



Volker A. Erdmann

Die Bedeutung der RNA-Technologien für die Biotechnologie und Medizin

(Vortrag in der gemeinsamen Sitzung der mathematisch-naturwissenschaftlichen und der biowissenschaftlich-medizinischen Klasse am 6. Mai 1994)

In: Berichte und Abhandlungen / Berlin-Brandenburgische Akademie der Wissenschaften (vormals Preußische Akademie der Wissenschaften) ; 1.1995, S. 41-53

Persistent Identifier: [urn:nbn:de:kobv:b4-opus-28461](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:b4-opus-28461)

Die vorliegende Datei wird Ihnen von der Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften unter einer Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Germany (cc by-nc-sa 3.0) Licence zur Verfügung gestellt.



Volker A. Erdmann

Die Bedeutung der RNA-Technologien für die Biotechnologie und Medizin¹

*(Vortrag in der gemeinsamen Sitzung der mathematisch-naturwissenschaftlichen
und der biowissenschaftlich-medizinischen Klasse am 6. Mai 1994)*

In jüngster Zeit hat sich in der Biochemie ein neues Forschungsgebiet entwickelt, das als RNA-Technologien bezeichnet wird. Diese Technologien beruhen auf den inhärenten Eigenschaften der Ribonukleinsäuren (RNA), die in großer struktureller und funktioneller Vielfalt in den lebenden Zellen auftreten. In diesem Artikel soll der derzeitige Stand der Forschung und der zukünftige Einfluß der RNA-Technologien in den Bereichen der Biochemie, Molekularbiologie, Medizin und Biotechnologie aufgezeigt werden.

Einführung in die Genexpression

Die lebende Zelle zeichnet sich dadurch aus, daß sie nach ihrer Teilung den Tochterzellen identische Erbinformationen zukommen läßt. Diese Erbinformationen befinden sich, verschlüsselt als genetischer Code, in den Chromosomen. Die Chromosomen bestehen im wesentlichen aus der DNA (Desoxyribonukleinsäure), deren Struktur sich aus den vier Bausteinen (Nukleotide) zusammensetzt, die in der Kurzschreibweise mit A, C, G und T bezeichnet werden. Bei den DNA-Molekülen handelt es sich um äußerst große doppelsträngige Moleküle, bei denen sich zwei komplementäre Stränge zu der sogenannten Doppelhelix paaren. Die Ausbildung der Doppelhelix-Struktur wird dadurch ermöglicht, daß die Nukleotide A mit T und C mit G Basenpaarungen eingehen können.

In Abb.1 ist ein Ausschnitt eines doppelsträngigen DNA-Moleküls wiedergegeben, das zum Beispiel in Bakterien aus 4.000.000 und beim Menschen aus 2.900.000.000 Basenpaaren besteht. Diese große Anzahl an Basenpaaren ist er-

¹ Die vorliegende Arbeit ist den Kollegen Prof. Dr. Helga Kersten und Prof. Dr. Walter Kersten (beide Universität Erlangen) gewidmet, die in diesem Jahr emeritiert werden.

forderlich, da auf den Chromosomen u. a. die genetischen Informationen aller Proteine der Zelle verankert sind.

Die Proteine, auch Eiweiße genannt, übernehmen vielfältige Aufgaben in den Zellen. Hierzu gehören u. a. katalytische, regulatorische und strukturelle Funktionen. Von den Bausteinen der Proteine existieren 20 verschiedene Formen, die als Aminosäuren bezeichnet werden. Im Durchschnitt bilden 200 Aminosäuren ein Protein. Bakterienzellen enthalten ca. 5.000 verschiedene Proteine, eine menschliche Zelle bis zu 50.000. Somit reflektiert die Chromosomengröße der verschiedenen Lebewesen die Anzahl der in den Zellen befindlichen Proteine.

Die Frage ergibt sich nun, wie die Information für die Sequenz der Aminosäuren der Proteine in den Chromosomen verankert sein kann, wenn die DNA nur aus vier verschiedenen Bausteinen besteht. Die Natur hat dieses Problem in der Hinsicht gelöst, daß es jeweils drei der vier Bausteine zu einem Dreier-Code (Triplet) zusammengefaßt hat. Ein Triplet in der DNA repräsentiert letztendlich die Information für eine Aminosäure in einem Protein. Die Entwicklung des Dreier-Codes bedeutet, daß theoretisch 64 Triplets ($4 \times 4 \times 4$) möglich sind, also bedeutend mehr, als für die 20 verschiedenen Aminosäuren erforderlich wären. Ein genetischer Code aus zwei Nukleotiden wäre allerdings nicht ausreichend, da in diesem Fall nur 16 (4×4) Kombinationsmöglichkeiten bestehen würden.

Bei der Genexpression spricht man im wesentlichen von drei Phasen: 1. die Replikations-, 2. die Transkriptions- und 3. die Translationsphase. Diese Phasen der Genexpression sind in Abb. 1 schematisch dargestellt.

Die Replikationsphase ist für eine Zelle dann von Bedeutung, wenn sich diese teilen möchte, da nach der Teilung die jeweiligen Tochterzellen ebenfalls mit dem identischen Erbgut ausgerüstet sein sollten. Im wesentlichen verläuft die Replikation so, daß mit Hilfe von Proteinen die DNA-Stränge voneinander getrennt werden, und daß komplementär zu den beiden getrennten Strängen jeweils ein neuer Strang aufgebaut wird. Hierzu werden die Nukleotide der DNA durch Proteine (DNA-Polymerasen) kovalent miteinander verknüpft.

Die Basenpaarungsmöglichkeiten der Nukleotide spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Befindet sich zum Beispiel auf dem DNA-Strang in einer bestimmten Position ein G, so wird auf dem neuen Strang, also direkt gegenüber, ein C eingebaut. In dem Fall, daß sich auf dem getrennten Strang ein T befinden würde, müßte auf dem neuen Strang ein A eingebaut werden.

In der Transkriptionsphase wird die DNA wiederum teilweise aufgeschmolzen, um die komplementäre Synthese von RNA-Molekülen zu ermöglichen. Dies geschieht in ähnlicher Weise wie bei der DNA-Synthese, außer daß hierbei durch RNA-Polymerasen die Bausteine der RNA miteinander verbunden werden. Auf jeden Fall stellt das synthetisierte RNA-Molekül eine komplementäre Sequenz zu der DNA dar, so daß auch auf dieser die genetische Information verankert ist. Die

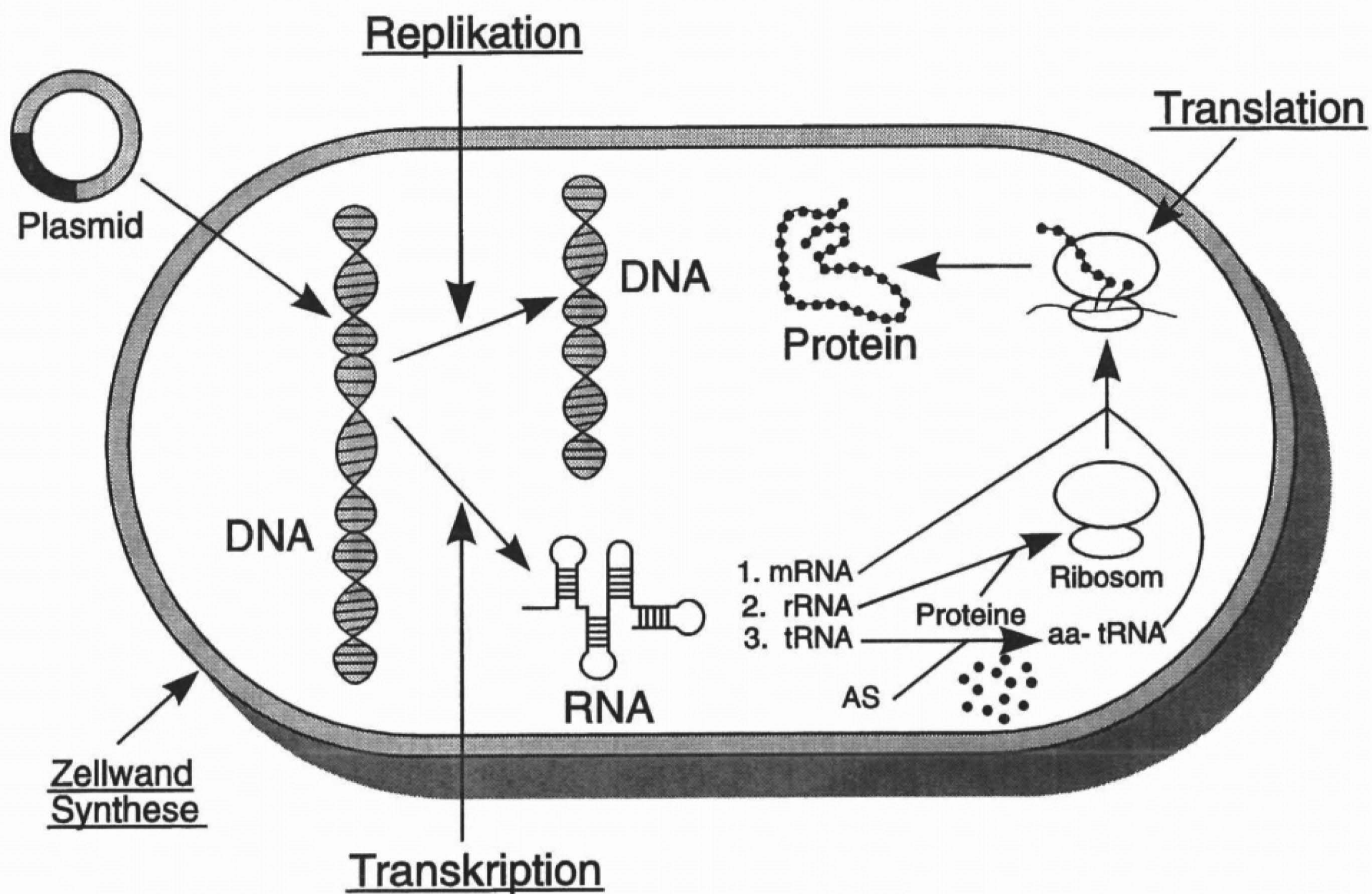


Abb. 1

Schematische Darstellung der Genexpression in einer Bakterienzelle. Bei der Genexpression dient die DNA als Informationsträger. Im Verlauf einer Zellteilung wird die DNA in der Replikation verdoppelt, so daß die Tochterzellen mit identischer Erbinformation ausgerüstet werden. In der Transkriptionsphase werden die auf der DNA befindlichen Gene (nach den Regeln des genetischen Codes verschlüsselte Informationen für die Proteine) zunächst in mRNAs übersetzt. Die mRNAs werden dann an den Ribosomen (Eiweißfabriken der Zelle) in der Translationsphase in Proteine übersetzt. In der Translationsphase spielen u. a. auch die tRNA-Moleküle eine wichtige Rolle, da diese die 20 verschiedenen Bausteine der Proteine (Aminosäuren) an das Ribosom heran führen. Weitere Einzelheiten sind im Text beschrieben.

RNA-Moleküle unterscheiden sich nur geringfügig in ihren Bausteinen von denen der DNA-Moleküle. Die Unterschiede bestehen lediglich in der Struktur der Zuckerreste, die ein Bestandteil aller Nukleotide sind. Die RNA-Bausteine werden mit A, C, G und U bezeichnet, und sie können in Analogie zu der DNA auch Basenpaare bilden. Hierbei tritt das A mit dem U und das C mit dem G in Wechselwirkung. Im Gegensatz zu der DNA besteht die RNA nicht zu 100% aus basengepaarten Bereichen. Die beobachteten dreidimensionalen Strukturen der RNA-Moleküle enthalten nur teilweise doppelhelikale Strukturen, die durch einzelsträngige Bereiche (siehe Abb. 1 und 3) bzw. Schleifenstrukturen unterbrochen sind. Es ist also festzustellen, daß die strukturelle Vielfalt der RNA-Moleküle dadurch bedeutend größer ist als die der DNA.

Die synthetisierten RNA-Moleküle sind in ihrer strukturellen und funktionellen Vielfalt sehr groß. So wird für die Synthese jedes einzelnen Proteins eine besondere RNA (Boten-RNA = mRNA) benötigt, d. h. also, daß eine menschliche Zelle 50.000 verschiedene mRNAs besitzt. Darüber hinaus sind eine Reihe weiterer RNA-Spezies bekannt, wie z. B. Transfer-RNAs (tRNAs) und die ribosomalen RNAs (rRNAs, Bestandteile der Ribosomen), die alle gemeinsam mit den mRNAs in der Translationsphase eine entscheidende Rolle spielen.

Bei der Translationsphase werden die mRNAs, die in Form der oben erwähnten Triplets unterteilt sind, mit Hilfe der Ribosomen (Eiweißfabriken der Zellen) in Proteine übersetzt (Abb. 1). So codiert z. B. die Dreiersequenz AAA für die Aminosäure Lysin und UGG für die Aminosäure Tryptophan. Die Translation der mRNA in ein Protein erfordert, daß sich diese mRNA an ein Ribosom anlagert. Die Ribosomen repräsentieren sehr kompliziert aufgebaute RNA-Proteinkomplexe, die schon bei den Bakterien aus drei verschiedenen ribosomalen RNA-Molekülen und 54 verschiedenen Proteinen bestehen. Nach Anlagerung der mRNA an das Ribosom werden für die Translation in ein Protein sogenannte tRNA-Moleküle benötigt. Für jede Aminosäure existiert in der Zelle mindestens eine spezifische tRNA, an die die Aminosäure mit Hilfe von Enzymen (Proteine) gebunden wird. Diese spezifische tRNA kann nun mit einer Schleifenstruktur, die eine Anticodonsequenz (ebenfalls ein Triplet) enthält, durch Basenpaarung mit der Dreiersequenz der mRNA in Wechselwirkung treten. Durch diese Wechselwirkung wird garantiert, daß eine spezifische tRNA mit ihrer Aminosäure zu einem bestimmten Zeitpunkt am Ribosom gebunden wird. Dem Ribosom obliegt nun die Aufgabe, die nacheinander deponierten Aminosäuren kovalent zu einem Protein zu verknüpfen. Da auf der mRNA nicht nur die Informationen für die erforderlichen Aminosäuren codiert sind, sondern darüber hinaus den Ribosomen mitgeteilt werden muß, wo auf der mRNA die Start- und Endpunkte der Information liegen, ist der Translationsprozeß äußerst kompliziert. Man geht davon aus, daß insgesamt mehr als 200 verschiedene Moleküle an diesem Prozeß beteiligt sind.

RNA-Technologien

Wie aus der einführenden Beschreibung der Genexpression hervor geht, spielen die RNA-Moleküle bei diesen Prozessen vielseitige Rollen. Es überrascht daher nicht, daß für diese Moleküle eine äußerst große Strukturvielfalt gegeben sein muß. Mit den RNA-Technologien soll nun das strukturelle und funktionelle Potential der RNA-Moleküle für biochemische, medizinische und biotechnologische Zwecke genutzt werden. Um diese hochgesteckten Ziele zu erreichen, müssen allerdings eine Reihe von Voraussetzungen geschaffen werden, die in Abb. 2 zusammengefaßt sind.

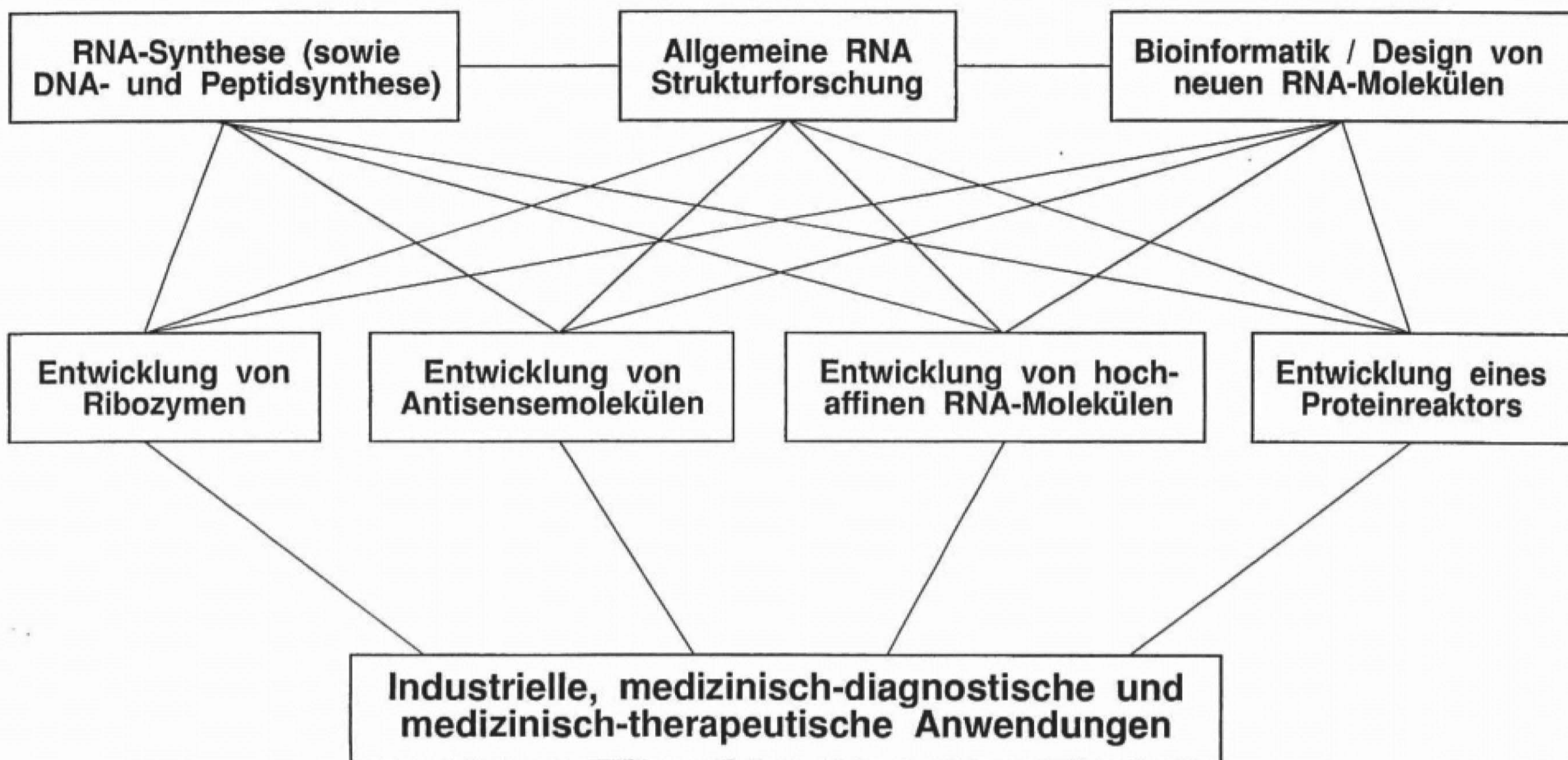


Abb. 2

Wissenschaftliche Voraussetzungen und Ziele der RNA-Technologien.
 Weitere Einzelheiten siehe Text.

Voraussetzungen für die Etablierung der RNA-Technologien

Die Grundlagen der RNA-Technologien beinhalten zunächst einmal die Möglichkeiten, RNA-Moleküle mit den gewünschten Sequenzen chemisch oder biochemisch herzustellen.

Die Methode der biochemischen Synthese ist bereits recht ausgereift und beruht darauf, daß mit Hilfe von RNA-Polymerasen DNA-Moleküle in RNA-Moleküle transkribiert werden. Diese Methode eignet sich besonders für die Synthese größerer RNA-Moleküle mit Kettenlängen von zirka 100 bis 3.000 Nukleotiden. Für kürzere RNA-Moleküle ist diese Methode nicht geeignet. Darüber hinaus ist es unmöglich, mit der enzymatischen RNA-Synthese Moleküle zu erstellen, die in bestimmten Positionen modifizierte Nukleotide enthalten.

Eine Ergänzung bzw. eine Erweiterung der RNA-Synthesemöglichkeiten ist durch die chemische Synthese gegeben, die wir in den letzten Jahren in unserem Labor entwickelt haben. Die hierfür notwendige Chemie ist kompliziert und recht aufwendig, da zunächst die verschiedenen funktionellen Gruppen in den Nukleotiden mit Schutzgruppen versehen werden müssen, um letztendlich die gewünschten spezifischen Verknüpfungen zwischen den Nukleotiden bei der RNA-Synthese zu gewährleisten. Diese Arbeiten werden routinemäßig in unserem Labor durchgeführt und erfordern ein wasserfreies Arbeiten.

Nachdem die geschützten Nukleotide (Synthone) hergestellt sind, können diese in einem computergesteuerten Syntheseautomaten für die RNA-Synthese eingesetzt

werden. Aufgrund der Tatsache, daß die Ankopplung einzelner Synthone mit einer Ausbeute von ca. 99% verläuft, können mit der chemischen RNA-Synthese nur Moleküle mit begrenzter Länge erstellt werden. Die obere Grenze liegt hier bei einer Kettenlänge von 100 Nukleotiden. Neben den herkömmlichen vier Bausteinen der RNA haben wir in unserem Labor zusätzlich über 30 verschiedene modifizierte Bausteine synthetisiert, die wir gezielt in bestimmten Positionen der RNA-Moleküle einbauen können. Die modifizierten Bausteine eignen sich zum Beispiel für chemische Vernetzungsreaktionen des RNA-Moleküls mit anderen Molekülpartnern, oder als fluoreszierendes Signal, wenn das RNA-Molekül mit anderen Partnern eine Wechselwirkung eingeht.

Langfristig möchte man natürlich mit Hilfe von Computern die Eigenschaften und Strukturen von RNA-Molekülen voraussagen, d. h. ein Design dieser Moleküle durchführen. Von diesem Ziel ist man allerdings noch sehr weit entfernt, da die dreidimensionalen Strukturen der RNA-Moleküle sehr kompliziert aufgebaut sind und bisher nur sehr wenige RNA-Moleküle in ihrer atomaren Struktur bestimmt wurden. Die Bioinformatik benötigt aber umfangreiche Strukturinformationen, um die Regeln der RNA-Faltungen und Strukturausrichtungen zu erlernen. Erst wenn all diese Regeln im einzelnen bekannt sind, kann mit dem sinnvollen Design von RNA-Molekülen begonnen werden. Somit wird derzeit intensiv an der Strukturcharakterisierung von RNA-Molekülen gearbeitet.

Für die atomare Strukturbestimmung von RNA-Molekülen stehen zur Zeit mit der NMR-Spektroskopie und der Röntgenstrukturanalyse zwei Methoden zur Verfügung, deren Einsatz allerdings an bestimmte Voraussetzungen geknüpft ist. So dürfen z. B. die Molekulargewichte der RNA-Moleküle bei der NMR-Spektroskopie 25.000 Dalton, d. h. die Größe eines tRNA-Moleküls (75 Nukleotide), nicht überschreiten. Darüber hinaus müssen die Nukleotide in diesen Molekülen in bestimmten Positionen isotopenmarkiert sein. Dies sind zur Zeit Voraussetzungen, die nur äußerst schwierig zu erfüllen sind.

Die Röntgenstrukturanalyse setzt dagegen voraus, daß sich die RNA-Moleküle in einem Kristall in einem geordneten Zustand befinden. Da die Kristallisation von biologischen Makromolekülen von über 20 verschiedenen Parametern abhängt (Temperatur, Lösungsmittel, Strukturform des zu kristallisierenden Materials usw.), ist diese Methode mit erheblichem experimentellen Aufwand verbunden. Zusätzlich steigen die Schwierigkeiten der Kristallisation von RNA-Molekülen überproportional mit der molekularen Größe dieser Moleküle. Dies hat dazu geführt, daß wir in unserem Labor mit der Methode der chemischen RNA-Synthese nicht ganze RNA-Moleküle synthetisieren, sondern Domänen (Abb. 3). Hier besteht die Hoffnung, daß wir letztendlich aus den Strukturen der Domänen eines RNA-Moleküls die gesamte Struktur ermitteln können.

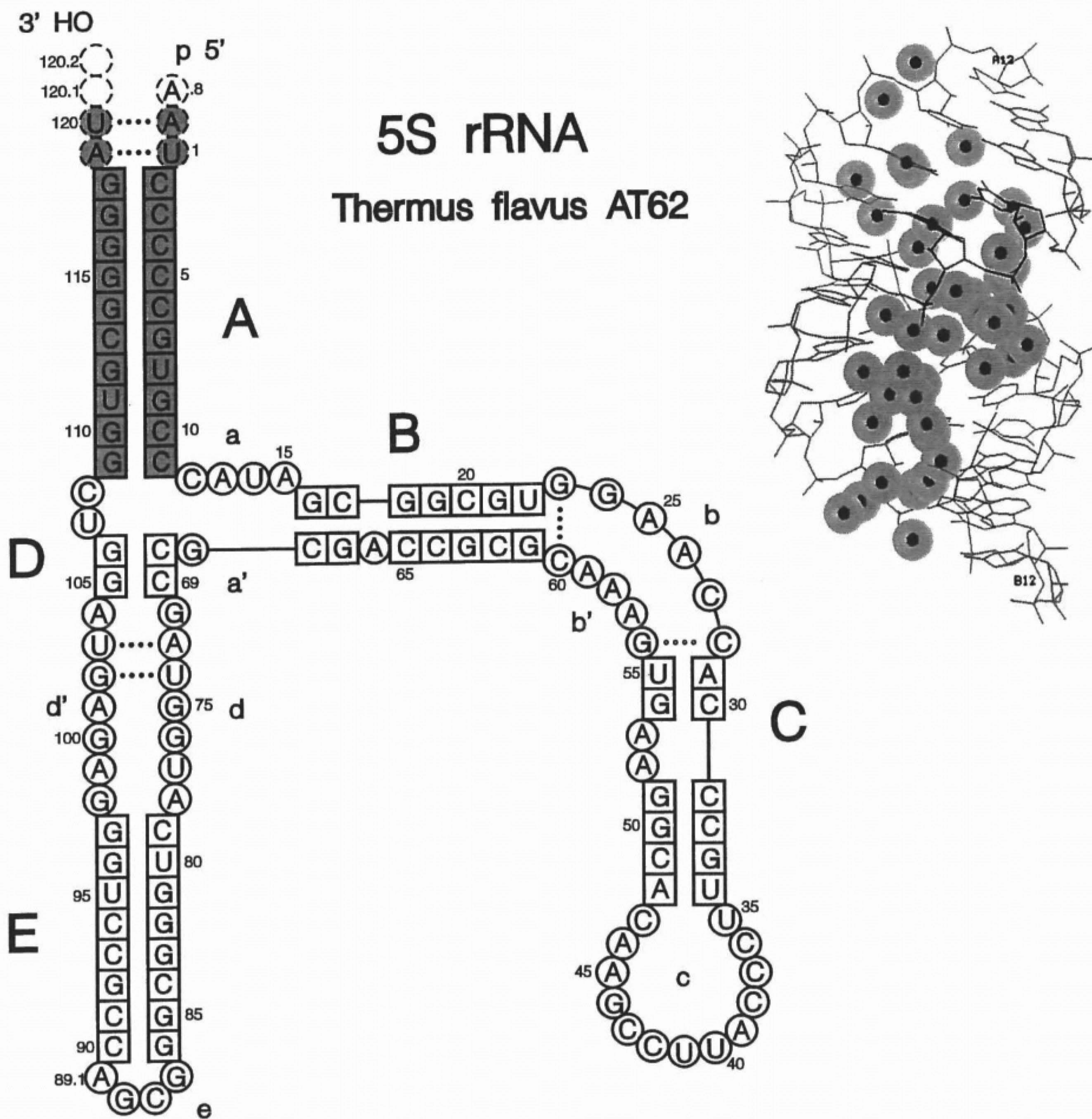


Abb. 3

Die Abbildung zeigt auf der linken Seite eine zweidimensionale Struktur eines RNA-Moleküls, von dem wir die dreidimensionale Struktur bestimmen wollen. Die in Quadraten befindlichen Nukleotide treten miteinander, A mit U und G mit C, durch Basenpaarungen in Wechselwirkung. Bei der RNA handelt es sich um die ribosomale 5S rRNA aus dem thermophilen Bakterium *Thermus flavus*. Aufgrund ihrer Größe (120 Nukleotide) konnte diese RNA bisher noch nicht für die Röntgenstrukturanalyse kristallisiert werden. Wir haben daher begonnen, die einzelnen Domänen (A bis E) der 5S rRNA chemisch zu synthetisieren und zu kristallisieren. Auf der rechten Seite ist die Röntgenstruktur der Domäne A wiedergegeben, die mit $2,2 \text{ \AA}$ bestimmt wurde. Die Struktur zeigt nicht nur die Basenpaare innerhalb dieser Domäne, sondern darüber hinaus eine Reihe von Wassermolekülen (als Kugeln dargestellt), die intern gebunden zur Struktur der Domäne A einen wesentlichen Beitrag liefern.

Nachdem die grundsätzlichen Voraussetzungen für die Einrichtung der RNA-Technologien definiert wurden, sollen in den folgenden Abschnitten die Einsatzmöglichkeiten von Ribozymen, hochaffinen RNA-Molekülen und des Proteinbioreaktors diskutiert werden.

Ribozyme

Ein grundsätzlich neues wissenschaftliches Potential der RNA-Moleküle wurde erstmalig durch die Entdeckung von T. Cech und S. Altman (beide USA), daß diese Moleküle auch hydrolytische Eigenschaften besitzen können, aufgezeigt. Diese enzymatisch aktiven RNA-Moleküle werden als Ribozyme bezeichnet. Die Funktion dieser Ribozyme beruht darauf, daß sie durch Basenpaarungen spezifisch mit einem Ziel-RNA-Molekül in Wechselwirkung treten und dabei eine Struktur ausbilden, die es ermöglicht, daß die Ziel-RNA an einer Stelle hydrolysiert wird. Mit der Hydrolyse der Ziel-RNA wird deren biologische Funktion inhibiert. Es ist daher naheliegend, daß man derzeitig bemüht ist, diese Ribozyme in kranke oder fehlgesteuerte Zellen einzuschleusen, um die für den zellulären Effekt verantwortliche mRNA zu inaktivieren.

In unserem Labor untersuchen wir drei verschiedene Ribozyme, die mit Hammerhead, Hairpin und RNase P bezeichnet werden. Abb. 4 zeigt das Konzept für den medizinischen Einsatz eines Hammerhead-Ribozyms. Die derzeitigen Arbeiten konzentrieren sich auf folgende Schwerpunkte: 1. die verbesserte Aufnahme der im Labor hergestellten Ribozyme durch menschliche Zellen, 2. die Konstruktion von Ribozymen mit optimalen hydrolytischen Eigenschaften und 3. auf die Synthese von Ribozymen, die gegenüber den hydrolytischen Aktivitäten zellulärer Ribonukleasen (Enzyme, die RNA spalten) resistent sind, ohne daß sie eine immunologische Antwort des Organismus hervorrufen.

Die vorstellbaren Einsatzgebiete dieser Ribozyme wären z. B. Tumorerkrankungen, virale Infektionen und genetisch veranlagte Erkrankungen, bei denen bestimmte Proteine im Körper überproduziert werden.

Hochaffine RNA-Moleküle

Hochaffine RNA-Moleküle (haRNAs), auch Aptamere genannt, können in ihrer Wirkungsweise durchaus mit herkömmlichen Antikörpern verglichen werden. Die ersten Forschungsergebnisse haben auf diesem Gebiet gezeigt, daß die haRNAs gegenüber den Antikörpern folgende Vorteile besitzen: 1. sie sind chemisch syn-

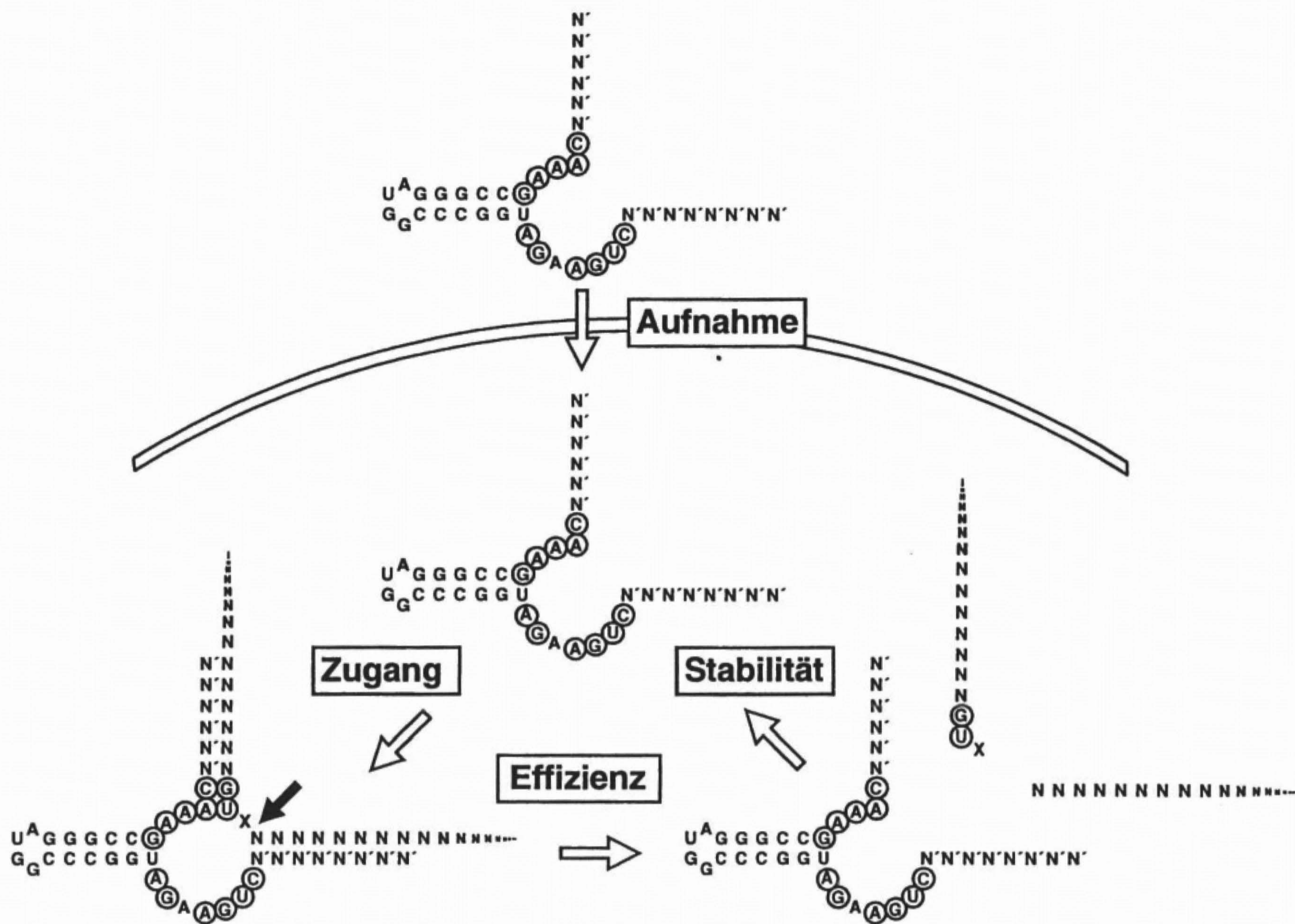


Abb. 4

Schematische Darstellung der Strategie, mit der ein Hammerhead-Ribozym zur gezielten Inaktivierung einer zellulären mRNA eingesetzt werden soll. Das Ziel-RNA-Molekül (mRNA) ist mit der SequenzNNNNNGUXNNNN..... dargestellt, wobei N für eines der vier Nukleotide und X für A, C oder U steht. Das Hammerhead-Ribozym schneidet die mRNA-Sequenz hinter dem X der GUX-Sequenz. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Die Abbildung wurde von Jens-Peter Fürste zur Verfügung

thetisierbar, 2. sie besitzen ein größeres Substratspektrum und 3. ist eine bessere Verträglichkeit im Organismus zu erwarten.

Aufgrund ihrer vielseitigen Bindungseigenschaften sollen die haRNAs zu dem Zweck konstruiert werden, daß sie nicht nur mit anderen Nukleinsäuren, sondern vor allen Dingen mit Proteinen oder auch kleineren Molekülen der Zelle in Wechselwirkung treten. Die Wechselwirkungen können aber auch mit den zellulären Rezeptoren bzw. mit viralen Partikeln angestrebt werden. Auf jeden Fall soll durch die Wechselwirkung der hochaffinen RNAs eine Inhibierung einer biologischen Funktion erreicht werde, so daß mit diesen Molekülen in der Zukunft grundsätzlich neue Therapiemöglichkeiten zur Verfügung stehen.

Weiterhin ist absehbar, daß die haRNAs auch in der medizinischen Diagnostik eine entscheidende Rolle spielen werden, da sie wie monoklonale Antikörper ein-

setzbar sind. Die beschriebenen hochaffinen RNA-Moleküle und Ribozyme eröffnen darüber hinaus neue Perspektiven auf dem Gebiet der Biosensorik, ein Gebiet, das sich ebenfalls erst im Anfangsstadium befindet und für die medizinische Diagnostik und Umweltforschung von großer Bedeutung sein wird.

Um die hochaffinen Nukleinsäuren zur Anwendung bringen zu können, müssen die RNA-Moleküle in großer Sequenzvielfalt erstellt werden (pro Experiment 10^{15} Varianten), um aus diesem Gemisch die wenigen Moleküle zu isolieren, die die gewünschten Eigenschaften besitzen. Die für dieses Verfahren notwendige Methode ist die SELEX-Methode (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), die vor fünf Jahren von C. Tuerk und L. Gold (beide USA) entwickelt wurde. Die SELEX-Methode beruht darauf, daß bei der Nukleinsäuresynthese in bestimmten Positionen nicht ein bestimmtes Nukleotid, sondern statistisch die vier verschiedenen Nukleotide eingebaut werden. Die Anzahl der erzielten Mutanten errechnet sich aus 4^N , wobei N der Zahl der variierten Positionen entspricht. Werden z. B. in der Nukleinsäure nur 2 Positionen variiert, so ergeben sich in dem Experiment 4^2 , also $4 \times 4 = 16$ Varianten. Werden in einem typischen Versuch allerdings 25 Positionen variiert, so entstehen $4^{25} = 10^{15}$ Mutanten des RNA-Moleküls. Aus diesem Gemisch lassen sich dann die Moleküle, die für ein bestimmtes Substrat eine Affinität besitzen, durch Anwendung einer Affinitätschromatographie isolieren. Da die gewünschten RNA-Moleküle nur in sehr wenigen Exemplaren vorliegen, müssen diese amplifiziert werden. Dies geschieht, indem die RNA-Moleküle zunächst in DNA-Moleküle übersetzt werden und dann diese mit der PCR-Methode (Polymerase-Kettenreaktion) vervielfältigt werden. Die Vervielfältigung erfordert Reaktionszyklen, in denen jeweils die Anzahl der DNA-Moleküle verdoppelt werden. So entstehen nach dem ersten Zyklus aus einem Molekül zwei Moleküle, nach dem zweiten Zyklus vier Moleküle usw. Nach 30 Zyklen können aus einem Molekül mehr als eine Milliarde Moleküle erstellt werden. Der letzte Teil des Experimentes erfordert dann, daß die amplifizierten DNA-Moleküle wieder in RNA-Moleküle transkribiert werden. Nach einer Sequenzbestimmung dieser RNA-Moleküle können wir unser chemisch-synthetisches Potential nutzen, um in diesen RNA-Molekülen in bestimmten Positionen modifizierte Nukleotide einzubauen, so daß durch eine Kombination aller Methoden grundsätzlich neue Strategien zur Erstellung von haRNAs zur Verfügung stehen.

Die hier beschriebenen Strategien werden zur Zeit von uns in Zusammenarbeit mit vier weiteren Arbeitsgruppen in einem BMBF-Verbundprojekt eingesetzt, um am Beispiel des Rhinovirus 14 (Verursacher des Schnupfens) eine antivirale hochaffine RNA zu erstellen, die letztendlich eine Virusinfektion verhindern soll.

Der Proteinbioreaktor

Der bei uns in der Entwicklung befindliche Proteinbioreaktor ist ebenfalls den RNA-Technologien zuzuordnen, da in diesem Reaktor RNA-Moleküle eine Schlüsselrolle einnehmen (siehe Abb. 1). Mit diesem Proteinbioreaktor versuchen wir neue Wege zu beschreiten, indem wir in einem von uns konstruierten Apparat ein ganzes biologisches Funktionssystem im „Reagenzglas“ in Anwendung bringen. Dieses Funktionssystem besteht aus dem vollständigen zellulären Translationsapparat, den wir aus Bakterien isoliert haben, d.h. also den Ribosomen, tRNAs, zahlreichen Enzymen, den Aminosäuren, Energiekomponenten (ATP und GTP) usw. Im Ganzen enthält das Reaktionsgemisch mehr als 200 Komponenten. Geben wir nun diesem Proteinbioreaktor eine bestimmte mRNA zu, so wird diese von den Ribosomen in ein Protein übersetzt. Da einige Produkte, die während der Proteinsynthese entstehen, u. a. auch das synthetisierte Protein, die Reaktion inhibieren können, müssen diese fortlaufend durch eine permeable Membran des Reaktors abgeführt werden. Darüber hinaus müssen zusätzlich die Komponenten, die verbraucht werden (Aminosäuren, ATP und GTP), dem System kontinuierlich zugefügt werden. Abb. 5 zeigt eine schematische Darstellung des von uns konstruierten Proteinbioreaktors.

In Anbetracht dessen, daß man bereits mit Hilfe der Gentechnologie Proteine *in vivo*, d. h. in lebenden Organismen herstellen kann, ergibt sich die Frage, worin die Vorteile eines *in vitro*-Systems liegen könnten. Die Hauptvorteile des Proteinbioreaktors sind die, daß während der Proteinsynthese keine anderen Proteine entstehen, daß ganz gezielt Veränderungen in das Protein eingebaut werden können, daß Proteine, die für den lebenden Organismus toxisch sind, mit dem *in vitro*-System hergestellt werden können, daß der Weg vom Gen zum Protein sehr kurz ist und daß der Einsatz gentechnologischer Methoden nicht notwendig ist.

Darüber hinaus stellt die *in vitro*-Proteinbiosynthese eine neue Schlüsseltechnologie dar, deren zukünftige Anwendungen in der Biochemie, Biotechnologie und der medizinischen Diagnostik und Therapie als sehr groß einzuschätzen sind. Die von uns erreichten Ausbeuten von 100 µg Protein pro Milliliter Reaktionsvolumen lassen bereits folgende denkbaren Anwendung des Proteinbioreaktors in naher Zukunft zu: 1. die Synthese von veränderten Proteinen mit verbesserten Aktivitäten oder grundsätzlich neuen Eigenschaften und Spezifitäten, 2. die Optimierung von enzymatischen Eigenschaften und Bindungseffizierungen in Kombination mit den SELEX- und PCR-Methoden (molekulare Evolution), 3. die Aufklärung von Proteinstrukturen und -funktionen sowie der Proteinfaltungsmechanismen durch den gezielten Einbau isopenmarkierter Aminosäuren (NMR-Spektroskopie), 4. die Immobilisierung von gezielt modifizierten Proteinen für Affinitätschromatographiesysteme und Biosensoren, 5. das schnelle Überprüfen der Produkte von

Proteinbioreaktor

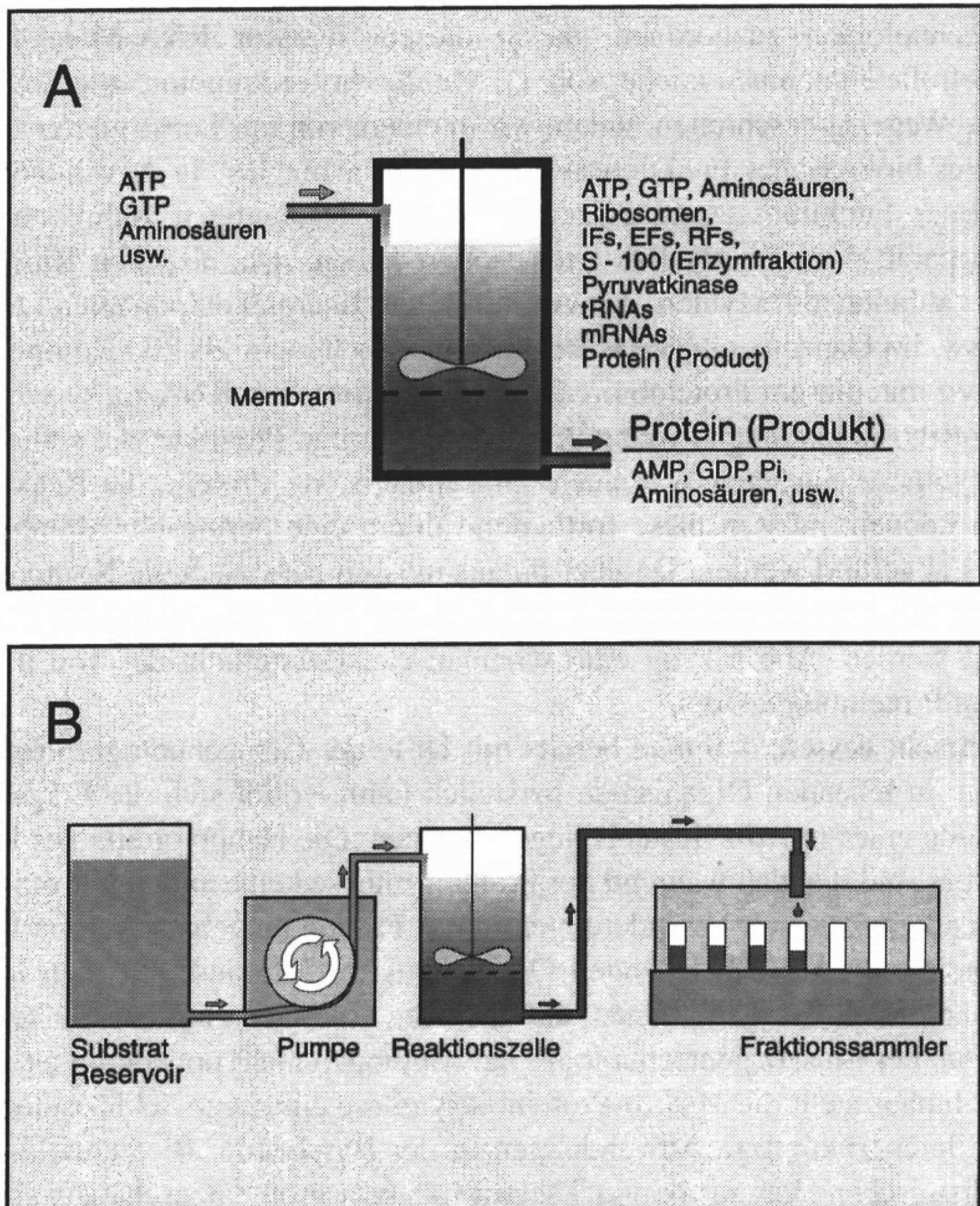


Abb. 5

Schematische Darstellung des Proteinbioreaktors mit dem in vitro die Synthesen von hochaktiven Proteinen ermöglicht werden. Das Prinzip des Proteinbioreaktors basiert auf der kontinuierlichen Abführung des synthetisierten Proteins und der verbrauchten Energiekomponenten (AMP, GDP) durch eine permeable Membran. Gleichzeitig müssen dem System neue Energiekomponenten (ATP, GTP) und die für das Protein notwendigen Aminosäuren zugeführt werden. Das Reaktionsgefäß des Proteinbioreaktors ist in A und die gesamte Anlage in B der Abbildung wiedergegeben.

Weitere Einzelheiten sind im Text beschrieben.

Genabschnitten (Humane Genom Projekt) und 6. der technische Einsatz gezielt modifizierter Proteine im Bereich der Bioinformatik.

Ausblick

Mit der hier vorgelegten Zusammenfassung der derzeitigen Aktivitäten auf dem Gebiet der RNA-Technologien wird dokumentiert, daß diese Technologien äußerst innovativ sind und daß in Zukunft der Einsatz von RNA-Molekülen in der Biochemie, Biotechnologie und Medizin (Diagnostik und Therapie) zu grundsätzlich neuen Strategien führen wird.

Danksagung

Ich bedanke mich ausdrücklich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie, dem Fonds der chemischen Industrie e.V. und der Deutschen Agentur für Raumfahrt-Angelegenheiten für die großzügige Unterstützung unserer Forschungsvorhaben.