

Diels-Alderasen

Katalytische Ribonukleinsäuren

RICHARD WOMBACHER UND ANDRES JÄSCHKE
INSTITUT FÜR PHARMAZIE UND MOLEKULARE BIOTECHNOLOGIE,
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT, HEIDELBERG

Die Katalyse von chemischen Reaktionen ist eine der anspruchsvollsten Aufgaben, die Biopolymere zu erfüllen haben. Ribozyme können ein Spektrum an Reaktionen beschleunigen, das weit über die Spaltung von RNA-Strängen hinausreicht. Aktuelle Struktur-Funktions-Untersuchungen decken bemerkenswerte Parallelen zu Proteinenzymen auf.

Natürliche Ribozyme

Die Existenz katalytischer RNA wurde erstmals 1982 von Cech und Mitarbeitern nachgewiesen^[1]. Sie konnten zeigen, dass dem posttranskriptionalen Spleißen des Gruppe I-Introns aus *Tetrahymena thermophila* ein Selbstspaltungsmechanismus der RNA zugrunde liegt. Zeitgleich entdeckten Altman und Mitarbeiter, dass die Aktivität der bakteriellen Ribonuklease P, bestehend aus RNA- und Proteinuntereinheiten, ausschließlich auf deren RNA-Untereinheit zurückzuführen ist^[2]. Seitdem ist eine große Anzahl weiterer natürlicher Ribozyme entdeckt worden, darunter mehr als 100 weitere Gruppe I-Introns aus verschiedenen Mikroorganismen sowie eine ebenso beachtliche Menge an Gruppe II-Introns (aus mitochondrialen Genen von Pflanzen, Pilzen und Hefen), denen ein anderer Mechanismus der RNA-Spaltung zugrunde liegt. Außerdem gibt es Virus- oder Viroid-Ribozyme wie das Hammerhead Ribozym (aus Pflanzenviroiden), das Hepatitis Delta Virus-Ribozym (HDV), das Hairpin Ribozym (aus Tabak-Virus-Ringspot Satellit) und das *Neurospora Varkud* Satellit Ribozym. Das wohl eindrucksvollste Beispiel der Ribozymkatalyse ist das zu 1/3 aus Protein- und zu 2/3 aus rRNA-Anteilen bestehende Ribosom, für das kristallographische und mechanistische Untersuchungen eine maßgebliche Rolle der RNA für die Peptidyltransferaseaktivität nahe legen^[3].

Artifizielle Ribozyme

Die relativ bescheidene Reaktionsvielfalt der natürlichen Ribozyme warf Fragen auf, die sowohl für Erforschung noch unbekannter RNA-Funktionen als auch im Kontext der

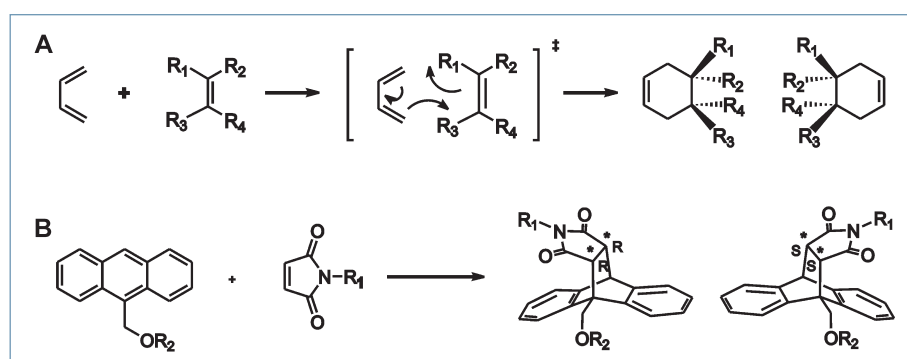
„RNA-Welt“-Hypothese zum Ursprung des Lebens von großer Bedeutung sind: Ist RNA auch in der Lage, weitere, potentiell metabolisch relevante Reaktionen zu katalysieren? Kann Sie – wie Proteinenzyme – Reaktionen zwischen kleinen organischen Substratmolekülen selektiv beschleunigen? Welche strukturellen Voraussetzungen müssen hierfür gegeben sein? Zur Beantwortung dieser Fragen erwiesen sich Techniken der *in vitro* Selektion und Evolution als hilfreich. Hierbei handelt es sich um kombinatorische Strategien, die aus großen synthetischen Nukleinsäurebibliotheken iterativ bestimmten Selektionskriterien (z.B. Beschleunigung einer Reaktion) genügende Subbibliotheken anreichern und dann vervielfältigen. In den letzten 15 Jahren konnte auf diese Weise eine große Anzahl solcher künstlichen Ribozyme selektiert werden, darunter Katalysatoren für

C-C-, C-O-, C-N- und C-S-Bindungsknüpfungen oder -Spaltungen sowie für Redoxreaktionen. Allerdings ist unser Verständnis der Funktionsweise dieser (Bio)Katalysatoren und der zugrunde liegenden strukturellen Prinzipien bisher noch außerordentlich gering.

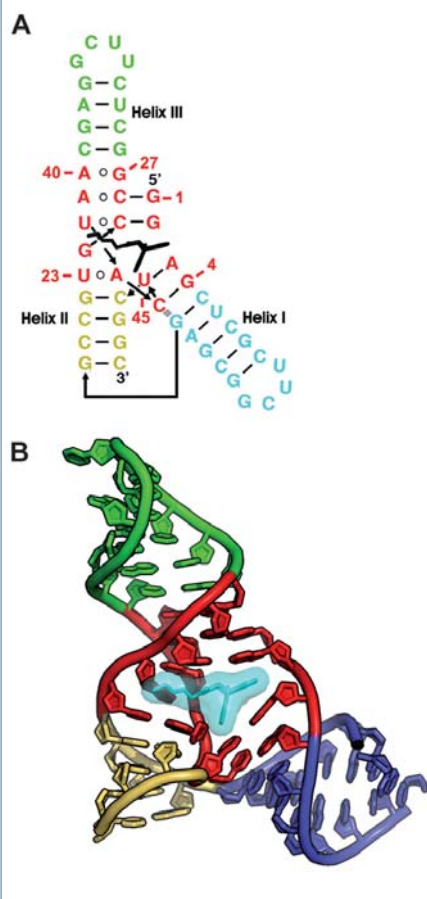
Diels-Alderasen

Die Diels-Alder-Reaktion ist eine der leistungsfähigsten Reaktionen in der organischen Chemie zur Knüpfung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen. Dieser Reaktionstyp einer [4+2]-Cycloaddition zwischen einem (elektronenreichen) Dien und einem (elektronenarmen) Olefin, dem Dienophil, ermöglicht den Aufbau von bis zu vier Stereozentren in einem Reaktionsschritt (**Abb. 1A**). Trotz ihrer Vielseitigkeit spielt diese Reaktion jedoch im Reaktionsrepertoire der Natur kaum eine Rolle. Zwar gibt es Anzeichen für die Wirkung von Diels-Alderase-Enzymen in der Biosynthese von Sekundärmetaboliten, doch ist trotz intensiver Suche bis heute kein Enzym bekannt, welches bewiesenermaßen als Diels-Alderase-Enzym bezeichnet werden kann. Auch für das Enzym Makrophomatsynthese^[4], das als Diels-Alderase-Kandidat gilt, legen moleküldynamische Simulationen einen sequentiellen Michael-Aldol-Reaktionsmechanismus nahe^[5].

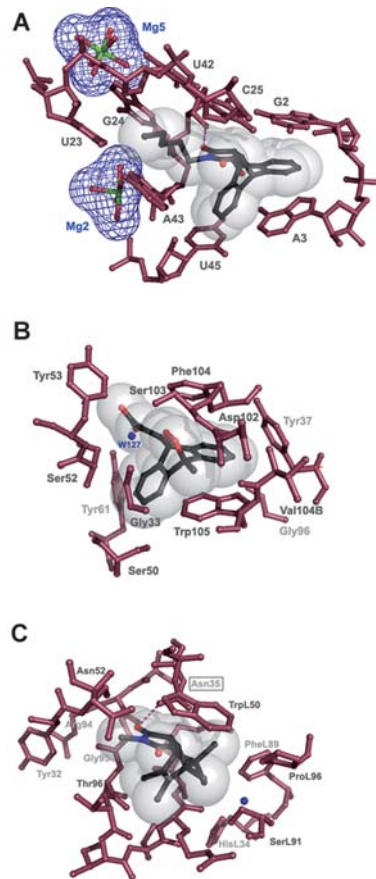
Dass Biopolymere prinzipiell in der Lage sind die Diels-Alder-Reaktion zu katalysie-



▲ **Abb. 1:** A, Die Diels-Alder-Reaktion ist eine [4+2]-Cycloaddition zwischen einem Dien und einem Dienophil, bei der aus drei C-C- π -Bindungen eine C-C- π -Bindung und zwei C-C- σ -Bindungen neu formiert werden. B, In der Reaktion zwischen Anthracen- und Maleimidderivaten wird in der unkatalysierten Reaktion ein racemisches Gemisch aus R, R- und S, S-Stereoisomeren gebildet (R₁; R₂ = verschiedene Substituenten); in der ribozymkatalysierten Reaktion wird enantioselektiv eines der beiden möglichen Stereoisomere gebildet^[9].



▲ **Abb. 2:** A, Tertiärstruktur des Diels-Alderase-Ribozyms in schematischer Darstellung. B, Dreidimensionale Topologie in der Kristallstruktur des Diels-Alderase-Ribozym-Produkt-Komplexes. Helix I (blau), Helix II (gelb), Helix III (grün), in Sekundärstruktur formal ungepaarte Bereiche (rot), Reaktionsprodukt (schwarz)^[10].



▲ **Abb. 3:** Vergleich der katalytischen Zentren von RNA und Proteinen. A, Katalytisches Zentrum des Diels-Alderase-Ribozyms, B, des Retro-Diels-Alderase katalytischen Antikörpers 10F11^[11] und C, des Diels-Alderase Antikörpers 1E9^[12].

ren, konnte erstmals mit katalytischen Antikörpern demonstriert werden, die durch Verwendung von Übergangszustandsanaloga der Diels-Alder-Reaktion als Haptene hergestellt wurden^[6]. Später konnten durch die oben erwähnten *in vitro*-Selektionstechniken auch Ribozyme isoliert werden, die Diels-Alder-Reaktionen katalysieren^[7, 8]. Für das in unserer Arbeitsgruppe isolierte Ribozym konnte demonstriert werden, dass RNA als echter Katalysator eine bimolekulare Reaktion zwischen kleinen organischen Molekülen mit mehrfachem Turnover beschleunigen kann. Das Ribozym setzt Antracen-Diene mit Maleimid-Dienophilen um (**Abb. 1B**), zeigt Michaelis-Menten-Kinetik, katalysiert hochgradig stereoselektiv und besitzt damit wesentliche enzymcharakteristische Eigenschaften^[9]. Kürzlich konnte die Kristallstruktur dieses 49-mer Diels-Alderase-Ribozyms sowohl allein als auch im Komplex mit dem Reaktionsprodukt gelöst werden^[10]. Damit ist erstmals ein detaillierter Einblick in die Wir-

kungsweise eines künstlichen Ribozyms möglich.

Diels-Alderase-Ribozym: Struktur und Mechanismus

Die räumliche Struktur des Ribozyms ähnelt dem griechischen Buchstaben Lambda λ (**Abb. 2**). Drei Helices (blau, gelb und grün dargestellt) sind in einem verschränkten Pseudoknoten miteinander verknüpft, wobei drei separate Sequenzbereiche (rot dargestellt) in komplexer Weise miteinander interagieren, nämlich die Nukleotide 1–4 unmittelbar am 5'-Ende sowie die internen Bereiche 23–27 und 40–45. Das 5'-terminale Tetranukleotid paart mit beiden internen Bereichen und zieht damit die interne Blase reißverschlussartig zusammen. Unter Ausbildung von Basentripeln, nichtkanonischen Basenpaaren und ausgeprägtem Stacking wird eine äußerst kompakte Gesamtstruktur erzeugt, in der sich klar das aktive Zentrum erkennen lässt (**Abb. 2B**). Es ist durch eine

hydrophobe Bindungstasche gekennzeichnet, in der das co-kristallisierte Diels-Alder-Produkt passgenau gebunden ist. Diese präformierte Tasche wird durch das Watson-Crick-Basenpaar A3-U45, das Reverse-Hoogsteen-Paar U23•A43 und das Basentripel U42•(C25-G2) umrahmt. Dabei bilden die Pyrimidinbase U45 und die Purinbasen A3 und G2 ideale Plattformen, um über Stackingwechselwirkungen das Anthracensubstrat zu binden. Die Base C25 ist so im aktiven Zentrum positioniert, dass die Bindung des 5-Ringes des Maleimids ausschließlich die Bildung eines der beiden Produktsomere ermöglicht (**Abb. 3A**). Diese Strukturinformationen sowie biochemische Daten deuten darauf hin, dass für die Katalyse der Reaktion zwei Effekte von wesentlicher Bedeutung sind: die Erhöhung der lokalen Konzentration und präzise Positionierung der Substrate im aktiven Zentrum einerseits und die Stabilisierung des Übergangszustandes gegenüber den Edukten durch eine exakt formkomplementäre Tasche.

Besonders interessant ist nun der Vergleich mit bekannten Strukturen der katalytischen Antikörper für die Diels-Alder-Reaktion (**Abb. 3B, C**)^[11, 12]. Auch hier zeigen die Strukturen präformierte hydrophobe Bindungstaschen mit hoher Formkomplementarität zu den Übergangszuständen. Erstaunlicherweise weist der katalytische Antikörper 10F11 einer Retro-Diels-Alder-Reaktion, der ebenso ein Anthracenderivat als Substrat hat, auch im Detail eine große Ähnlichkeit zum Diels-Alderase-Ribozym auf (**Abb. 3B**)^[11]. Hier liegt ein Tryptophanrest in identischer Position wie das A3 des Ribozyms und ist ebenso entscheidend für die Bindung des Anthracens (Vergleich **Abb. 3A, B**). Für das Maleimidsubstrat lässt sich aus der Kristallstruktur des Ribozyms eine Wasserstoffbrückenbindung im aktiven Zentrum ableiten, die einen elektronenziehenden und damit reaktionsbeschleunigenden Einfluss auf die Reaktion ausüben könnte. Einen solchen Mechanismus zur Beschleunigung der Reaktion beobachtet man für den Diels-Alderase Antikörper 1E9 in einer ähnlichen Position (**Abb. 3A, C**)^[12]. Diese starken strukturellen Analogien zwischen katalytischen Antikörpern und Ribozym lassen vermuten, dass der Katalyse auch sehr ähnliche Reaktionsmechanismen zugrunde liegen. Obwohl RNA verglichen mit Proteinen ein geringeres Arsenal an funktionellen Gruppen besitzt, kann sie offenbar Strukturen aufbauen, die die Knüpfung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen mit vergleichbarer Effi-

zienz und Selektivität wie Proteine beschleunigen. Aktuelle Forschungsprojekte untersuchen daher, ob sich unter den zahlreichen nichtcodierenden RNAs mit unbekannter Funktion auch solche befinden, die ähnliche Aufgaben in einem biologisch relevanten Kontext erfüllen. ■

Danksagung

Unsere Arbeiten werden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem BMBF, dem Fonds der Chemischen Industrie und dem Human Frontier Science Program gefördert.

Literatur

- [1] Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E., Cech, T. R. (1982): Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* 31: 147-57.
- [2] Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., Altman, S. (1983): The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35: 849-57.
- [3] Moore, P. B., Steitz, T. A. (2002): The involvement of RNA in ribosome function. *Nature* 418: 229-35.

- [4] Ose, T., Watanabe, K., Mie, T., Honma, M., Watanabe, H., Yao, M., Oikawa, H., Tanaka, I. (2003): Insight into a natural Diels-Alder reaction from the structure of macrophomate synthase. *Nature* 422: 185-9.
- [5] Guimaraes, C. R., Udier-Blagovic, M., Jorgensen, W. L. (2005): Macrophomate synthase: QM/MM simulations address the Diels-Alder versus Michael-Aldol reaction mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 3577-88.
- [6] Hilvert, D., Hill, K. W., Nared, K. D., Auditor, M. T. M. (1989): Antibody catalysis of the Diels-Alder reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 111: 9261-2.
- [7] Seelig, B., Jäschke, A. (1999): A small catalytic RNA motif with Diels-Alderase activity. *Chem. Biol.* 6: 167-76.
- [8] Tarasow, T. M., Tarasow, S. L., Eaton, B. E. (1997): RNA-catalysed carbon-carbon bond formation. *Nature* 389: 54-7.
- [9] Seelig, B., Keiper, S., Stuhlmann, F., Jäschke, A. (2000): Enantioselective Ribozyme Catalysis of a Bimolecular Cycloaddition Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 39: 4576-4579.
- [10] Serganov, A., Keiper, S., Malinina, L., Tereshko, V., Skripkin, E., Höbartner, C., Polonskaia, A., Phan, A. T., Wombacher, R., Micura, R., Dauter, Z., Jäschke, A., Patel, D. J. (2005): Structural basis for Diels-Alder ribozyme-catalyzed carbon-carbon bond formation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12: 218-24.
- [11] Hugot, M., Bensele, N., Vogel, M., Reymond, M. T., Stadler, B., Reymond, J. L., Baumann, U. (2002): A structural basis for the activity of retro-Diels-Alder catalytic antibodies: evidence for a catalytic aromatic residue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99: 9674-8.
- [12] Xu, J., Deng, Q., Chen, J., Houk, K. N., Bartek, J., Hilvert, D., Wilson, I. A. (1999): Evolution of shape complementarity and catalytic efficiency from a primordial antibody template. *Science* 286: 2345-8.



Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Andres Jäschke¹

Dr. Richard Wombacher²

Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 364

D-69120 Heidelberg

Tel.: 06221-544851

Fax: 06221-546430

jaeschke@uni-hd.de