktivität.^[16] Die Voraussetzungen für die Spaltungsaktivität sind die Faltung des konservierten katalytischen Zentrums und der Helices I-III sowie das Vorhandensein zweiwertiger Metallionen wie Mg²⁺. Für unsere Versuche wählten wir eine Ribozymsequenz, die mehrere Substratumsätze durchlaufen kann, in der Folge als Wildtyp-HHR bezeichnet (wt-HHR, Abbildung 1a).^[17,18] Für die Suche nach Substanzen, die die Spaltungsreaktion des Ribozyme inhibieren, überprüften wir eine Reihe von bereits bekannten G-Quartett-bindenden Substanzen. Von diesen hatte besonders das Porphyrin-Derivat TMPyP4 (*meso*-5,10,15,20-Tetrakis(*N*-methyl-4-pyridinio)porphin)^[19] einen stark hemmenden Einfluss auf das nichtmodifizierte Ribozym wt-HHR, mit einer halbmaximalen Inhibition der Spaltungsreaktion bei einer Konzentration von 105 ± 5 nm (Abbildung 1b). Für einen besseren Vergleich mit einer älteren Arbeit über Hammerhead-Ribozym-Inhibitoren bestimmten wir die Inhibitionsstärke unter leicht geänderten Versuchsbedingungen (d.h. ohne Kalium-Ionen).^[18] Unter Ausschluss von einwertigen Ionen verstärkte sich der Inhibitoreffekt sogar auf einen IC₅₀-Wert von 46 ± 10 nm (siehe Hintergrundinformationen). Unseres Wissens ist das Porphyrin TMPyP4 damit der stärkste bekannte Ribozym-Inhibitor.

Unser ursprüngliches Ziel war es, die Eignung von G-reichen Sequenzen als Schaltelemente für katalytische Aktivität zu überprüfen. Ein stichhaltiger Beweis für ein solches regulatorisches Modul wäre ein Ribozym, das durch den starken Inhibitor TMPyP4 aktiviert anstatt inhibiert würde. Ausgehend von wt-HHR stellten wir mehrere Ribozymvarianten her, indem wir Helix II durch G-reiche Sequenzen ersetzten. Modifikationen an Helix II wurden bereits in früheren Arbeiten zur Regulierung des Hammerhead-Ribozyme genutzt.^[20-23] Die Bildung von Helix II ist wesentlich für die korrekte Bildung des katalytischen Zentrums und damit für die Spaltungsaktivität.^[24] In der hier vorgestellten Arbeit machten wir uns die Destabilisierung des katalytischen Zentrums zunutze, die aus dem Einführen der G-reichen Schleife und der damit verbundenen Verringerung der Basenpaare in

[*] M. Wieland, Prof. Dr. J. S. Hartig
Universität Konstanz
Fachbereich Chemie
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)
Fax: (+49) 7531-885-140
E-Mail: joerg.hartig@uni-konstanz.de

[**] J.S.H. dankt der Volkswagenstiftung für die großzügige Förderung dieser Arbeit im Rahmen einer Lichtenberg-Professur. Wir danken dem Fachbereich Chemie der Universität Konstanz für die Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

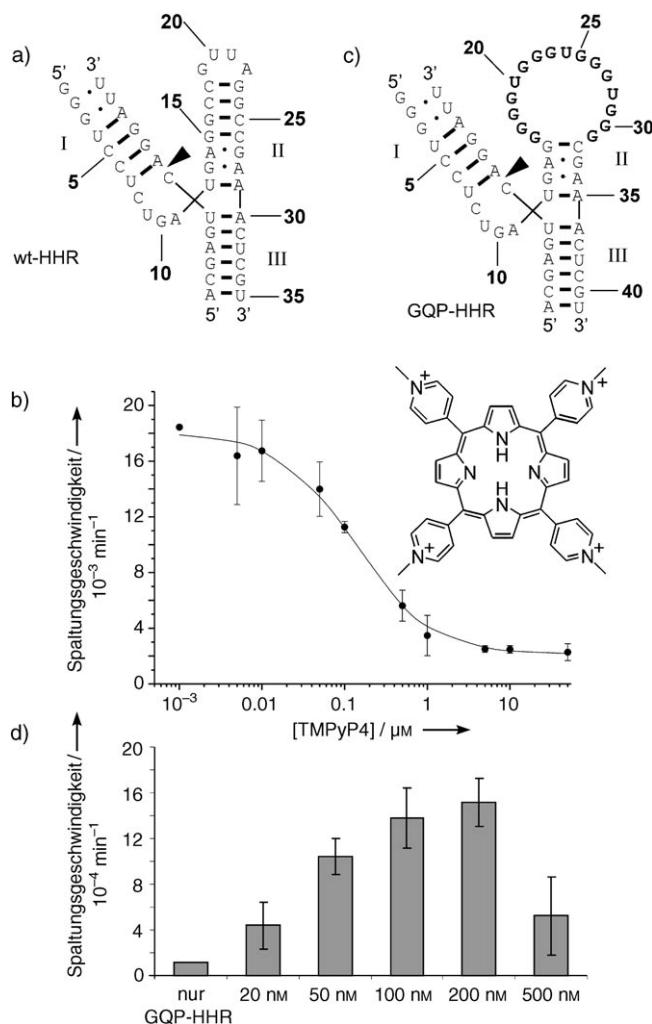


Abbildung 1. Sekundärstrukturen und Aktivität der Hammerhead-Ribozyme (HHRs) in Gegenwart von TMPyP4. a) Struktur des Wildtyp-Ribozyms (wt-HHR) im Komplex mit dem Substratstrang. Der Pfeil weist auf die Substrat-Schnittstelle. b) Hemmung des wt-HHR aus Abbildung 1 a durch das Porphyrin TMPyP4 (Einschub). Gezeigt ist die anfängliche Spaltungsaktivität. Halbmaximale Inhibition (IC_{50}) erfolgt bei einer Konzentration von 105 nm. c) Struktur der HHR-Variante (GQP-HHR), die eine G-reiche Schleife in Helix II enthält. d) Aktivierung des G-reichen GQP-HHR durch TMPyP4. Ribozym-Reaktionen wurden in 50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 500 nM Substrat, 10 nM wt-HHR oder 50 nM GQP-HHR bei 25 °C durchgeführt. Weitere Informationen sind in den Hintergrundinformationen erhältlich.

Helix II resultiert. Diese Modifikation sollte zu einem Ribozym mit verminderter katalytischer Aktivität führen. Tatsächlich hatte die erhaltene Variante GQP-HHR (Abbildung 1c) eine deutlich niedrigere Spaltungsaktivität (k_{obs} : $1.2 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, „nur GQP-HHR“, Abbildung 1d). Bei Zugabe des ehemals hemmend wirkenden TMPyP4 konnte nun jedoch eine Aktivierung der Spaltungsreaktion beobachtet werden. Eine Konzentration von 200 nM des G-Quartett-Binders bewirkte eine mehr als zehnfache Aktivierung. Zum Vergleich: Bei dieser Konzentration wurde schon eine deutliche Hemmung des wt-HHR beobachtet. Allerdings konnte nur ungefähr ein Zehntel der Spaltungsaktivität des

wt-HHR durch die TMPyP4-vermittelte Aktivierung des GQP-HHR erreicht werden. Höhere Konzentrationen ($\geq 500 \text{ nm}$) von TMPyP4 führten erwartungsgemäß zu einer Hemmung der Variante GQP-HHR (Abbildung 1d).

Die TMPyP4-Abhängigkeit der Spaltungsreaktion lässt in Verbindung mit dem verwendeten Design darauf schließen, dass im aktivierbaren Ribozym GQP-HHR die Faltung der eingeführten G-reichen Schleife durch die Zugabe des G-Quartett-Binders induziert wird. Eine Stabilisierung von Helix II und dem katalytischen Zentrum würde zu einer erhöhten Spaltungsaktivität führen. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurden die Faltungen beider Ribozyme durch Verdau mit Ribonuclease T1 untersucht. Die Endonuclease schneidet einzelsträngige RNA bevorzugt hinter Guanosinresten, was sich für den Nachweis der TMPyP4-abhängigen Faltung der G-reichen Schleife des GQP-HHR nutzen lässt, da G-Quartett-Strukturen weniger zugänglich für den Nuclease-Verdau sind als unstrukturierte Sequenzen.^[25] Die Nuclease-Reaktionen wurden analog zu den Ribozym-Spaltungsreaktionen durchgeführt, außer dass ein RNA-Substrat mit einer Desoxyribose an der Spaltstelle verwendet wurde, um eine Ribozym-katalysierte Spaltung zu verhindern.

Zuerst wurde das Ribozym wt-HHR bei verschiedenen Konzentrationen von TMPyP4 untersucht (Abbildung 2): Die stärkste Nuclease-vermittelte Spaltung wurde an der Position G13 beobachtet, einem Nucleosid, das Teil des katalytischen Zentrums des Ribozys ist (zur Nummerierung siehe Abbildung 1; die Position entspricht G8 der allgemeinen Nomenklatur des Hammerhead-Ribozys, siehe Lit. [26]). In-

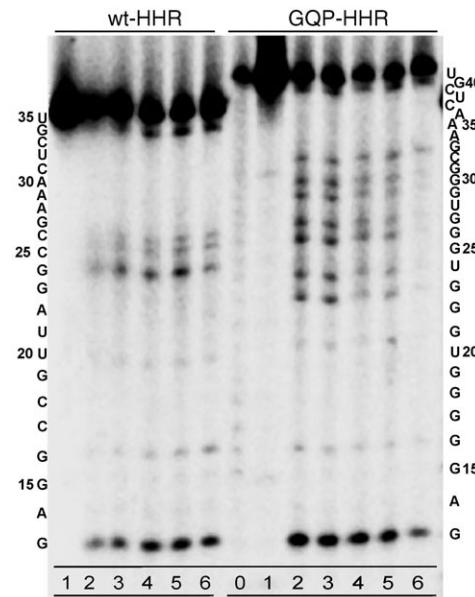


Abbildung 2. Ribonuclease-T1-Untersuchung der Ribozymfaltung in Abhängigkeit von TMPyP4. Ribonuclease-T1-Verdau von wt-HHR (links) und GQP-HHR (rechts). Die Ribozyme wurden am 5'-Ende mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und Polynukleotid-Kinase markiert. 1. Unverdaute Ribozyme; 2. T1-verdaute Ribozyme; 3. verdaut in Gegenwart von 1 nM TMPyP4; 4. 10 nM TMPyP4; 5. 100 nM TMPyP4; 6. 1 μM TMPyP4; 0. OH⁻-Leiter des GQP-HHR. Signifikante Spaltung in kürzere Fragmente als die gezeigten 13 nt wurde nicht beobachtet. Für Sekundärstrukturen und Nummerierungen von wt-HHR und GQP-HHR siehe Abbildung 1.

teressanterweise verstärkte sich die T1-Spaltungsintensität beim wt-HHR mit steigenden Porphyrinkonzentrationen, in Einklang mit der Hemmung der katalytischen Aktivität des wt-HHR bei steigender TMPyP4-Konzentration. Für eine effiziente Ribozymaktivität muss das katalytische Zentrum wie in Abbildung 1 a dargestellt gefaltet werden. Mit steigender Porphyrinkonzentration wird das katalytische Zentrum destabilisiert und dadurch leichter für den Nuclease-Verdau zugänglich. Andere, schwächere Spaltungsstellen, z. B. an Position G16 und weiteren Guanosinresten in Helix II, verhalten sich ähnlich.

Eine mögliche Erklärung für die starke Inhibition durch das Porphyrin-Derivat ist eine direkte Bindung im katalytischen Zentrum. Diese Region enthält sowohl G-A- als auch Drei-Basen-Paare, die ausgeprägte π -Stapelwechselwirkungen ermöglichen würden.^[27,28] Zwar kann der Mechanismus der Inhibition nicht aus dem T1-Verdau abgeleitet werden, die Bildung eines G-Quartetts im wt-HHR ist aber sehr unwahrscheinlich, da keine G-reichen Sequenzen im Ribozym vorhanden sind. Theoretisch könnte sich ein intermolekulares G-Quartett bestehend aus dem Trinucleotid GGG am 5'-Ende bilden, was aber bei einer niedrigen Ribozymkonzentration von 10 nm nicht wahrscheinlich ist. Außerdem müsste eine solche Struktur mit der Bindung des RNA-Substrats konkurrieren, wobei dieses im 50fachen Überschuss vorhanden ist. Bei der anschließenden Untersuchung des GQP-HHR durch T1-Nuclease-Verdau wurde bei steigender TMPyP4-Konzentration ein entgegengesetztes Verhalten zu jenem von wt-HHR beobachtet: G13 zeigte wieder die stärkste T1-vermittelte Spaltung, gefolgt von einigen Positionen in der neu eingeführten G-reichen Schleife. An allen Positionen wurde eine verminderte Nuclease-abhängige Spaltung bei steigender Porphyrinkonzentration beobachtet. Dieses Verhalten ist gegensätzlich zum Verdau des wt-HHR und ist in Einklang mit der Aktivierung des G-reichen Ribozyms durch TMPyP4. Da die katalytisch aktive Struktur durch den Austausch von Helix II durch eine G-reiche Schleife destabilisiert wurde, ist die Nuclease-Spaltung in Abwesenheit vom TMPyP4 am stärksten. Mit steigender Konzentration des Porphyrins kann sich die G-reiche Schleife falten und dadurch die Nuclease-Aktivität hemmen.

Mitte der 1990er Jahre hat die Entdeckung von Ribozym-Inhibitoren viel Aufmerksamkeit erregt, auch wegen ihres potenziellen therapeutischen Nutzens.^[29–31] In den folgenden Jahren wurden die Wechselwirkungen von RNA-Bindern wie Aminoglycosiden und Tetracyclinen mit Ribozymen sehr genau charakterisiert. Allerdings wurden bis heute Substanzen, die mit viersträngigen DNA-Strukturen wechselwirken können, noch nicht auf ihre Inhibitorwirkung auf Ribozyme untersucht. In der hier vorgestellten Arbeit haben wir das *N*-Methylpyridinio-substituierte Porphyrin TMPyP4 erstmals als einen RNA-Binder vorgestellt. Dabei hat sich herausgestellt, dass TMPyP4 eine um zwei bis drei Größenordnungen stärkere Inhibitorwirkung auf das unmodifizierte wt-HHR hat als zuvor charakterisierte HHR-Inhibitoren.^[18,29–31] Überdies konnten wir zeigen, dass sich G-reiche Sequenzen sehr gut als regulatorische Motive für das Hammerhead-Ribozym eignen. Durch rationales Design der funktionellen Nucleinsäuresequenz konnten wir die starke Inhibitorwir-

kung von TMPyP4 durch das Einführen einer G-reichen Sequenz in einen aktivierenden Effekt umwandeln. Wahrscheinlich bildet hierbei die eingeführte G-reiche Sequenz eine zusätzliche Bindestelle für TMPyP4. Dieses Resultat verdeutlicht, dass die Antwort eines biologischen Makromoleküls auf einen bestimmten Stimulus sehr stark von einem modularen Design abhängen kann und dadurch auch steuerbar ist.^[32] Ein Beleg für das Potenzial dieses Konzepts von RNA-basierten, modularen Schaltern sind die erst kürzlich entdeckten Riboschalter mit ihren faszinierenden Architekturen.^[33]

Obwohl TMPyP4 die Ribozymaktivität in Abwesenheit des hier vorgestellten G-Quartett-Moduls stark hemmt, wird die Substanz *in vivo* sehr gut toleriert, was auf eine spezifische Wechselwirkung schließen lässt. So wird TMPyP4 in Hefen effizient und ohne Nebenwirkungen aufgenommen und ist weder in menschlicher Zellkultur noch in Mäusen toxisch.^[34–36] TMPyP4 wird als mögliches Tumortherapeutikum diskutiert, seit die Wachstumshemmung von Tumor-Fremdtransplantaten durch TMPyP4 in Mäusen demonstriert werden konnte.^[36,37] Wir werden uns in Zukunft der Regulation von weiteren funktionalen RNA-Sequenzen durch G-Quartette widmen. Ein weiteres Ziel wird sein, solche Mechanismen für die Schaltung von Nucleinsäurefunktionen in Zellen zu nutzen.

Experimentelle Details zu RNA-Präparation, Ribozym-Reaktionen und Ribonuclease-Reaktionen sowie zusätzliche Daten zu den Spaltungsreaktionen finden sich in den Hintergrundinformationen.

Eingegangen am 8. März 2006
Online veröffentlicht am 27. Juli 2006

Stichwörter: Inhibitoren · Nucleinsäuren · Porphyrinoide · Riboschalter · Ribozyme

- [1] M. A. Keniry, *Biopolymers* **2000**, *56*, 123.
- [2] T. Simonsson, *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 621.
- [3] R. H. Shafer, I. Smirnov, *Biopolymers* **2000**, *56*, 209.
- [4] H. Arthanari, P. H. Bolton, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 221.
- [5] S. Neidle, G. N. Parkinson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 275.
- [6] T. R. Cech, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 34; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 34.
- [7] A. Siddiqui-Jain, C. L. Grand, D. J. Bearss, L. H. Hurley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11593.
- [8] J. Dai, T. S. Dexheimer, D. Chen, M. Carver, A. Ambrus, R. A. Jones, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1096.
- [9] S. Rankin, A. P. Reszka, J. Huppert, M. Zloh, G. N. Parkinson, A. K. Todd, S. Ladame, S. Balasubramanian, S. Neidle, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10584.
- [10] J. C. Darnell, K. B. Jensen, P. Jin, V. Brown, S. T. Warren, R. B. Darnell, *Cell* **2001**, *107*, 489.
- [11] S. Bonnal, C. Schaeffer, L. Creancier, S. Clamens, H. Moine, A. C. Prats, S. Vagner, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 39330.
- [12] S. M. Kerwin, *Curr. Pharm. Des.* **2000**, *6*, 441.
- [13] A. Rangan, O. Y. Fedoroff, L. H. Hurley, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 4640.
- [14] B. Pan, Y. Xiong, K. Shi, M. Sundaralingam, *Structure* **2003**, *11*, 1423.
- [15] H. Liu, A. Matsugami, M. Katahira, S. Uesugi, *J. Mol. Biol.* **2002**, *322*, 955.

- [16] S. Verma, N. K. Vaish, F. Eckstein, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 532.
 - [17] T. K. Stage-Zimmermann, O. C. Uhlenbeck, *RNA* **1998**, *4*, 875.
 - [18] A. Jenne, J. S. Hartig, N. Piganeau, A. Tauer, D. A. Samarsky, M. R. Green, J. Davies, M. Famulok, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 56.
 - [19] R. J. Fiel, J. C. Howard, E. H. Mark, N. Datta Gupta, *Nucleic Acids Res.* **1979**, *6*, 3093.
 - [20] M. Koizumi, G. A. Soukup, J. N. Kerr, R. R. Breaker, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 1062.
 - [21] J. Tang, R. R. Breaker, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 453.
 - [22] J. S. Hartig, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4440; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4263.
 - [23] J. S. Hartig, S. H. Najafi-Shoushtari, I. Grune, A. Yan, A. D. Ellington, M. Famulok, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 717.
 - [24] T. Tuschl, F. Eckstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 6991.
 - [25] V. Dapic, P. J. Bates, J. O. Trent, A. Rodger, S. D. Thomas, D. M. Miller, *Biochemistry* **2002**, *41*, 3676.
 - [26] K. J. Hertel, A. Pardi, O. C. Uhlenbeck, M. Koizumi, E. Ohtsuka, S. Uesugi, R. Cedergren, F. Eckstein, W. L. Gerlach, R. Hodgson, R. H. Symons, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 3252.
 - [27] H. W. Pley, K. M. Flaherty, D. B. McKay, *Nature* **1994**, *372*, 68.
 - [28] W. G. Scott, J. T. Finch, A. Klug, *Cell* **1995**, *81*, 991.
 - [29] T. K. Stage, K. J. Hertel, O. C. Uhlenbeck, *RNA* **1995**, *1*, 95.
 - [30] J. B. Murray, J. R. Arnold, *Biochem. J.* **1996**, *317*, 855.
 - [31] Q. Vicens, E. Westhof, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1018.
 - [32] R. Penchovsky, R. R. Breaker, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1424.
 - [33] W. C. Winkler, R. R. Breaker, *Annu. Rev. Microbiol.* **2005**, *59*, 487.
 - [34] E. Izbicka, L. D. Barnes, A. K. Robinson, K. K. Davidson, R. A. Lawrence, G. T. Hannibal, *Anticancer Res.* **2001**, *21*, 1899.
 - [35] S. Y. Rha, E. Izbicka, R. Lawrence, K. Davidson, D. Sun, M. P. Moyer, G. D. Roodman, L. Hurley, D. Von Hoff, *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 987.
 - [36] C. L. Grand, H. Han, R. M. Munoz, S. Weitman, D. D. Von Hoff, L. H. Hurley, D. J. Bearss, *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 565.
 - [37] L. R. Kelland, *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 971.
-