

Verstehen, wie DNA-Enzyme arbeiten

Julia Wirmer-Bartoschek und Harald Schwalbe*

9DB1 · DNA-Struktur · DNAzyme · Kristallstruktur-
analyse

Eine Vielzahl unterschiedlicher RNA-Strukturen sind aufgeklärt. Alternative Nicht-Watson-Crick-Basenpaarungen sowie Wechselwirkungen, an denen die 2'OH-Gruppe beteiligt ist, tragen zur strukturellen Vielfalt und zur Ausbildung unterschiedlicher Funktionalitäten wie Ligandenbindung, Regulation und Katalyse bei. Demgegenüber ist unser Bild von der DNA-Struktur und der DNA-Funktion durch die von Watson und Crick aufgeklärte 3D-Struktur der DNA-Doppelhelix geprägt. Dennoch gibt es auch alternative Struktur-motive in der DNA, wie z.B. G-Quadruplexe, die in G-reichen DNA-Strängen vorkommen, und i-Motive, die in C-reichen Strängen beobachtet werden können. Diese Strukturen verdeutlichen die hohe strukturelle Vielfalt nicht nur der RNA, sondern auch der DNA.

DNA wird heute in vielen Forschungsgebieten eingesetzt, z.B. in Form von Aptameren, Biosensoren, Antisense-Oligonukleotiden, in der DNA-Nanotechnologie, zur Informationsspeicherung und nicht zuletzt in Form von DNAzymen (DNA-Enzyme oder Desoxyribozyme).^[1] Der Grund für die größere Verbreitung der DNA im Vergleich zur RNA liegt in der höheren chemischen Stabilität, der relativ einfachen chemischen Synthese sowie der Verfügbarkeit biochemischer Methoden wie Amplifikation, Ligation und gerichtete Mutation für die Herstellung von DNA.

1994 wurde das erste DNAzym mittels SELEX^[2] von Breaker und Joyce entwickelt.^[3] Dieses erste DNAzym katalysiert die Pb²⁺-abhängige Spaltung einer Phosphodiesterbindung. Seitdem ist das Feld der DNAzyme kontinuierlich gewachsen. Heute gibt es DNAzyme, die eine große Bandbreite chemischer Reaktionen katalysieren, z.B. Bindungsspaltung in RNA, DNA und anderen Molekülen, die Bildung von C-C-Bindungen, Ligation von Biomolekülen und andere Reaktionen.^[4]

Ein Nachteil der DNAzyme ist die hohe Konzentration an ionischen Kofaktoren, die zur Katalyse benötigt werden, sowie die relative geringe katalytische In-vivo-Effizienz im Vergleich zu Proteinen. Daher gibt es ein großes Interesse, den Wirkmechanismus von DNAzymen zu verstehen und zu verbessern, insbesondere aufgrund der größeren Stabilität von DNA im Vergleich zu RNA. Bis jetzt beruhten Studien

hierzu auf der Analyse des Effekts von Mutationen mithilfe biologischer Assays.

In einer kürzlich erschienen Veröffentlichung, die Gegenstand dieses Highlights ist, beschreiben A. Ponce-Salvatierra et al.^[5] die Bestimmung der ersten 3D-Struktur eines aktiven DNAzyms, 9DB1, im postkatalytischen Zustand. Die aus der Struktur ableitbaren Erkenntnisse bestätigen in beeindruckender Weise, wie wichtig strukturelle Daten zum Verständnis der Funktion von DNAzymen sind.

9DB1 ist ein Mg²⁺- und Mn²⁺-abhängiges DNAzym zur Ligation von RNA. Die regioselektive Bildung einer nativen Phosphodiesterbindung zwischen 3'OH und 5'PPP (Triphosphat) zweier RNA-Stränge wird katalysiert. Die Sequenz des DNAzyms wurde durch In-vitro-Selektion (SELEX) erhalten.^[6] Durch Anwendung kombinatorischer Mutationsinterferenzanalyse gelang es der Gruppe von Höbartner in früheren Studien,^[7] ein minimales Konstrukt von 9DB1 zu definieren: Es besteht aus 31 Nukleotiden und ist kürzer als das durch SELEX erhaltene Konstrukt (Abbildung 1 a).

Durch die kombinatorische Mutationsinterferenzanalyse wurden für die Katalyse wichtige Nukleotide identifiziert (Abbildung 1). Durch diese Analyse konnte ebenfalls be-

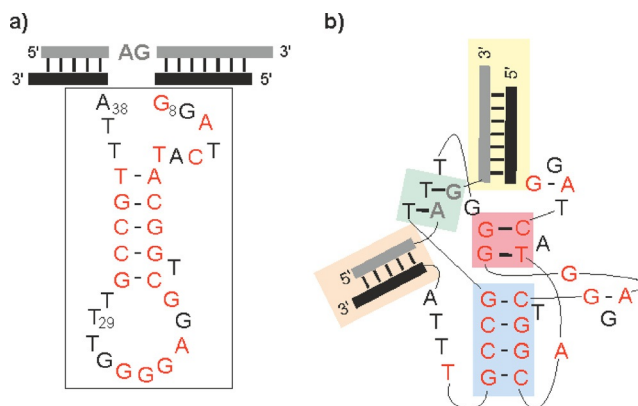


Abbildung 1. a) Zur Kristallisation verwendetes Konstrukt von 9DB1-RNA. Die Sekundärstruktur wurde auf der Basis von Mutationsstudien vorhergesagt. Grau: RNA, schwarz/rot: DNA. Eingerahmter Bereich: minimales Konstrukt von 9DB1.^[7] Rot gezeichnete Nukleotide sind notwendig für die katalytische Aktivität zur Ligation des 3'-terminalen Adenins mit einem GTP-Nukleotid am 5'-terminalen Ende des zweiten Strangs. Mutationen schwarz gezeichneter Nukleotide haben nur geringe Auswirkungen auf die katalytische Aktivität. b) Sekundärstruktur des DNAzym-RNA-Substratkomplexes in Form eines doppelten Pseudoknotens. Farbgebung der Stämme: P1: gelb, P2: rot, P3: blau, P4: orange, P5: grün; Farbkodierung der Nukleotide ist analog zu (a).

[*] Dr. J. Wirmer-Bartoschek, Prof. Dr. H. Schwalbe
Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie
Biomolekulares Magnetresonanz-Zentrum (BMRZ)
Goethe-Universität Frankfurt
Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt am Main (Deutschland)
E-Mail: schwalbe@nmr.uni-frankfurt.de

stimmt werden, welche Nukleotide in die Bildung eines langen helikalen Bereichs involviert sind. Mechanismus und 3D-Struktur des DNAzyls ließen sich mit dieser Methode aber nicht bestimmen, und ohne solche Strukturdaten konnten die Eigenschaften des DNAzyls bisher nur durch zeitaufwändige Trial-and-Error-Verfahren verbessert werden.

Den Gruppen von Höbartner und Pena gelang es nun, das DNAzym in Komplex mit einer RNA zu kristallisieren.^[5] Hierzu wurde ein 44 Nukleotide (nt) langer DNA-Strang verwendet, der die minimale 9DB1-Sequenz enthält und dessen angrenzenden Nukleotide zu einer 15 nt langen RNA komplementär sind, wobei die beiden zu ligierenden Nukleotide AG ungepaart bleiben (Abbildung 1 a).

Der DNA-RNA-Komplex hat die Form eines Doppel-pseudoknotens (Abbildung 1 b). Diese Struktur wird durch ein umfangreiches Netzwerk von tertiären Interaktionen und Nicht-Watson-Crick-Basenpaaren stabilisiert, die nicht durch die Mutationsdaten vorhergesagt wurden. Die gefundene, kompakte Struktur ist überraschend, da der DNA die 2'OH-Gruppe fehlt, die in der RNA wichtige Interaktionen zur Bildung solcher kompakter Strukturen eingeht. Die Analyse der Struktur zeigt aber, dass das Fehlen der 2'OH-Gruppe durch eine größere Variabilität des Zuckerphosphatrückgrats im DNAzym kompensiert wird.

Die Struktur hat die Form eines Alpha-Zeichens, wie von den Autoren hervorgehoben wird (Abbildung 2 a). 5 Stämme (P1 bis P5) mit 2 bis 7 Basenpaaren sind in der Struktur zu finden. P1 und P4 sind die DNA-RNA-Hybride, die einen Winkel von ca. 120° zueinander beschreiben. P2 besteht aus 2 Basenpaaren, die nicht vorhergesagt wurden. P2 und P3 (4 Basenpaare) sind auf P1 gestapelt und verlängern so diesen Teil des Alpha-Zeichens. Die ganze Struktur wird durch Basenmultipletts stabilisiert, die aus Nukleotiden der Stämme P2, P3 und den Verbindungen J1/2 und J2/3 bestehen. Im katalytischen Kern befinden sich die ligierten Nukleotide A-1 und G1, die zwischen dA15 (J1/2) und dG27 (J2/3) eingeklemt sind (Abbildung 2 b). A-1 und G1 sind überraschenderweise mit dT29 und dT30 gepaart, wodurch Stamm P5 ge-

bildet wird. Sowohl dT29 als auch dT30 tolerieren Mutationen, daher wurde diese Wechselwirkung nicht vorhergesagt.^[7] Außerdem können nicht nur A und G, sondern auch andere Nukleotide ligiert werden (Position –1: A,G, U; Position 1: A oder G).

Auf der Basis dieser strukturellen Daten konnten die Autoren das DNAzym durch Mutation eines einzigen Nukleotids (dT29) dahingehend manipulieren, dass auch RNAs ligiert werden, die ein C oder ein U an Position 1 enthalten. Diese RNAs werden nicht vom ursprünglichen 9DB1 ligiert. Eine Erhöhung der Ligationsrate der Original-RNA wurde durch Verwendung der dT29dC-Mutante erreicht.

Die Struktur erlaubt auch mechanistische Einblicke: Wasserstoffbrücken zwischen dem 2'OH von G1 und dem dC12-dG26-Basenpaar in P2 sind wichtig zur Positionierung des Phosphats von G1. Die Regioselektivität des DNAzyls wird durch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem 2'OH von A-1 und dem O4' von G1 erreicht, was dazu führt, dass sich das O2' von A-1 außerhalb der Ligationsstelle befindet (Abbildung 2 c). Dies wurde durch die Verwendung modifizierter Nukleotide verifiziert.

Die Nähe des Phosphats von dA13 zum katalytischen Zentrum impliziert eine Bedeutung dieser Phosphatgruppe für die Katalyse. Dies konnte durch Verwendung von Phosphatderivaten getestet werden: Ersetzen des pro-Sp-Phosphatsauerstoffs durch eine Methylgruppe führt zur Aufhebung der katalytischen Aktivität des DNAzyls.

Die Rolle von Metallionen für die Katalyse konnte jedoch nicht aufgeklärt werden. Mg²⁺-Ionen sind in der Struktur sichtbar, und hohe Konzentrationen zweiwertiger Ionen sind für die Katalyse notwendig. Es sind jedoch keine Mg²⁺-Ionen im katalytischen Zentrum zu beobachten. Auch wurde die katalytische Aktivität in thiophilen Metallrettungsexperimenten nicht zurückerhalten. Bei diesen Experimenten wurden nicht-verbrückende Sauerstoffatome des Phosphats von dA13 durch Schwefel und die harten Metalle durch weiche Metalle wie Mn²⁺ ersetzt.

Aufgrund dieser neuen Struktur verstehen wir, wie DNA kompakte Strukturen ausbilden kann, nämlich durch Verwendung von Nicht-Watson-Crick-Basenpaarungen, Basenmultipletts und einer große Bandbreite von Zuckerphosphatrückgrat-Winkeln, die das Fehlen des 2'OH im Vergleich zu RNA kompensieren. Auch werden erhebliche Einblicke in den Mechanismus erhalten, die eine zielgerichtete, rationale Modifikation des DNAzyls und die Erweiterung des Substratspektrums des DNAzyls ermöglichen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen beeindruckend, dass Strukturdaten eine unverzichtbare Basis für das rationale Design und die gezielte Verbesserung katalytischer DNAs sind.

Danksagung

H.S. wird von der DFG gefördert (SFB902), H.S. und J.W.-B. werden durch das LOEWE-Projekt Synchembio gefördert. H.S. ist Mitglied des Exzellenzclusters Makromolekulare Komplexe, der durch die DFG finanziert wird. Das BMRZ wird durch das Bundesland Hessen gefördert.

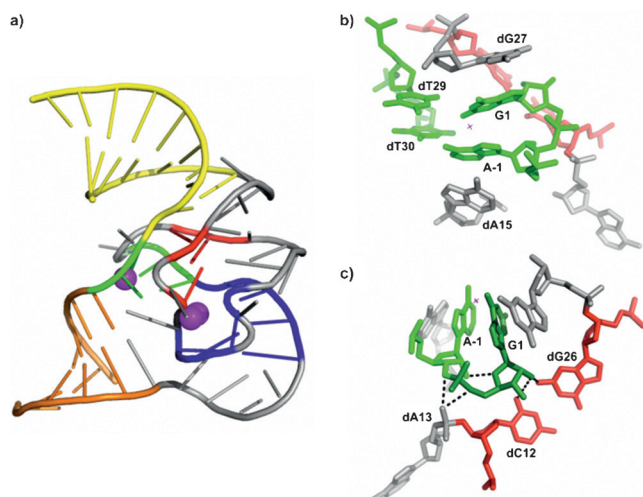



Abbildung 2. a) Struktur des DNA-RNA-Substratkomplexes (PDB ID 5cck).^[5] Farbgebung: P1: gelb, P2: rot, P3: blau, P4: orange, P5: grün, Mg²⁺: magenta. b, c) Unterschiedliche Ansichten des aktiven Zentrums des Komplexes.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 5376–5377
Angew. Chem. **2016**, 128, 5462–5464

- [1] S. K. Silverman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 7180–7201;
Angew. Chem. **2010**, 122, 7336–7359.
[2] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1992**, 355, 850–852.
[3] R. R. Breaker, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **1994**, 1, 223–229.
[4] M. Hollenstein, *Molecules* **2015**, 20, 20777–20804.
[5] A. Ponce-Salvatierra, K. Wawrzyniak-Turek, U. Steuerwald, C.
Höbartner, V. Pena, *Nature* **2016**, 529, 231–234.


- [6] W. E. Purtha, R. L. Coppins, M. K. Smalley, S. K. Silverman, *J.*
Am. Chem. Soc. **2005**, 127, 13124–13125.
[7] F. Wachowius, F. Javadi-Zarnaghi, C. Höbartner, *Angew. Chem.*
Int. Ed. **2010**, 49, 8504–8508; *Angew. Chem.* **2010**, 122, 8682–
8687.




Eingegangen am 2. Februar 2016
Online veröffentlicht am 15. März 2016




ChemistryViews

News & Information Service
for Scientists Worldwide



- Published by  **ChemPubSoc Europe**
an organization of 16 chemical societies
in continental Europe
- In close cooperation with society journals
like *Chemistry – A European Journal* and
Angewandte Chemie, the flagship journal of

GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER
- Free to view magazine
 **ChemViews**
Magazine of ChemPubSoc Europe



Celebrate **5** years of
ChemistryViews.org