

1. Einleitung

1.1. Struktur und Funktion von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren sind in viele biologische und biochemische Prozesse involviert. Als Bausteine der DNA (Desoxyribonukleinsäure) sind sie die Träger der genetischen Information eines Lebewesens. Diese wird mit Hilfe der RNA (Ribonukleinsäure) im Rahmen der Proteinbiosynthese weitergegeben.^[1,2]

Erst in den letzten zwanzig Jahren ist zunehmend bekannt geworden, dass auch RNA eine sehr viel größere strukturelle und funktionelle Vielfalt hat als bisher angenommen. Wurde der RNA früher hauptsächlich die Rolle als Überträger von Erbinformationen in Form von mRNA (*messenger RNA*) und der Transport der einzelnen Aminosäurebausteine bei der Proteinbiosynthese in Form von tRNA (*transfer RNA*) zugeschrieben, so kennt man heute eine Vielzahl weiterer zellulärer Prozesse, bei denen RNA in verschiedenster Form eine zentrale Rolle spielt. So ist sie beispielsweise in Form von snRNA (*small nuclear RNA*)^[3], asRNA (*antisense RNA*)^[4], microRNA^[5], siRNA (*small interfering RNA*)^[6] oder *riboswitches*^[7] unmittelbar an der Genregulation beteiligt. Desweiteren bestehen die katalytisch aktiven Bestandteile der Ribosomen aus rRNA (*ribosomal RNA*). Bei vielen Viren besteht das gesamte Genom aus RNA. In Anlehnung an „Ribonukleinsäure“ und „Enzym“ werden katalytisch aktive RNA-Moleküle zudem als Ribozyme bezeichnet.

Diese Vielfalt an Funktionen setzt ein hohes Maß an struktureller Diversität voraus. Dass bereits geringe Unterschiede in der Molekülstruktur großen Einfluss auf die Tertiärstruktur nehmen können, zeigt der Vergleich von doppelsträngiger RNA (dsRNA) mit doppelsträngiger DNA (dsDNA).

1.1.1. Doppelsträngige RNA

Auf molekularer Ebene unterscheidet sich DNA von RNA lediglich durch eine fehlende Hydroxygruppe an 2'-Position des Riboseringes und den Ersatz der Nukleobase Thymin durch Uracil.

In der Sekundärstruktur liegt RNA im Allgemeinen als einzelner, helikal gewundener Strang vor, während DNA meist einen, ebenfalls helikal gewundenen, Doppelstrang mit antiparalleler Basenanordnung ausbildet. Jedoch kann auch die RNA eine doppelsträngige

1. Einleitung

Struktur ausbilden. Diese ist ein wichtiges Strukturmerkmal in vielen Organismen, da die Erkennung von dsRNA eine zentrale Rolle in vielen biologischen Prozessen spielt.^[8] So ist sie beispielsweise bei der RNA-Interferenz^[9], dem mRNA-*editing*^[10,11] oder der Interferon-kontrollierten Reaktion von Viren^[12] von entscheidender Bedeutung.

Zwar bildet dsRNA wie dsDNA eine helikale Struktur aus. Der direkte Vergleich zeigt jedoch, dass die beiden Helices in ihrer Form nicht identisch sind. Die dsDNA liegt als sogenannte B-Helix vor, die sich durch eine breite und eher flache große Furche auszeichnet. Die kleine Furche hingegen ist eng und tief. Im Gegensatz dazu weist die A-Helix der dsRNA eine enge und sehr tiefe große Furche auf, während die kleine Furche sehr breit und flach ist (Tab. 1.1).^[13]

Tabelle 1.1.: Strukturelle Merkmale der dsDNA-B-Helix im Vergleich zur dsRNA-A-Helix.

	B-Helix (dsDNA)	A-Helix (dsRNA)
Richtung	rechtsgängig	rechtsgängig
Konformation der glycosidischen Bindung	anti	anti
Zuckerfaltung	C2'-endo	C3'-endo
Basenpaare pro Windung	10,4	11
Ganghöhe	3,32 nm	2,46 nm
Neigung der Basenpaare	1°	19°
große Furche	breit, eher flach	eng, sehr tief
kleine Furche	eng, tief	sehr breit, flach

Die große Furche der RNA-A-Form-Helix ist zum einen zu eng, zum anderen durch negativ geladene Phosphatreste blockiert, um Kontakte zwischen Proteinen und den Basen zu erlauben. Eine basenspezifische Erkennung durch Proteine, wie bei der dsDNA, ist hier daher nicht möglich. Da die chemische Umgebung in der kleinen Furche der A-Helix weitgehend unabhängig von der Basensequenz ist (es werden hauptsächlich 2'-Hydroxygruppen präsentiert), geht man davon aus, dass hier keine Sequenzspezifität vorliegt, sondern die Erkennung vielmehr strukturabhängig ist^[15]. Zur Unterscheidung verschiedener RNA-Doppelstränge könnten zum Beispiel strukturelle Unregelmäßigkeiten wie Ausstülpungen, *loops*, Fehlpaarungen oder überhängende Einzelstrangenden dienen.^[16-19] In Abb. 1.2 sind einige Beispiele für Sekundär- und Tertiärstrukturelemente von RNA gezeigt.

1.1.2. DNA/RNA-bindende Proteine

Die Wechselwirkung von Proteinen mit DNA ist sehr gut untersucht. Die Unterscheidung verschiedener DNA-Stränge durch Proteine erfolgt meist anhand der Basensequenz.^[21] Häufig vorkommende Struktur motive sind *Helix-loop-helix*-Strukturen, *Leucin-zipper* und

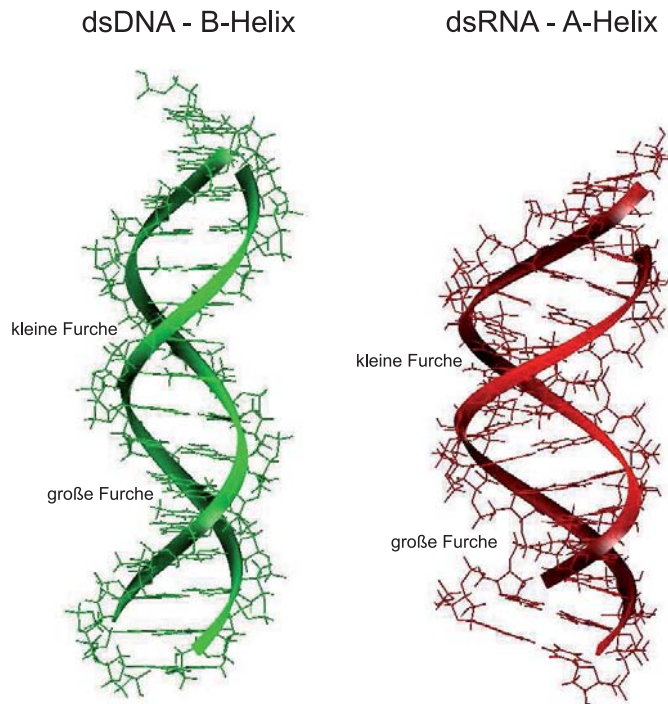


Abbildung 1.1.: Vergleich der Tertiärstruktur von dsDNA (grün) und dsRNA (rot). Zur Illustration wurden zwei Doppelstränge mit je 16 Basenpaaren einer sich wiederholenden ACGT-, bzw. ACGU-Sequenz mit dem Softwarepaket *Sybyl*^[14] erzeugt.

Zinkfinger.^[22] Aufgrund der inzwischen gewonnenen Erkenntnisse ist es mittlerweile sogar möglich, Moleküle (beispielsweise Peptide) zu synthetisieren, die selektiv bestimmte Nukleotidsequenzen erkennen.^[23,24]

Das Zinkfingermotiv

Zinkfinger sind neben *Helix-turn-helix*-Strukturen und *Leucin-zippern* ein häufig vorkommendes Strukturmotiv in Nucleinsäure-bindenden (dsDNA und ssRNA) Proteinen. Mehr als 4000 dieser Domänen sind in über 700 verschiedenen Proteinen bekannt^[25] und es wird vermutet, dass bis zu ein Prozent der im menschlichen Genom kodierten Proteine ein Zinkfingermotiv enthalten. Sie bestehen in der Regel aus etwa 30 Aminosäuren, von denen vier koordinativ an ein einzelnes Zn^{2+} -Ion gebunden sind. Die beiden am häufigsten vorkommenden Substrukturen sind Cys_4 und Cys_2His_2 , was bedeutet, dass das Zinkion entweder über vier Cysteinreste oder über zwei Cystein- und zwei Histidinreste koordiniert ist. Im Cys_2His_2 -Motiv sind die beiden Histidinreste in der Regel drei oder vier Aminosäuren voneinander entfernt. Daneben gibt es noch eine Reihe seltener vorkommender Zinkfingermotive.^[1] Üblicherweise sind die einzelnen Zinkfingerdomänen sechs bis acht Aminosäuren von-

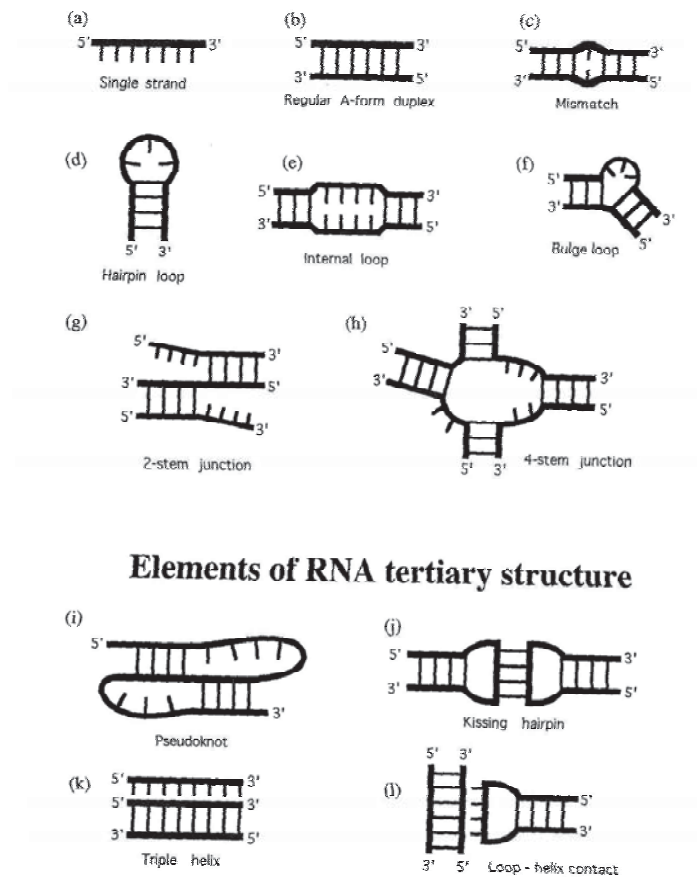


Abbildung 1.2.: Sekundär- (a-h) und Tertiärstrukturelemente (i-l) von RNA. Dicke Linien kennzeichnen das Nucleinsäurerückgrat, dünne Linien repräsentieren die Basen. Abbildung entnommen aus [20].

einander entfernt. Das Zinkion selbst tritt nicht mit der Nucleinsäure in Wechselwirkung, sondern stabilisiert durch die Koordination das kleine Strukturmotiv. Als erstes wurde das Zinkfingermotiv im Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA) aus *Xenopus laevis* identifiziert (Abb. 1.3). [26]

Während das Zinkfinger-Motiv bei dsDNA-bindenden Proteinen schon seit längerem bekannt ist, wurde es bei dsRNA-bindenden Proteinen erstmals beim *dsRNA-binding protein* ZFa (dsRBP-ZFa) aus *Xenopus laevis*, einem afrikanischen Krallenfrosch, gefunden (s. 1.1.3). [27,28]

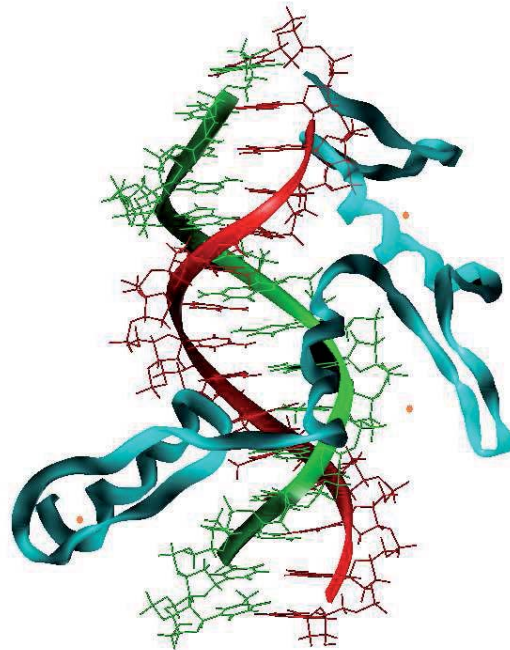


Abbildung 1.3.: NMR-Struktur der ersten drei Zinkfingerdomänen von TFIIIA (PDB-Code: 1TF3) im Komplex mit dsDNA.^[26] Das Protein (cyan) windet sich um die Doppelhelix und bindet mit seinen drei Zinkfingerdomänen kooperativ an den DNA-Doppelstrang. Die koordinierten Zink-Ionen sind orange dargestellt.

Das double-stranded RNA-binding motif (dsRBM)

Im Gegensatz zur dsDNA ist die Wechselwirkung von dsRNA mit Proteinen sehr viel weniger gut untersucht. Ein Motiv, das bei fast allen bisher bekannten dsRNA-bindenden Proteinen gefunden wurde, ist das *double-stranded RNA-binding motif* (dsRBM). Diese in der Regel etwa 70 Aminosäuren umfassende Sequenz bildet eine sehr charakteristische Tertiärstruktur aus, eine α - β - β - α -Faltung, bei der die beiden Helices auf einer Seite des dreisträngigen, antiparallelen β -Faltblattes angeordnet sind. Die meisten potenziell dsRNA-bindenden Reste sind auf der Oberfläche exponiert. Proteine mit dsRBM binden an dsRNA, sowie in manchen Fällen auch an RNA-DNA-Hybride, wobei in der Regel keine Sequenzspezifität erkennbar ist. Neben seiner wichtigen Funktion bei der dsRNA-Erkennung ist das dsRBM auch an der Komplexbildung von Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt.^[29]

Das dsRBM wurde zunächst in Staufen, einem Protein, das für die mRNA-Lokalisierung in *Drosophila* verantwortlich ist, und PKR, einer dsRNA-aktivierten Proteinkinase in Nagern, entdeckt.^[30-32] Bis 2005 waren bereits 388 eukaryotische, davon 72 humane, Proteine aus mindestens neun Proteinfamilien mit unterschiedlicher Funktion bekannt, die bis zu fünf dieser Bindungsmotive enthalten können.^[33]

Bisher konnten neun hochaufgelöste Strukturen des dsRBM im Komplex mit dsRNA-Konstrukten aufgeklärt werden.^[34–40] Obwohl die untersuchten Domänen aus verschiedenen Proteinen mit zum Teil geringer Sequenzhomologie stammen und die dsRNA-Bindungspartner sich teilweise stark in ihrer Sequenz unterscheiden, weisen die Strukturen eine sehr große Ähnlichkeit auf. Die Wechselwirkung findet dabei hauptsächlich zwischen 2'-Hydroxygruppen und Phosphat-Sauerstoffen des Zucker-Phosphat-Rückgrats der dsRNA und der α_1 -Helix, dem β_3 - α_2 -loop und dem β_1 - β_2 -loop des Proteins statt (Abb. 1.4). Sie ist daher auf RNA-Seite nicht sequenzspezifisch. Das Motiv lagert sich an einer Seite des dsRNA-Doppelstranges an und überbrückt zwei kleine Furchen sowie die dazwischenliegende große Furche. Aufgrund der unterschiedlichen Topologie der großen und kleinen Furchen (siehe 1.1.1) kann so dsRNA im Gegensatz zu dsDNA erkannt werden. Wie hingegen zwischen verschiedenen dsRNAs unterschieden werden kann, ist damit aber noch nicht geklärt.

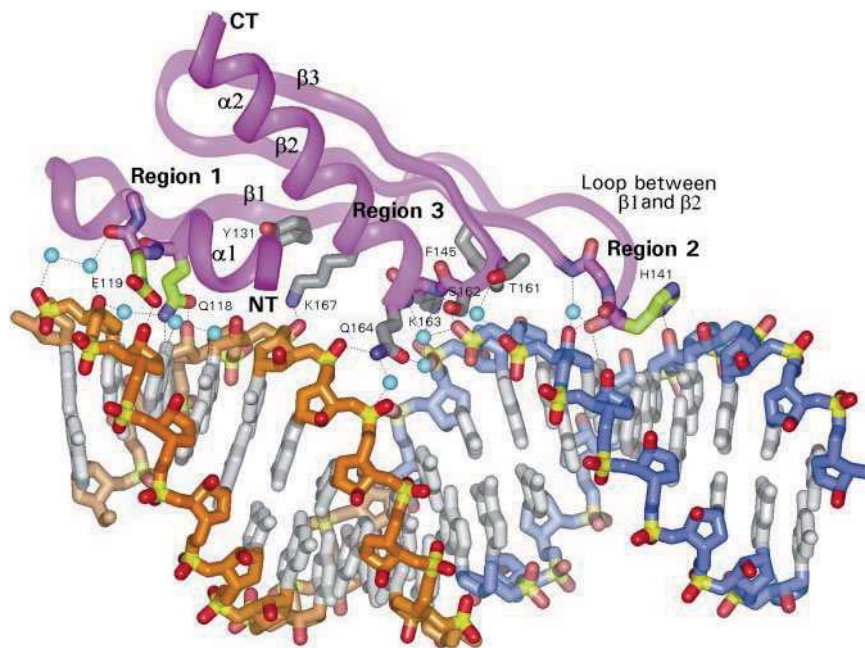


Abbildung 1.4.: Wechselwirkung zwischen dem dsRBM von Xlrpba-2 mit doppelsträngiger RNA. Das Proteinrückgrat ist in violett dargestellt, die mit der RNA interagierenden Reste in grün bzw. grau. Wasserstoffbrücken sind durch gestrichelte schwarze Linien gekennzeichnet. Abbildung entnommen aus^[34].

In deutlich geringerem Maße sind auch dsRNA-bindende Proteine ohne das charakteristische dsRBM bekannt. Protein-dsRNA-Komplexe sind beispielsweise vom Protein p19, das spezifisch dsRNA von 19 Basenpaaren (BP) Länge erkennt^[41,42], vom B2 Protein des

flock house virus^[43,44], vom *core*-Protein des *blue-tongue virus*^[45] sowie von Proteinen, die mit doppelsträngigen rRNA-Regionen wechselwirken^[46], charakterisiert worden.

Ein ebenfalls spezifisch dsRNA-erkennendes Protein ist das *double-stranded RNA-binding protein ZFa* (dsRBP-ZFa) aus *Xenopus laevis*. Funktion und natürliches Substrat dieses Proteins sind noch nicht bekannt, auch konnte noch keine Komplexstruktur erhalten werden. Es deutet aber vieles darauf hin, dass es sich hier um ein neues dsRNA-Erkennungsmotiv handelt (s. 1.1.3).

1.1.3. Das dsRNA-binding protein dsRBP-ZFa aus *Xenopus laevis*

Das *double-stranded RNA-binding protein* dsRBP-ZFa aus *Xenopus laevis* wurde erstmals beim Screening einer ovariellen *complementary* DNA (cDNA) Expressionsbibliothek, wie sie für die Suche nach DNA bindenden Proteinen verwendet wird, identifiziert.^[28] Es besteht aus 524 Aminosäuren und hat einen sauren C- und einen basischen N-Terminus. Es enthält insgesamt 7 Zinkfinger motive des C₂H₂-Typs, von denen die C-terminalen vier von der Sequenz her nahezu identisch sind (91 - 100 % Sequenzhomologie), die N-terminalen drei aber weder untereinander noch zu den vier C-terminalen große Ähnlichkeit zeigen (Abb. 1.5).

Die biologische Funktion von dsRBP-ZFa ist bislang noch völlig unklar. Die homologen Proteine JAZ, wig-1 und PAG608, die in Nagern und beim Menschen gefunden wurden und wie dsRBP-ZFa eine hohe Präferenz für dsRNA und RNA/DNA-Hybride gegenüber dsDNA zeigen (siehe nächster Abschnitt), spielen eine wichtige Rolle beim Prozess der Apoptose.^[48-51] Sie werden durch den Tumorsuppressor p53 induziert und in bestimmten Tumoren, beispielsweise dem Plattenepithelzellkarzinom der Lunge, in erhöhten Konzentrationen gefunden. Künstlich hervorgerufene Überexpression dieser Proteine kann Apoptose auslösen und das Wachstum von Tumorzellen hemmen. Die Bindung an dsRNA mit Hilfe intakter Zinkfingerdomänen ist für ihre Funktion essentiell.

Electrophoretic mobility shift assays zeigten eine starke Präferenz zur Bindung an A-Form-Helices. Für 36 Basenpaare umfassende dsRNA und RNA/DNA-Hybride wurden Bindungskonstanten im nanomolaren Bereich erhalten. Eine Sequenzspezifität konnte dabei jedoch nicht beobachtet werden. Um den Einfluss der einzelnen Zinkfingerdomänen näher zu untersuchen, synthetisierten Finerty *et al.* sieben verschiedene Proteinkonstrukte, die jeweils eine unterschiedliche Kombination der sieben Zinkfingerdomänen enthielten (Abb. 1.6).^[47] Während die Konstrukte zf-67 und zf-7 auch bei hohen RNA-Konzentrationen (1 µM bzw. 10 µM) keine Bindung zeigten, wurden für die Konstrukte zf-123, zf-4567 und zf-567 Bindungskonstanten im nanomolaren Bereich erhalten. Bindung an einzelsträngige

1. Einleitung

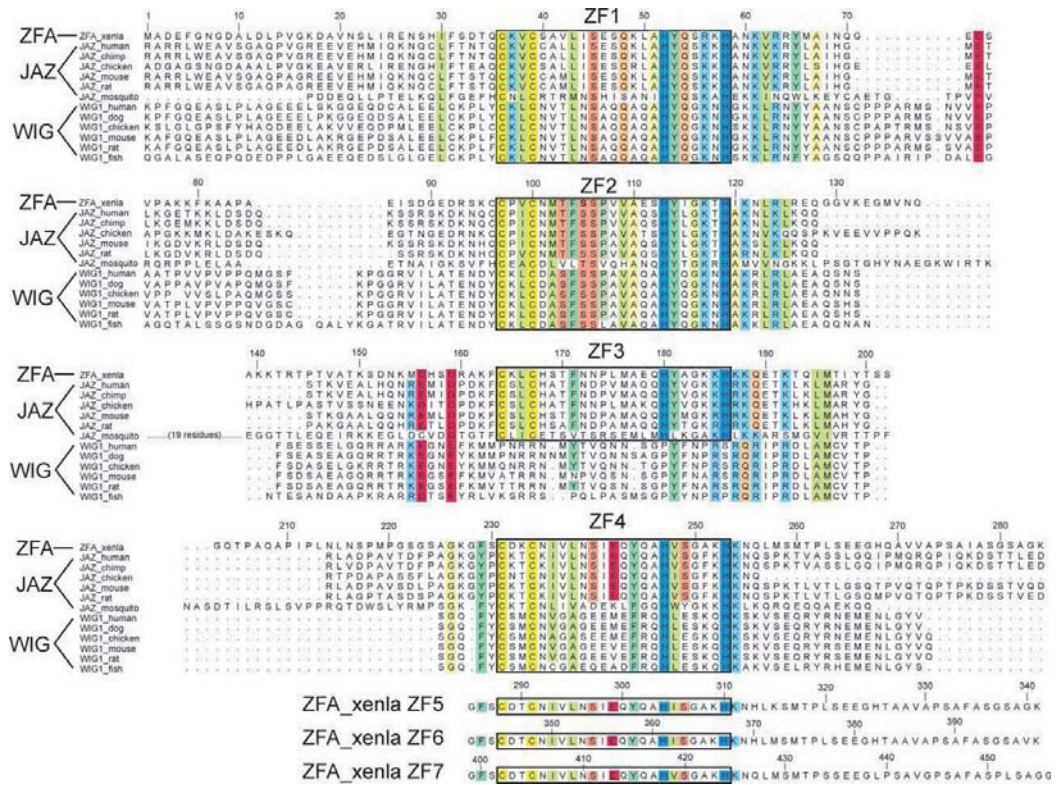


Abbildung 1.5.: Vergleich der Aminosäuresequenz von dsRBP-ZFa aus *Xenopus laevis* mit den JAZ- und wig-Proteinen aus anderen Organismen. Die Sequenzen sind so übereinandergelegt, dass die Zinkfingerdomänen verglichen werden können. Die N-terminalen Fortsetzungen der JAZ- und wig-Proteine sind nicht gezeigt, die Nummerierung entspricht der dsRBP-ZFa-Sequenz. Die Zink-koordinierenden Cysteine und Histidine sind gelb, bzw. blau hinterlegt. Konservierte Aminosäuren sind grün (hydrophob), blau-grün (aromatisch), hellblau (positiv geladen), rot (negativ geladen), rosa (hydrophil) und hellgelb (kurze Seitenkette) markiert. Abbildung entnommen aus^[15].

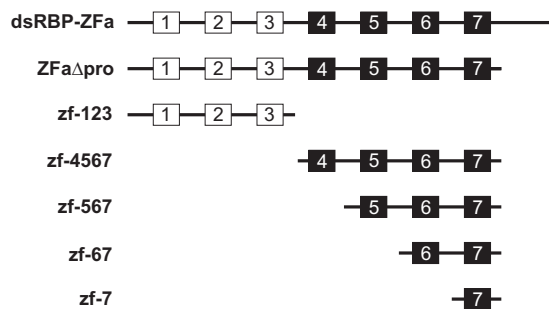


Abbildung 1.6.: Von Finerty *et al.* synthetisierte Proteinfragmente von dsRBP-ZFa.^[47] Ganz oben dargestellt sind das komplette Protein (dsRBP-ZFa) und das Protein ohne C-terminalen Rest (ZFa Δ pro). Darunter sind die Proteinfragmente dargestellt, denen verschiedene Zinkfingerdomänen fehlen. Die Zahl indiziert jeweils die Nummer der Zinkfingerdomäne.

Oligonukleotide sowie an dsDNA konnte nicht beobachtet werden. Während zf-123 eine ebenso hohe Affinität zu RNA/DNA-Hybriden zeigt, ist diese bei zf-4567 und zf-567 um ein bis zwei Größenordnungen kleiner.

Dass Konstrukte, die nur die ersten bzw. letzten drei Zinkfingerdomänen enthalten, eine genauso starke Affinität zu dsRNA zeigen wie das Wildtyp-Protein, war zunächst einmal erstaunlich. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass dsRBP-ZFa zwei verschiedene dsRNA-Substrate hat.^[47] Da die N-terminalen Zinkfinger RNA/DNA-Hybride mit nahezu identischer Affinität wie dsRNA binden, ist es auch denkbar, dass das dazugehörige Substrat eine Mischform aus A- und B-Helix ist oder dass es sich um eine komplexere Topologie, wie beispielsweise bei der tRNA zu finden, handelt.

Die Struktur der beiden N-terminalen Zinkfingerdomänen wurde 2005 von Möller *et al.*^[15] mit Hilfe NMR-spektroskopischer Methoden aufgeklärt (Abb. 1.7). Obwohl sich strukturelle Ähnlichkeiten sowohl zu klassischen C₂H₂-Zinkfingern als auch zum dsRBM und anderen Nucleinsäure bindenden Proteindomänen erkennen ließen, konnte nicht auf ein Bindungsmotiv für die dsRNA-Wechselwirkung geschlossen werden.

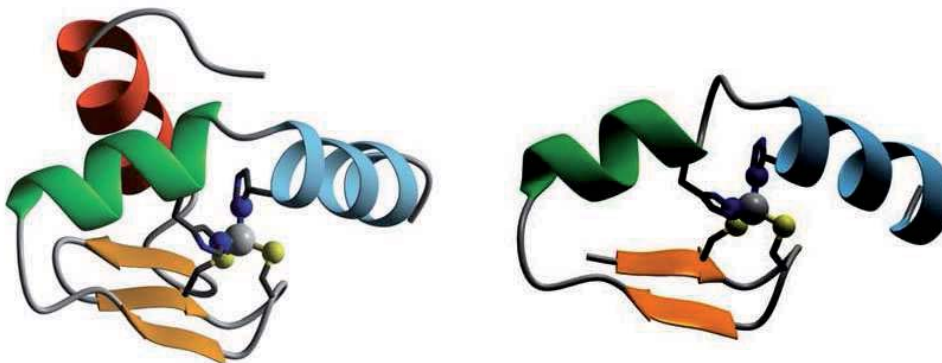


Abbildung 1.7.: Struktur der beiden N-terminalen Zinkfingerdomänen ZF1 und ZF2 aus dsRBP-ZFa. In grau dargestellt ist jeweils das Zinkion, das von den beiden Histidin- (blau) und Cystein-Resten (gelb) koordiniert wird. Grün und hellblau sind die beiden Helices, die das geknickte HTH-Motiv bilden. Abbildung entnommen aus^[15].

Beide Zinkfingerdomänen bilden eine β - β - α - α -Faltung aus. Die beiden das Zinkion koordinierenden Cystein-Reste sind dabei in dem zweisträngigen antiparallelen β -Faltblatt lokalisiert, während die beiden α -Helices ein charakteristisches *Helix-turn-helix*-Motiv (HTH-Motiv) ausbilden. Die das Zinkion koordinierenden Histidinreste befinden sich in jeweils einer der beiden Helices und stabilisieren durch die Metallkoordination den Knick zwischen diesen. Bei der ersten Zinkfingerdomäne (ZF1) schließen sich N-terminal ein weiteres β -Faltblatt sowie eine α -Helix an, wobei letztere mit dem HTH-Motiv in Interaktion tritt.

1. Einleitung

Auf der solvensexponierten Seite der HTH-Motive von ZF1 und ZF2 befinden sich mehrere Lysin- und Argininreste und bilden eine positiv geladene Oberfläche (Abb. 1.8). Diese könnte sehr gut mit dem negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrat der dsRNA wechselwirken.

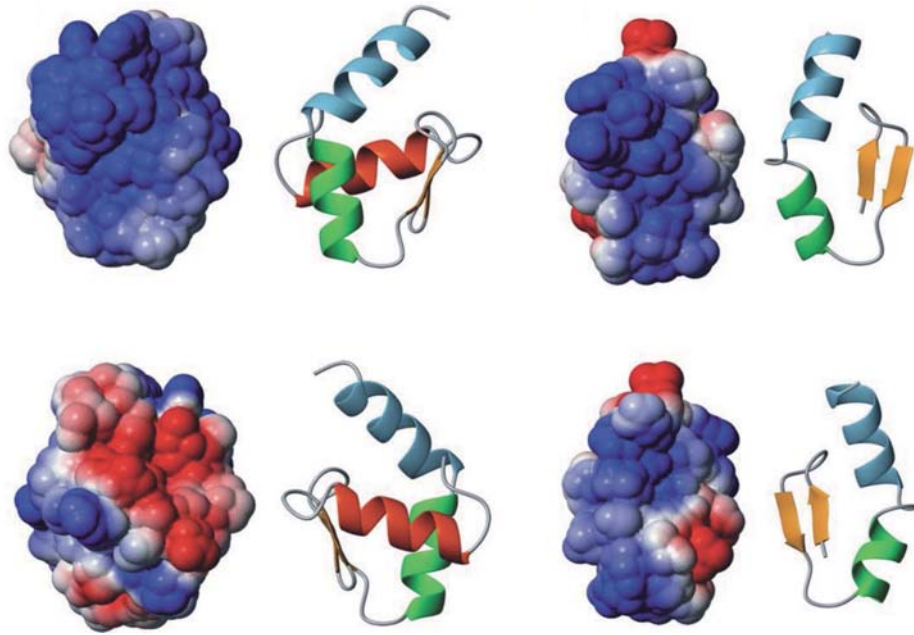


Abbildung 1.8.: Elektrostatistisches Oberflächenpotential von ZF1 (links) und ZF2 (rechts). Positiv geladene Bereiche sind blau, negative rot gefärbt. Die nach außen liegenden Bereiche des HTH-Motivs sind vornehmlich positiv geladen und damit für eine Wechselwirkung mit RNA prädestiniert. Abbildung entnommen aus^[15].

Somit lassen sich zwar strukturelle Ähnlichkeiten zu klassischen C_2H_2 -Zinkfingern erkennen, in vielerlei Hinsicht verhalten sich die hier beschriebenen Zinkfinger allerdings untypisch. So sind die beiden Zinkfingerdomänen im Gegensatz zu sonst üblichen sechs bis acht Aminosäuren durch einen langen, 40 Aminosäuren umfassenden, unstrukturierten Linker verbunden, wodurch sie sich unabhängig voneinander bewegen können. Der Abstand zwischen den beiden Zink koordinierenden Histidinresten ist mit fünf Aminosäuren länger als die üblicherweise gefundenen drei bis vier. Desweiteren hat die Strukturaufklärung gezeigt, dass die Zinkkoordination an sich ungewöhnlich ist: das Zinkion wird jeweils über einen δ - und einen ε -Stickstoff der beteiligten Histidin-Seitenketten koordiniert. Es handelt sich hier also vermutlich um ein zum damaligen Zeitpunkt neues Erkennungsmotiv für doppelsträngige RNA.

Einen interessanten Hinweis auf ein mögliches Substrat von dsRBP-ZFa lieferte eine Veröffentlichung von Zhou *et al.* im Jahre 2008. Dimethylallyltransferase (DMATase) katalysiert den Transfer einer Dimethylallylgruppe eines Dimethylallyl-Pyrophosphates zum N6-Stickstoff von Adenin 37 bestimmter tRNAs. Zhou *et al.* haben Kristallstrukturen mehrerer Zwischenformen des DMATase-tRNA^{Cys}-Komplexes veröffentlicht, die neue Hinweise auf den Reaktionsmechanismus lieferten.^[52] Das Enzym erkennt das tRNA-Substrat durch indirektes Auslesen der Sequenz. Adenosin 37 klappt aus dem Anticodon-loop der tRNA in den Kanal der DMATase, wo die Funktionalisierung stattfindet (Abb. 1.9).

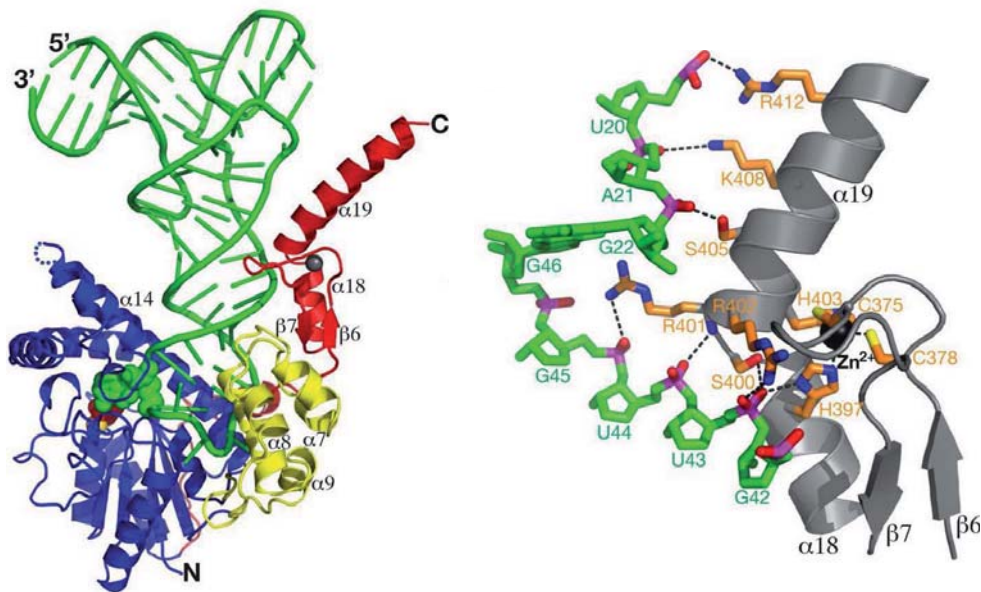


Abbildung 1.9.: Links: Struktur des DMATase-tRNA-Pyrophosphat-Komplexes. Die tRNA ist grün dargestellt, blau die DMATase *core domain*, gelb die DMATase *insertion domain*, rot der C-Terminus mit dem HTH-Motiv. Rechts: Interaktion des C-terminalen HTH-Motivs (grau) mit der tRNA (grün). Abbildung entnommen aus^[52].

Der eigentlich interessante Teil für die vorliegende Arbeit ist aber nicht das in Abb. 1.9 blau dargestellte aktive Zentrum des Proteins, sondern das rote Zinkfinger-Motiv, bestehend aus den beiden antiparallel angeordneten β -Faltblättern β_7 und β_8 sowie den sich C-terminal anschließenden α -Helices α_{18} und α_{19} , die in der Veröffentlichung wie folgt beschrieben werden:

[...] *The overall structure of the zinc finger can be interpreted as an uninterrupted long helix that is forced to make a kink by coordination of His-397 and His-403 with a zinc ion. This results in a zinc finger whose shape is complementary to the structure of tRNA near the junction of anticodon stem and D loop[...].*

1. Einleitung

Die Wechselwirkung findet hauptsächlich zwischen basischen Resten des HTH-Motivs und negativ geladenen Phosphatresten der tRNA statt (Abb. 1.9). Bei einer Struktur-Homologie-Suche konnte kein verwandtes Protein gefunden werden, weshalb die Autoren diese Zinkfinger-Struktur als neues RNA-Erkennungsmotiv postulierten.

Andreeva *et al.* zeigten jedoch, dass besagtes HTH-Motiv eine sehr hohe Strukturhomologie zu anderen Oligonukleotid-bindenden Zinkfingerdomänen mit H-X₅-H-Motiv zeigt.^[53] In Abb. 1.10 sind Vergleiche mit Sequenzen und Strukturen anderer Oligonukleotid-bindender Proteine mit HTH-Motiv dargestellt. Neben den stark konservierten Cystein- (gelb) und Histidin-Resten (blau), die an das Zinkion koordinieren, haben alle dargestellten Proteine basische Aminosäuren an zwei identischen Positionen im Bereich des HTH-Motivs (violett). Desweiteren ist die Anzahl basischer Aminosäuren in diesem Bereich (zwischen sechs und zwölf in einem Sequenzabschnitt von 27 Resten) bei allen gezeigten Proteinen relativ groß. Insbesondere aus dem Strukturvergleich mit ZF1 aus dsRBP-ZFa geht hervor, dass tRNA als mögliches Substrat für dieses Protein in Frage kommt.

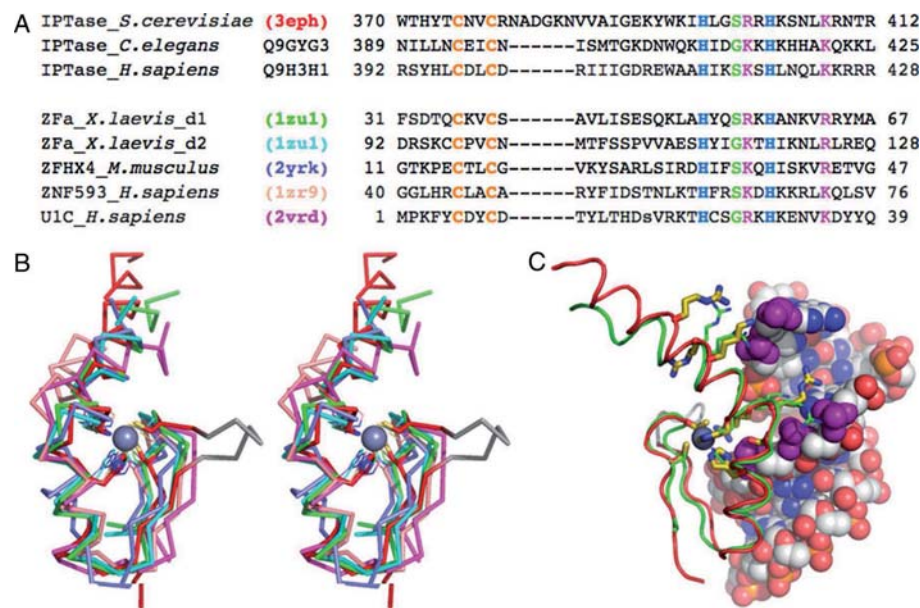


Abbildung 1.10.: A: Vergleich der Sequenz des N-terminalen HTH-Motivs aus der DMATase-tRNA-Struktur mit bekannten HTH-Zinkfingern. Die Zink-koordinierenden Cysteine und Histidine sind gelb, bzw. blau dargestellt. B: *stereoview* der überlagerten Strukturen der HTH-Zinkfingerstrukturen. Die Farben der Domänen entsprechen denen aus A. C: Strukturvergleich von ZF1 aus dsRBP-ZFa mit der DMATase-HTH-Domäne im Komplex mit tRNA. Abbildung entnommen aus^[53].

1.1.4. Das dsRNA-erkennende Protein Rnt1p aus *Saccharomyces cerevisiae*

Das Protein Rnt1p gehört zur RNase III-Familie der dsRNA-Endonukleasen und spielt eine Schlüsselrolle bei der RNA-Prozessierung von *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), indem es sehr spezifisch ausgewählte RNA-Moleküle spaltet.^[54] Bekannte Substrate dieser Proteinklasse sind snRNAs^[55] und snoRNAs (*small nucleolar RNA*), welche unter anderem in die Modifikation von rRNA-Vorläufern involviert sind, wie zum Beispiel bei der spezifischen 2'O-Methylierung^[56-58] oder der Pseudouridylierung^[59,60]. Auch sind Beispiele dieser Familie bekannt, die eine wichtige Rolle bei der RNA-Interferenz spielen, z.B. die Proteine Dicer aus *Drosophila melanogaster*^[9] und Drosha aus *Caenorhabditis elegans*^[61]. Außerdem ist Rnt1p im Abbauprozess von pre-mRNA und mRNA involviert^[62,63].

Alle Substrate von Rnt1p sind dsRNA-*hairpins* mit einem AGNN-*tetraloop*^[64], wobei N für eine beliebige Nukleobase steht. Die *loop*-Region dient dabei ausschließlich der Erkennung des Substrates, die eigentliche Spaltung der dsRNA findet im Bereich des Doppelstranges statt, in 14 - 16 Basenpaaren Abstand vom *hairpin*.^[54]

Wu *et al.* veröffentlichten 2004 eine NMR-Struktur des dsRBM von Rnt1p im Komplex mit dsRNA^[36]. Dazu synthetisierten sie ein 88 Aminosäuren umfassendes Protein, entsprechend den Resten 366 - 453 von Rnt1p. Als Substrat verwendeten sie ein 32 Nukleotide umfassendes Derivat (14 Basenpaare + *tetraloop*) des 5'-*hairpins* des snR47 snoRNA-*precursors* von Hefe, da die Interaktion mit diesem biochemisch relativ gut verstanden^[54] und die Struktur des AGAA-*tetraloops* bekannt ist^[65]. Zusätzlich zur klassischen α_1 - β_1 - β_2 - β_3 - α_2 -Faltung hat das dsRBM von Rnt1p C-terminal eine weitere Helix (α_3), die mit ihrer hydrophoben Seite mit dem C-terminalen Teil der α_1 -Helix sowie dem α_1 - β_1 -*loop* wechselwirkt (Abb. 1.11, A, gelbe Struktur).

Das dsRBM von Rnt1p bindet das RNA-Substrat an einer Seite über fast dessen gesamte Länge, wobei die Wechselwirkung hauptsächlich über das Zucker-Phosphat-Rückgrat stattfindet. Das Motiv zeigt den bekannten Bindungsmodus (siehe 1.1.2). Das Protein bindet über drei aufeinanderfolgende kleine und große Furchen, wobei eine der kleinen Furchen an den *tetraloop* grenzt. Die α_1 -Helix liegt in der kleinen Furche des *tetraloops* und der zwei angrenzenden Basenpaare. Das N-terminale Ende der α_2 -Helix und der β_3 - α_2 -*loop* binden an das Zucker-Phosphat-Rückgrat der großen Furche, während der β_1 - β_2 -*loop* in der kleinen Furche 10 - 13 Basenpaare entfernt vom *tetraloop* liegt (Abb. 1.11).

Erstaunlicherweise sind keine basenspezifischen Kontakte zwischen Protein und den konservierten Basen des *loops* (A und G) zu beobachten. Es handelt sich hier also offensichtlich um eine strukturspezifische Erkennung der *tetraloop*-Konformation.

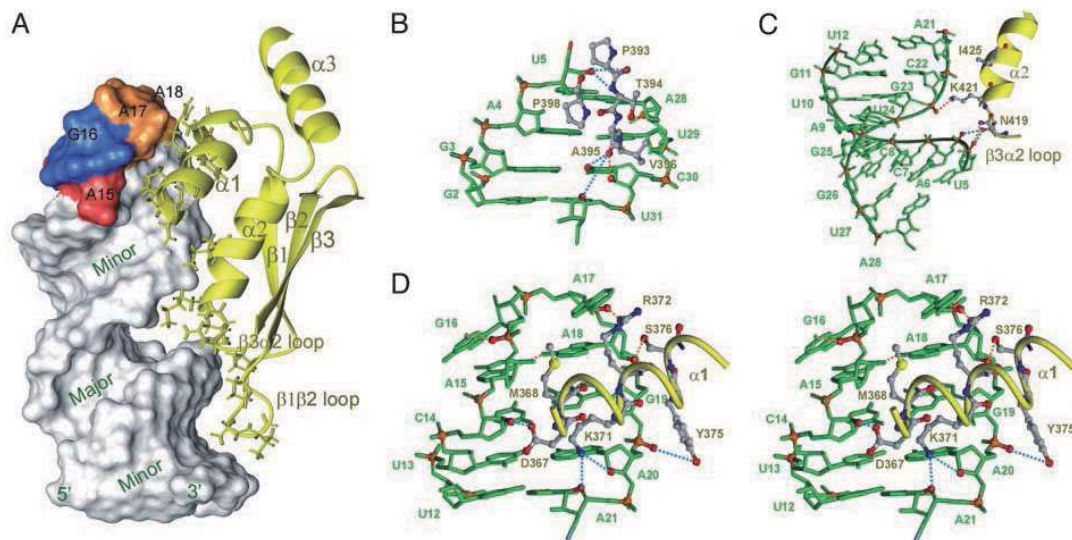


Abbildung 1.11.: Wechselwirkungen zwischen dem dsRBM von Rnt1p mit snR47h-RNA. A: Struktur des Komplexes zwischen Protein und RNA. Gezeigt ist die Oberfläche des RNA-Stranges mit den Basen A15 in rot, G16 in blau und A17, A18 in orange. Das Protein ist gelb dargestellt. B-D: Detaillierte Abbildung der Interaktion des Proteins mit der kleinen Furche (B), der großen Furche (C) und der kleinen Furche des *tetraloops* als *stereoview* (D). Nukleotide sind grün dargestellt, Phosphatreste und O2'-Gruppen von wechselwirkenden Riboseren rot. Direkte und von Wasser medierte Wasserstoffbrücken sind als orange bzw. blau gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die an der Wechselwirkung beteiligten Seitenketten des Proteins sind als *sticks* dargestellt, das Proteinrückgrat als gelbes Band. Abbildung entnommen aus^[36].

Chanfreau *et al.* haben den Einfluss von Mutationen im Substrat von Rnt1p sowohl auf Bindung an das Protein, als auch auf die dsRNA-Spaltung untersucht^[54]. Enthielt die RNA statt des AGAA-*loops* einen ACAA-*loop*, fand keine Spaltung statt, im Falle von CGAA, GAAA und UUCG war sie nahezu aufgehoben. Wurden Basenpaare zwischen *tetraloop* und Spaltstelle entfernt, verschob sich letztere um die Anzahl der fehlenden Basenpaare. Die Spaltungsaktivität blieb in diesem Fall jedoch praktisch unverändert. Die Spaltstelle definiert sich also offenbar ausschließlich durch den Abstand zum *tetraloop*.

Um den Einfluss des AGNN-*tetraloops* auf die Bindung von Rnt1p an sein RNA-Substrat zu untersuchen, wurden SPR-Experimente in Abwesenheit von Mg^{2+} , welches für die Spaltungsreaktion notwendig ist, durchgeführt. Dazu wurde Rnt1p auf einer Dextranoberfläche immobilisiert und die Wechselwirkung mit sowohl Wildtyp-Substrat, als auch mit der GAAA-*tetraloop*-Mutante untersucht. Während die Assoziation von Rnt1p mit dem Wildtyp-Substrat etwa zehnmal schneller ablief als mit der Mutante ($k_a(\text{AGAA}) = 6,48 \cdot 10^5 \frac{1}{M \cdot s}$, $k_a(\text{GAAA}) = 7,32 \cdot 10^4 \frac{1}{M \cdot s}$), verlief die Dissoziation lediglich etwa zweimal so schnell ($k_d(\text{AGAA}) = 1,06 \cdot 10^{-3} \frac{1}{s}$, $k_d(\text{GAAA}) = 5,67 \cdot 10^{-4} \frac{1}{s}$). Daraus ergibt sich eine etwa fünfmal kleinere Dissoziationskonstante für das Wildtyp Substrat ($K_d(\text{AGAA}) = 1,6 \text{ nM}$,

$K_d(\text{GAAA}) = 7,8 \text{ nM}$). Auch bei anderen RNA-Konzentrationen war die Dissoziationskonstante K_D bei der GAAA-Mutante stets höher als beim Wildtyp-Substrat.

Für die Erkennung der *stem-loop*-RNA durch die α_1 -Helix von Rnt1p ist also offensichtlich ein AGNN-*tetraloop* notwendig. Allerdings ist wohl nicht die Sequenz, sondern die Konformation des *loops* entscheidend, da die Wechselwirkung zwischen Protein und RNA nur über die beiden nicht konservierten Reste des *tetraloops*, in diesem Fall A17 und A18, stattfindet. Der Beitrag der α_1 -Helix von Rnt1p zur Bindung an *stem-loop*-RNA-Substrate ist relativ gering, der Großteil der Bindung geschieht über das restliche dsRBM. Allerdings ist diese Bindung alleine nicht produktiv, d.h. eine Spaltung der RNA findet nur bei Vorliegen des AGNN-*tetraloops* statt.

1.2. Künstliche Bindungsmotive für Nukleinsäuredoppelstränge

Um in die biochemischen Prozesse in einer Zelle eingreifen zu können, wurden sehr viele Ansätze entwickelt und auch schon erfolgreich angewendet. Neben kleinen Molekülen, die selektiv biologisch aktive Spezies imitieren, zerstören oder reversibel blockieren, werden bereits erfolgreich modifizierte Nukleinsäuren, beispielsweise beim *antisense*-Ansatz, eingesetzt. Auch der Einsatz von Peptiden spielt eine immer größere Rolle.^[66]

Nukleinsäuren stellen aufgrund ihrer sehr großen Bedeutung in einer Vielzahl zellulärer Prozesse ein interessantes Ziel dar. Während der Mechanismus bei Unterscheidung verschiedener dsRNAs durch Proteine noch ziemlich unklar ist, ist dieser Vorgang für dsDNA mittlerweile sehr gut untersucht und verstanden. Auch erlaubt die Topologie der B-Helix der dsDNA im Gegensatz zur dsRNA direkte Kontakte zu den Basen, was eine sequenzspezifische Erkennung ermöglicht.^[21] Es ist inzwischen möglich, gezielt sequenzspezifische Liganden für doppelsträngige DNA zu erhalten.^[23,24,67]

1.2.1. Niedermolekulare dsRNA-Liganden

Ein in Medizin und Wissenschaft häufig verwendetes Prinzip zur Bindung an Nukleinsäuredoppelstränge ist die Interkalation. Dabei lagern sich planare, heteroaromatische polyzyklische Moleküle in der Doppelhelix zwischen benachbarten Basenpaaren ein. Anwendung finden Interkalatoren beispielsweise in der Molekularbiologie in Form von Ethidiumbromid zum Anfärben von Nukleinsäuren oder in der Medizin als Zytostatika, die die Replikation und Transkription der DNA unterbinden. Allerdings haben sie eine, wenn überhaupt, sehr geringe Selektivität für DNA oder RNA.^[68]

Eine Möglichkeit, Interkalatoren selektiver zu machen, ist die Funktionalisierung bzw. Modifizierung mit Gruppen, die zwischen dsRNA und dsDNA oder bestimmten Sequenzen

unterscheiden können. Für dsDNA wurde das zum Beispiel anhand des natürlichen Antibiotikums Actinomycin D gezeigt. Dabei handelt es sich bei der interkalierenden Einheit um ein Phenoxazin-Derivat, an das zwei Zyklopeptide gebunden sind, welche in der kleinen Furche der dsDNA liegen und so eine Sequenzspezifität bewirken.^[69,70]

Es sind auch einige Beispiele für funktionalisierte Interkalatoren beschrieben, die selektiv dsRNA erkennen. Eine Möglichkeit ist die Modifikation mit verschiedenen Nukleobasen, welche z.B. komplementär an Ausstülpungen oder andere einzelsträngige Bereiche binden können.^[71] Auch die Modifikation mit Aminosäuren wie Argininseitenketten^[72] oder Aminoglykosiden wie Neomycin^[73] wurde beschrieben.

Ein weiterer Ansatz sind die sogenannten *threading* Interkalatoren. Diese winden sich durch den Doppelstrang und binden mit ihren Substituenten in beiden Furchen der Doppelhelix.^[74-76] Die Substrate dieser Substanzklasse müssen eine relativ labile Basenpaarung aufweisen, wie es beispielsweise in der Nähe von Fehlpaarungen und Ausstülpungen der Fall ist. Beispiele für dsRNA-bindende *threading* Interkalatoren sind substituierte 2-Arylchinoline^[77], Amsacrin-4-carboxamid-Derivate^[78], Diphenylfuran-Derivate^[79] oder Peptid-Acridin-Konjugate^[16].

Eine andere Klasse dsRNA-bindender Moleküle sind Aminoglykosid-Antibiotika.^[80,81] Dabei handelt es sich um Oligosaccharide, die eine oder mehrere Aminogruppen tragen. Sie binden an die Aminoacyl-tRNA-kodierende Seite von prokaryotischer rRNA und unterbinden so den Translationsprozess.^[82,83] Vicens *et al.* haben Kristallstrukturen der drei Aminoglykoside Paromomycin, Tobramycin und Geneticin jeweils im Komplex mit doppelsträngiger Modell-RNA, die die Minimalstruktur der rRNA-Bindungstasche enthält, veröffentlicht^[84-86], welche tiefere Einblicke in den Bindungsmechanismus geben^[80].

1.2.2. Peptidmimetika

Der Übergang zwischen der Verbindungsklasse der Peptide und der der Proteine ist fließend. Sie unterscheiden sich nur in der Länge ihrer Aminosäuresequenz. Aufgrund ihrer zum Teil sehr hohen Spezifität gegenüber Sekundär- und Tertiärstrukturmerkmalen ihrer Substrate sind Proteine prädestinierte Vorlagen zur Entwicklung selektiv wirkender, niedermolekularer Substanzen. Als Pharmazeutika selbst sind sie aber eher ungeeignet, da sie unter anderem

- ab einer Größe von etwa 60 Aminosäuren in der Regel gentechnisch hergestellt werden müssen, was einen relativ hohen Arbeits- und Kostenaufwand bei geringen Ausbeuten bedeutet,

- sowohl hinsichtlich ihrer Lagerstabilität, als auch ihres Löslichkeitsverhaltens oft sehr problematisch sind,
- unter Umständen eine geringe Membranpermeabilität, einhergehend mit einer geringen Bioverfügbarkeit aufweisen können,
- aufgrund proteolytischer Degradation eine geringe metabolische Stabilität haben.

Ein Ansatz diese Nachteile zu umgehen ist die Entwicklung von Peptidmimetika. Diese sind in der Literatur definiert als *Substanzen, die als Ligand oder Rezeptor den biologischen Effekt eines Peptids oder Proteins auf Rezeptor-Niveau imitieren oder blockieren können*^[87] bzw. als *Substanz, die sowohl Sekundärstruktur als auch andere strukturelle Eigenschaften des Original Peptids/Proteins hat, was es ihr erlaubt, das Original Peptid/Protein an Rezeptoren oder Enzymen zu ersetzen*^[88]. Es handelt sich hierbei also prinzipiell um die nicht-peptidische Nachbildungen biologisch aktiver Substrukturen von Proteinen.

Peptidmimetika gewinnen immer mehr an Bedeutung im biologisch-chemischen und pharmazeutischen Bereich. Dabei sind sie neben der Anwendung als Wirkstoffe auch in wissenschaftlicher Hinsicht interessant, beispielsweise bei der Aufklärung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Oft ist es nicht möglich, Komplexstrukturen von Proteinen zu kristallisieren oder NMR-spektroskopisch auszuwerten. Mit Hilfe kleinerer Konstrukte kann das mitunter gelingen. Dadurch können Hinweise auf Bindungs- oder Reaktionsmodi erhalten werden.

Als pharmakologische Wirkstoffe bieten Peptidmimetika gegenüber den physiologisch aktiven Proteinen interessante Vorteile, wie zum Beispiel die Verstärkung der Wirksamkeit, die Erhöhung der Selektivität zur Verminderung von Nebenwirkungen, die Schaffung oraler Bioverfügbarkeit oder die Verlängerung der Wirkungsdauer durch Reduktion des enzymatischen Abbaus im Organismus.^[87-91] Bei der Entwicklung solcher Peptidmimetika werden in der Regel zunächst mit Hilfe computergestützter Methoden und Strukturinformationen aus Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie Leitstrukturen entwickelt. Da Peptidmimetika üblicherweise chemisch synthetisiert werden, ergibt sich eine enorme strukturelle Vielfalt. Neben dem Einbau unnatürlicher Aminosäurederivate bei der automatisierten Festphasenpeptidsynthese, von denen bereits viele kommerziell erhältlich sind, sind die verschiedensten Modifikationen denkbar (s.u.). Nach Evaluation der ersten synthetisierten Leitstrukturen können diese sukzessive sowohl hinsichtlich ihrer Bindungs-, als auch sonstiger Wirkstoffeigenschaften optimiert werden. Beispiele für bereits als Arzneimittel eingesetzte Peptidmimetika sind der ACE-Hemmer Captopril^[92] oder der HIV-Proteaseinhibitor Saquinavir^[93].

Die Möglichkeiten zur Modifizierung der Peptidstruktur sind, wie schon gesagt, sehr vielfältig und können von leichten Veränderungen der Ausgangsstruktur bis hin zum reinen

Nichtpeptid reichen. Ein klassischer Ansatz ist die Modifikation der Seitenkette, angefangen beim Austausch von L- gegen D-Aminosäuren. Im Rahmen der synthetisch-chemischen Möglichkeiten sind der Phantasie hier nahezu keine Grenzen gesetzt. Ein Beispiel für eine simple Modifikation mit weitreichenden Auswirkungen ist die Methylierung von Tyrosin an der β , 2' und 6' Position, was zur Einschränkung der Rotation um die C^β - C^γ -Bindung führt und damit zur Begünstigung bioaktiver Konformationen beitragen kann.^[94] Auch das Peptidrückgrat selbst kann modifiziert werden. Dabei können entweder zusätzliche Gruppen zur Kettenverlängerung eingeführt werden, wie das z.B. bei β -Aminosäuren der Fall ist, oder die einzelnen Kettenglieder (NH, CH, CO) durch andere Funktionalitäten wie beispielsweise O, N, CS, S, BH, SO, SO₂ etc. ersetzt werden.

Eine weitere Möglichkeit ist die Darstellung zyklischer Peptide, wobei die Überbrückung sowohl innerhalb eines Aminosäurerestes vorliegen als auch mehrere Aminosäuren umfassen kann. Hier wiederum ergeben sich drei weitere Möglichkeiten: die Zyklisierung kann von Rückgrat zu Rückgrat, vom Rückgrat zur Seitenkette oder von der Seitenkette zur Seitenkette (*side chain-to-side chain*) erfolgen. Zyklische Peptide sind auch in der Natur weit verbreitet. Sie wurden unter anderem in Pflanzen, Pilzen^[95], einfachen marinen Lebewesen, wie z.B. Schwämmen, sowie Bakterien gefunden^[96,97]. Der Vorteil zyklischer Peptide liegt zum einen in der, verglichen zu ihren linearen Analoga, höheren metabolischen Stabilität, da sie für proteolytische Degradation weniger anfällig sind. Dadurch lässt sich im pharmazeutischen Einsatz eine längere Wirkungsdauer erzielen. Zum anderen sind sie durch die konformationelle Rigidität weniger flexibel, was zu einer erhöhten Bindungsaffinität und Rezeptorselektivität führen kann. Außerdem wird eine erhöhte Membranpermeabilität diskutiert.^[98] Um bioaktive Sekundärstrukturen wie α -Helices, β -Faltblätter oder *turns* zu stabilisieren, können bestimmte Aminosäuresequenzen oder auch nicht proteinogene Gruppen in das Peptidmimetikum eingeführt werden. Beispiele dafür sind die α -Helix-Induktoren vom Typ zyklischer Hydrazide^[88] oder die kovalente Verknüpfung von Aminosäureresten zur Stabilisierung der helikalen Konformation^[99].