

## Biochemie und Molekularbiologie 2003

**Hochdurchsatzmethoden führen zu ersten Erfolgen bei der Vorhersage der biologischen Aktivität funktionell nicht charakterisierter Proteine anhand von Strukturhomologien. Proteintherapeutika halten Einzug in den medizinischen Alltag. Die RNA, in ihrer Bedeutung lange unterschätzt, hat mit ihren verschiedenen Formen in Grundlagen- und Pharmaforschung ein Comeback erlebt.**

### Proteinkristallographie im Zeitalter der Strukturgenomik

Abb. 1. **◆** Der Trendbericht „Neue Proteinstrukturen“ im Jahr 2000 endete mit der Frage, ob die klassische Proteinkristallographie nach der Strukturanalyse des Ribosoms ihren Zenit überschritten hat und ob wir künftig mit Strukturen funktionell nicht charakterisierter Proteine überhäuft werden.<sup>1)</sup> Wir möchten, ausgehend

*Aus der Strukturgenomik: Gab-Protein aus E. coli mit Strukturhomologie zu den Fe<sup>II</sup>-haltigen 2-Oxoglutarat-abhängigen Oxygenasen.*



von dieser Frage, an Beispielen aus dem vergangenen Jahr Eindrücke von der Entwicklung der „klassischen Proteinkristallographie“ und der Strukturgenomik vermitteln.

#### Strukturgenomik

◆ Unter dem Begriff „Strukturgenomik“ versteht man die Strukturbestimmung zahlreicher Proteine eines Genoms durch eine Institution oder ein Konsortium, unabhängig davon, ob diese Proteine bereits funktionell charakterisiert wurden oder nicht.<sup>2)</sup> Durch neue Techniken und Automatisierung soll der Durchsatz bei der Strukturbestimmung deutlich erhöht werden, wie es bei der Bestimmung der Genomsequenzen in beeindruckender Weise gelungen ist. Seit der Gründung der ersten Initiativen dieser Art vor etwa fünf Jahren haben diese nun ihre „Produktionsphase“ erreicht.

Die Ziele waren hoch gesteckt: jedes Konsortium wollte pro Jahr Hunderte von Strukturen produzieren. Konnte dieser Durchsatz erreicht werden? Ein Korrespondent von *Science* schrieb dazu bereits Ende 2002 nach Besuch der Strukturgenomik-Konferenz in Berlin, dass die Pipelines der Initiativen Lecks

haben und statt einer Flut nur ein Rinnsal neuer Strukturen produzieren. Zweifellos wird der ursprünglich hoch angesetzte Durchsatz gegenwärtig noch nicht erreicht. Die Ursache ist darin zu sehen, dass die Strukturbestimmung sich (noch?) nicht in dem Maße automatisieren lässt wie die Genomsequenzierung. Auf dem Weg von der Gensequenz zur Proteinstruktur gibt es viele Hürden, die sich nicht mit einer Standardmethode überwinden lassen, insbesondere die lösliche Expression und Kristallisation der Proteine. Dies sind die Lecks, die dazu führen, dass von 100 anvisierten Zielproteinen zunächst nicht mehr als zehn die Pipeline als verfeinerte Struktur verlassen, bei den eukaryotischen oder menschlichen Proteinen deutlich weniger als bei den bakteriellen Proteinen. Nach der zentralen Datenbank <http://targetdb.pdb.org> wurden bis Ende November 2003 insgesamt 535 Strukturen bestimmt, etwa 400 davon in Nordamerika.

Dennoch ist davon auszugehen, dass mit neuen Hochdurchsatzmethoden und der Automatisierung die Kosten pro Proteinstruktur gesenkt werden und der Durchsatz zukünftig noch erhöht wird. Ein Groß-

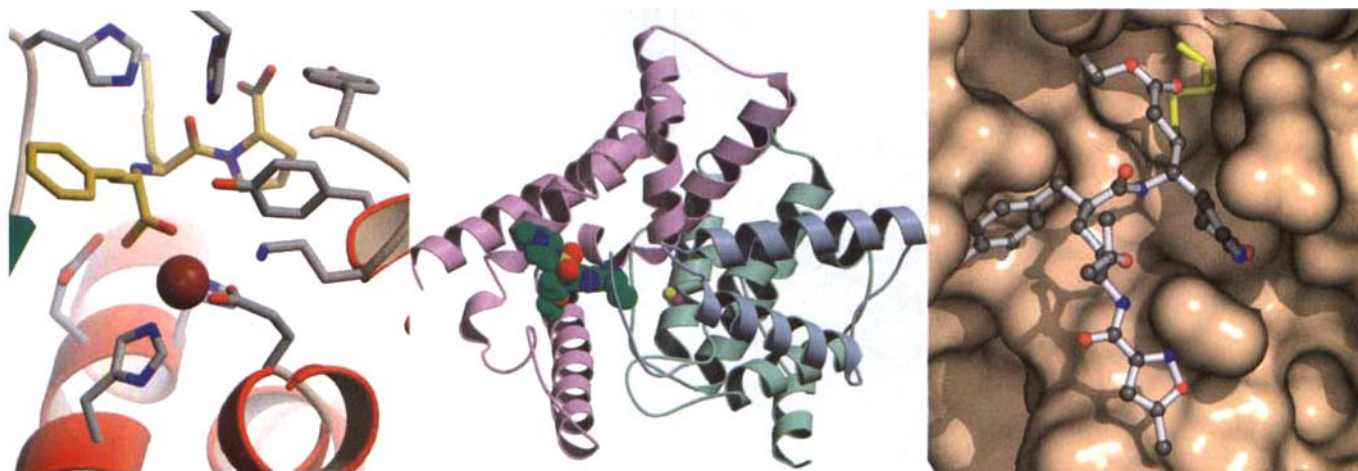


Abb. 2. Wirkstoffe in Aktion: Links: Bindung von Lisinopril an das Angiotensin-konvertierende Enzym mit Zinkion (rot). Mitte: Inhibierung der PDE-5 durch Sildenafil. Rechts: molekulare Oberfläche des aktiven Zentrums einer Coronavirus-Protease mit gebundenem synthetischem Inhibitor und katalytischem Cystein-Nukleophil (gelb).

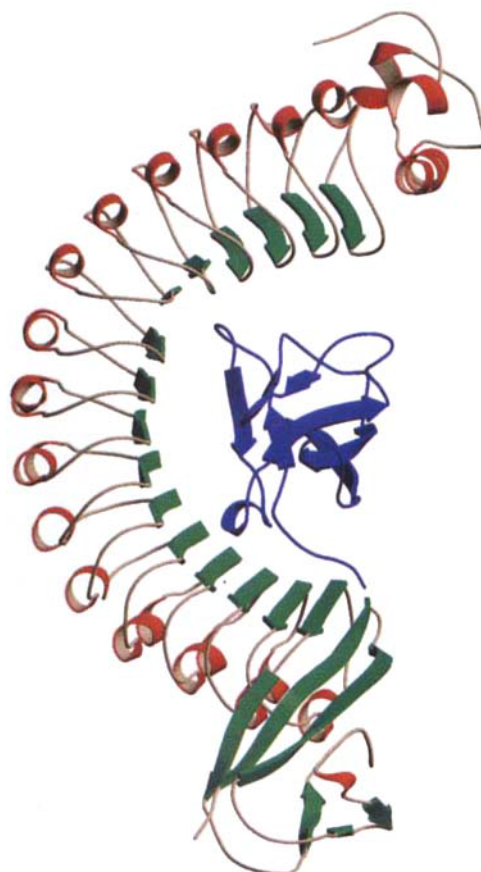
teil dieser Methoden und die Infrastruktur an Synchrotronstrahlrohren kommt zudem auch akademischen Projekten zugute. Schwieriger ist die Frage zu beantworten, ob mit dem Hochdurchsatz der Strukturbestimmung auch ein adäquater Gewinn an biologisch relevanter Information einhergeht. Hier schwingt die eingangs erwähnte Befürchtung mit, dass mit der „Überhäufung“ nicht funktionell charakterisierter Proteine eben kein großer Erkenntnisgewinn über das bloße Resultat einer neuen Proteinfaltung hinaus erhalten wird. Während mit der Strukturbestimmung auf der Grundlage funktioneller Untersuchungen bisher häufig ein Vorschlag für die molekulare Funktionsweise des Proteins präsentiert werden konnte, wird künftig zunehmend mit der Strukturbestimmung eines funktionell noch nicht charakterisierten Genprodukts zunächst nur eine Struktur in der Datenbank hinterlegt. Hier müssen Biochemiker diese Information später zur Interpretation eigener funktioneller Studien nutzen. Generell wird der biologische Erkenntnisgewinn der Strukturbestimmung funktionell nicht charakterisierter Proteine zunächst sicherlich geringer ausfallen als für ein gut untersuchtes Protein. Jedoch können im Zusammenspiel mit anderen Ansätzen der Proteomik und Bioinformatik später neue Erkennt-

nisse erlangt und Felder erschlossen werden, die mit klassischen Ansätzen noch lange brach gelegen hätten. Hier sind Hochdurchsatz und klassischer Ansatz komplementär.

Da Tertiärstrukturen deutlich besser konserviert sind als Primärstrukturen, führte die Strukturbestimmung tatsächlich häufig zu unerwarteten Homologien, die Hinweise auf die biologische Aktivität des Proteins geben (Abbildung 1). So bestimmte das New-York-Strukturgenomik-Konsortium die Struktur des funktionell nicht charakterisierten Gab-Proteins des  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Operons aus *E. coli* (1JR7), wobei sich eine Ähnlichkeit zu Enzymen aus der Gruppe der Fe<sup>II</sup>-haltigen 2-Oxoglutarat-abhängigen Oxygenasen herausstellte.<sup>3)</sup> Damit ist zwar die katalytische Aktivität mit großer Wahrscheinlichkeit erkannt, das Substrat bleibt aber noch im Dunkeln, da die Enzyme dieser Familie eine große Vielfalt an Substanzen oxidieren. Ein weiteres Beispiel für eine unerwartete Homologie erbrachte die Strukturbestimmung des Proteins yggF (INXZ) aus *Haemophilus influenzae* durch das North-east-Strukturgenomik-Konsortium: dieses Protein weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu RNA-Methyltransferasen auf.<sup>4)</sup> Jedoch ist auch beim Rückschluss von der Strukturähnlichkeit zu ähnlicher Funktion zumindest Vorsicht ange-

bracht. So bestimmten wir im vergangenen Jahr die Struktur einer Glucosidase mit einem NAD<sup>+</sup>-Kofaktor in unmittelbarer Nähe des Maltose-Substrates.<sup>5)</sup> Die Glucosidase hat eine verblüffende strukturelle Ähnlichkeit zur Lactat-Dehydrogenase. Die Struktur dieses Proteins wurde ebenfalls von einem Strukturgenomik-Konsortium bestimmt. Ohne die bio-

Abb. 3. Anbindung von Internalin A des Pathogens *L. monocytogenes* (rot/grün) an die N-terminale Domäne des menschlichen E-Cadherin-Rezeptors (blau).



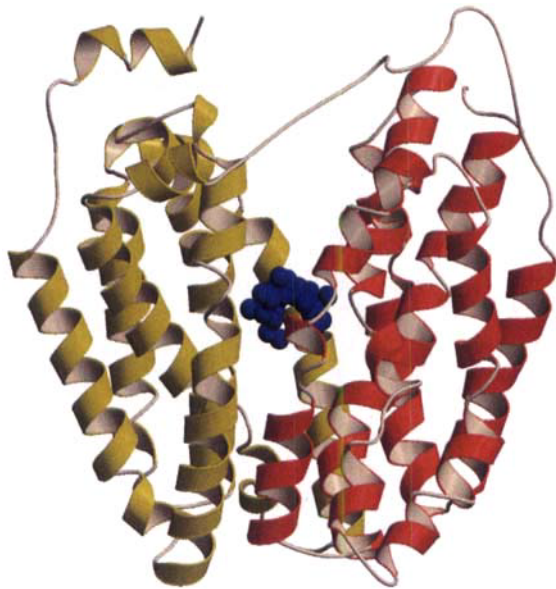


Abb. 4. *Lactose-Permease mit gebundenem Lactose-Homolog (blau): Der Membrantransport soll durch eine Rotation der zwei Domänen (gelb und rot) des Proteins bewerkstelligt werden, wobei sich die Bindungstasche zur periplasmatischen Seite öffnet.*

chemischen Daten zur hydrolytischen Aktivität des Enzyms wäre die Strukturhomologie als Weg zur Funktionsbestimmung hier eher irreführend.

**Wirkstoffe in Aktion**

◆ Eine wichtige praktische Anwendung der Proteinkristallographie ist das rationale Wirkstoffdesign auf der Grundlage von Komplexen des Proteins mit vorhandenen und potentiellen Wirkstoffen. Die meisten

dieser Strukturen verbleiben unveröffentlicht in den Archiven der Pharmafirmen, jedoch seien hier einige publizierte Highlights des vergangenen Jahres angeführt: Das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) spaltet das His-Leu-Dipeptid des Angiotensins I ab, unter Bildung des gefäßverengend wirkenden Angiotensin II. ACE-Inhibitoren werden u. a. zur Therapie von Bluthochdruck und Herzversagen eingesetzt. Die Struktur des Proteins mit dem Wirkstoff Prinivil (Zestril) (1O86<sup>6)</sup>) eröffnet die Möglichkeit des rationalen Designs von neuen Wirkstoffen mit veränderten pharmakologischen Profilen (Abbildung 2, links). Ein anderer buchstäblich potenter Inhibitor ist das Sildenafil, vor allem unter dem Handelsnamen Viagra bekannt. Sung und Mitarbeiter bestimmten die Bindung dieses Wirkstoffes an seinem Zielort, der humanen Phosphodiesterase 5 (1UDT<sup>7)</sup>) (Abbildung 2, Mitte).

Das Wirken dieser Medikamente wird vermutlich im aktiven Zentrum der Cytochrom-P450-Enzyme beendet, die oxidativ mehr als 90 % aller Wirkstoffe abbauen. Die Strukturaufklärung einer Isoform dieser Enzyme im Komplex mit dem Wirkstoff Warfarin (1OG2<sup>8)</sup>) zeigt eine große Sub-

stratbindetasche, wobei das Warfarin nicht in unmittelbarer Nähe der Hämgruppe gebunden hat. Dies könnte die primäre Bindestelle für Substrate sein, es ist jedoch noch genug Platz für ein weiteres Substratmolekül vorhanden. In diesem Fall würde das Warfarin einen Teil der Substratbindetasche bilden, was sowohl die allosterische Aktivierung des Enzyms durch eine Reihe von Substanzen erklären würde als auch die durch P450-Enzyme vermittelten Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktionen.

Bakterielle und virale Proteine können eine Rolle als Wirkstofftargets zur Abwehr von Infektionskrankheiten spielen. Die Furcht vor der Epidemie SARS beherrschte die Schlagzeilen am Anfang des vorigen Jahres. Die Protease des infektiösen Coronavirus ist ein möglicher Angriffspunkt für eine Therapie dieser Krankheit, da die Aktivität dieses Enzyms für die proteolytische Prozessierung von zwei Replicase-Polypeptiden des Virus notwendig ist. Nachdem zunächst die Strukturen von verwandten Coronaviren im Komplex mit synthetischen Inhibitoren aufgeklärt wurden (1P9T<sup>9)</sup>) (Abbildung 2, rechts), gelang später auch die Strukturbestimmung der SARS-Coronavirus-Protease (1UJ1<sup>10)</sup>).

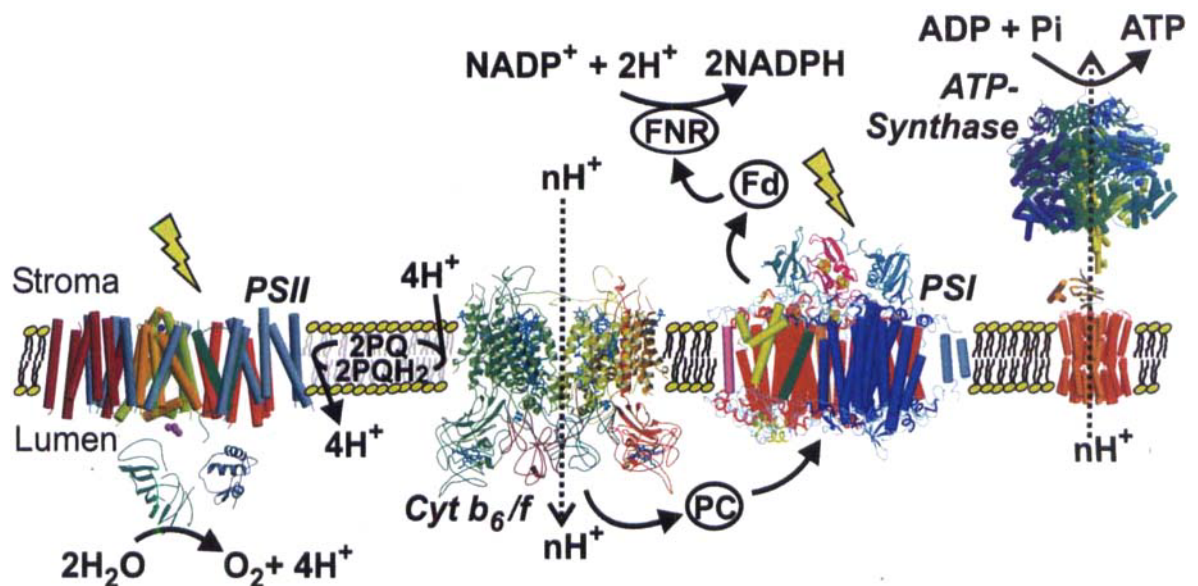


Abb. 5. *Strukturbiologie der oxygenen Photosynthese. Die Photosysteme I (PSI) und II (PSII) werden durch Lichtenergie angeregt, PSII erzeugt dabei Sauerstoff. Elektronen werden von PSII über das lipophile Plastochinon (PQ) auf den Cytochrom b<sub>6</sub>/f-Komplex (Cyt b<sub>6</sub>/f) und von dort über Plastocyanin (PC) auf PSI übertragen, das die Elektronen über Ferredoxin (Fd) der Ferredoxin:NADP<sup>+</sup>-Reduktase (FNR) zur Reduktion von NADP<sup>+</sup> zur Verfügung stellt. Der während des Elektronentransports aufgebaute elektrochemische Protonengradient wird von der ATP-Synthase zum Aufbau von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat genutzt.*

Zum Eindringen in die Wirtszellen nutzen pathogene Bakterien häufig spezifische Interaktionen mit Rezeptoren an der Zelloberfläche. Das in Lebensmitteln vorkommende Pathogen *Listeria monocytogenes* dringt zunächst in die Epithelzellen im Darm ein. Der Schritt der Bindung des bakteriellen Proteins Internalin A an die N-terminale Domäne des menschlichen Rezeptors E-Cadherin konnte nun auf molekularer Ebene visualisiert werden (1O6S).<sup>11)</sup> Eine Domäne mit der für leucinreiche Wiederholungsmotive typischen Hufeisenfaltung erkennt dabei spezifisch den Rezeptor des menschlichen Wirts (Abbildung 3).

### Membrankanäle

◆ Die Strukturen von Membrankanälen sind zweifelsohne ein Highlight der letzten Jahre. Auch im vergangenen Jahr wurden weitere Fortschritte erzielt, insbesondere mit der Strukturbestimmung eines potenzielgesteuerten (1ORQ<sup>12)</sup>) sowie eines geschlossenen (1P7B<sup>13)</sup>) Kaliumkanals, der eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Weiterleitung von Aktionspotentialen in Nervenzellen spielt. Diese Strukturen wurden erst kürzlich im Hinblick auf die Verleihung des Chemie-Nobelpreises auf diesem Gebiet in den *Nachrichten* berücksichtigt (Nachr. Chem. 2003, 51, 1234). Der elektrochemische Ionengradient kann von speziellen Transportproteinen genutzt werden, um Verbindungen entgegen einem Konzentrationsgradienten zu transportieren. Hier konnte mit der Lactose-Permease aus *E. coli* ein biochemisch bereits besonders gut charakterisiertes Transportprotein strukturell aufgeklärt werden (1PV6<sup>14)</sup>) (Abbildung 4). Die Permease besteht aus zwei Domänen mit jeweils sechs Transmembranhelices, die so angeordnet sind, dass eine große hydrophile Tasche gebildet wird, welche zur cytosolischen Seite geöffnet ist. Mit dem Transport des Substrates könnte eine Konformationsänderung in Form einer Rotation der Domänen verbunden sein, wobei die

Tasche mit dem gebundenen Substrat sich nun zur periplasmatischen Seite öffnet. Für diese Konformation liegen aber noch keine Strukturdaten vor.

Einen Protonengradienten zum Export von Wirkstoffen aus der Zelle nutzen Multidrug-Exporter, die für Probleme sowohl bei der Krebs-Chemotherapie als auch bei der Therapie von bakteriellen Infektionen sorgen. Nach der Strukturaufklärung des Transporters AcrB aus *E. coli*<sup>15)</sup> wurden nun Komplexe mit mehreren Liganden bestimmt (Rhodamin 6G, Ethidium, Dequalinium und Ciprofloxacin).<sup>16)</sup> Diese Verbindungen binden an eine Reihe von Orten des etwa 5000 Å<sup>3</sup> großen zentralen Hohlraums des Trimers, was die breite Substratspezifität des Transporters erklärt.

### Bioenergetik

◆ Besondere Fortschritte sind für 2003 bei der Untersuchung weiterer Mitglieder der membranständigen Elektronentransportketten der oxygenen Photosynthese und der mitochondrialen Atmungskette zu verzeichnen. Mit der Strukturbestimmung des Cytochrom *b<sub>L</sub>/f*-Komplexes (1UM3<sup>17)</sup>) sowie den Röntgenstrukturen der Photosysteme I<sup>18)</sup> und II<sup>19,20)</sup> und der beteiligten kleineren löslichen Proteine sind damit alle Komponenten des Elektronentransportes und der Protonentranslokation der oxygenen Photosynthese strukturell charakterisiert (Abbildung 5). Der Cytochrom *b<sub>L</sub>/f*-Komplex überträgt Elektronen zwischen den Photosystemen I und II und erzeugt dabei den später zur Energiegewinnung genutzten elektrochemischen Protonengradienten.

In der Gruppe von Iwata gelang die Strukturaufklärung der membranständigen Succinat-Dehydrogenase aus *E. coli* bei 2,6 Å Auflösung (1NEK, 1NEN)<sup>21)</sup> (Abbildung 6). Diese ist verwandt mit dem Komplex II (Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase) der mitochondrialen Atmungskette und kann als Modell zu dessen Beschreibung dienen. Aus der räumlichen Anordnung aller am

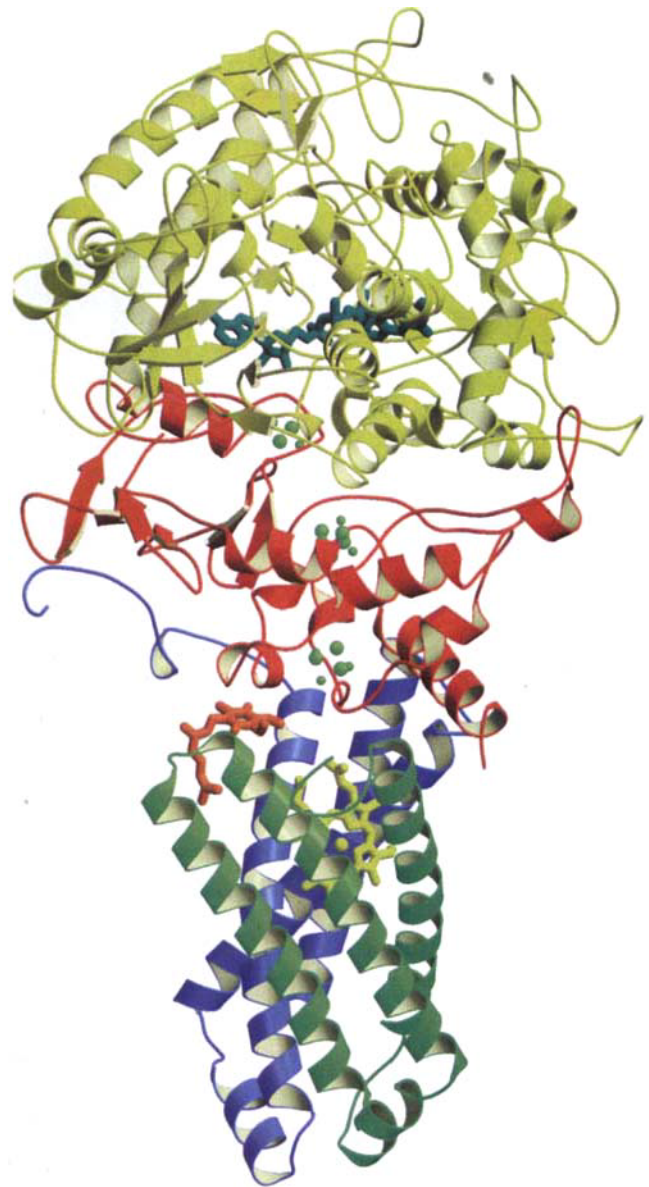


Abb. 6. Struktur der Succinat-Dehydrogenase aus *E. coli*, aufgebaut aus den cytoplasmatischen Untereinheiten A (gelb) und B (rot), und den Transmembran-Untereinheiten C (blau) und D (grün). Am Elektronentransfer nehmen die Cofaktoren Ubichinon (orange), mehrere Eisen-Schwefel-Cluster (grün) und FAD (blaugrün) teil, das gebundene Häm (gelb) verringert vermutlich die Bildung toxischer Sauerstoffspezies.

Elektronentransport beteiligten Cofaktoren und der sie koordinierenden Reste wird deutlich, dass die Natur in den Komplex II zahlreiche Schutzmechanismen gegen die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies eingebaut hat. Eine Reihe von Erbkrankheiten des Menschen, die in Aminosäure-Austauschen im Komplex II resultieren, schädigen offenbar genau diese Schutzfunktionen, und die Ursache für die assoziierten Schädigungen könnte in der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies zu suchen sein.

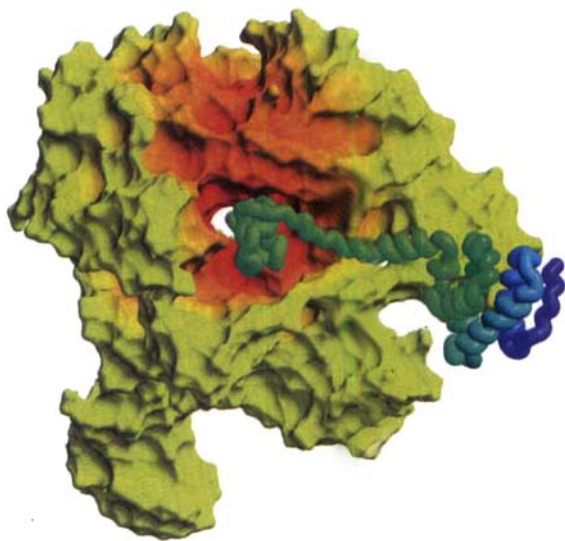


Abb. 7. **Transkription**  
Bindung des Elongationsfaktors TFIIIS an die RNA-Polymerase II. Die C-terminale Domäne von TFIIIS (Röhrenmodell, blau bis grün in C-terminale Richtung gefärbt) dringt tief in einen Tunnel zum aktiven Zentrum der RNA-Polymerase II (Oberflächendarstellung) vor.

◆ Die RNA-Polymerase II transkribiert in höheren Lebewesen proteinkodierende Gene in messengerRNA und geht dabei normalerweise progressiv vor. Bestimmte DNA-Sequenzen können jedoch eine Rückwärtsbewegung der RNA-Polymerase II in einem nichtproduktiven Zustand führen kann. Aus diesem kann sie erst wieder durch Bindung des Elongationsfaktors TFIIIS befreit werden, der die Nuclease-Aktivität der RNA-Polymerase II erhöht und ihr ermöglicht, Teile des neusynthetisierten RNA-

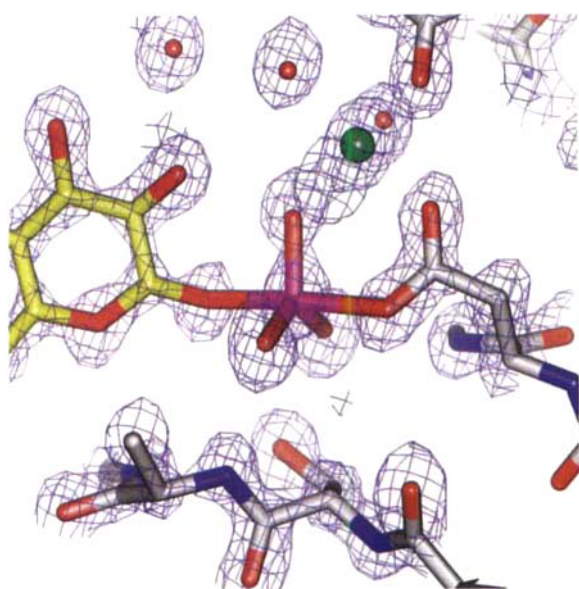


Abb. 8. Intermediat mit pentavalentem Phosphor oder „nur“ ein  $MgF_3^-$ -Ion als Analogon des Übergangszustands? Die 1,2-Å-Elektronendichte ist in Blau gezeigt.

Stranges abzubauen. Die RNA-Polymerase II im Komplex mit TFIIIS (IPQV)<sup>22)</sup> (Abbildung 7) unterscheidet sich in ihrer Struktur deutlich von der freien RNA-Polymerase II. Eine Domäne des Elongationsfaktors dringt dabei tief in einen Tunnel in der RNA-Polymerase ein und löst eine Umordnung des aktiven Zentrums aus, die vermutlich die nucleolytische Aktivität begünstigt. Dabei wird eine Schlaufenregion von TFIIIS mit sauren Resten nahe an das 3'-Ende der gebundenen RNA herangeführt und ist womöglich an der Bindung eines Metallions in einem Bimetallzentrum beteiligt, das die Spaltung des RNA-Stranges katalysiert.

### Enzymkatalyse

◆ Zum Schluss noch ein kontrovers diskutiertes Beispiel aus dem Bereich der Enzymkatalyse. Die Kristallographie kann molekulare Strukturen bis zu atomarer Auflösung sichtbar machen. Diese hochaufgelöste und weitgehend „objektive“ Elektronendichte muss jedoch zur Erstellung eines atomaren Modells stets interpretiert werden. Allen und Mitarbeiter untersuchten die Struktur einer Phosphoglucomutase in Gegenwart der natürlichen Substrate des Enzyms, welches die Übertragung einer Phosphorylgruppe vom Substrat auf eine Asparaginsäure des Enzyms katalysiert (1003).<sup>23)</sup> Die Elektronendichte zeigte bei einer hohen Auflösung von 1,2 Å die Gegenwart eines Liganden mit fünfbindigem Atom (Abbildung 8). Der Ligand wurde als Phosphoran-Intermediat (pentavalenter Phosphor) interpretiert, womit erstmals die direkte Visualisierung dieses für viele In-line-Phosphoryl-Transferreaktionen angenommenen Übergangszustands oder Intermediats gelungen wäre. Später kamen jedoch Zweifel an der Interpretation der Autoren auf und die trigonal-planare Gruppe wurde als  $MgF_3^-$ -Ion gedeutet, welches sich im Kristallisationspuffer aus 10 mM  $Mg^{2+}$  und 100 mM  $NH_4F$  gebildet haben sollte und als Analogon an Stelle des energiereichen Phospho-

ran-Übergangszustands bindet.<sup>24)</sup> Die Autoren der Strukturanalyse bleiben jedoch bei ihrer Deutung und führen als stärkstes Argument für die Gegenwart eines Phosphoran-Intermediats die Stärke des Signals der anomalen Dichtekarte an, wobei sich P und Mg um mehr als den Faktor zwei unterscheiden sollten.<sup>25)</sup>

Norbert Sträter  
Fakultät für Chemie und Mineralogie  
Universität Leipzig  
Timm Maier  
Institut für Chemie, FU Berlin  
strater@bbz.uni-leipzig.de

- 1) K. Niefind, Nachr. Chem. 2000, 48, 291.
- 2) T. Szyperski, Nachr. Chem. 2002, 50, 1128.
- 3) M. R. Chance et al., Protein Sci. 2002, 11, 723.
- 4) F. Forouhar, J. Shen, R. Xiao, T. B. Acton, G. T. Montelione, L. Tong, Proteins 2003, 53, 329.
- 5) J. A. Lodge, T. Maier, W. Liebl, V. Hoffmann, N. Sträter, J. Biol. Chem. 2003, 278, 19151.
- 6) R. Natesh, S. L. U. Schwager, E. D. Sturrock, K. R. Acharya, Nature 2003, 421, 551.
- 7) B.-J. Sung, K. Y. Hwang, et al., S. Ro, J. M. Cho, Nature 2003, 425, 98.
- 8) P. A. Williams, J. Cosme, A. Ward, H. C. Angove, D. M. Vinkovic, H. Jhoti, Nature 2003, 424, 464.
- 9) K. Anand, J. Ziebuhr, P. Wadhvani, J. R. Mesters, R. Hilgenfeld, Science 2003, 300, 1763.
- 10) H. Yang, M. Yang, Y. Ding, Y. Liu, Z. Lou, Z. Zhou, L. Sun, L. Mo, S. Ye, H. Pang, G. Gao, K. Anand, M. Bartlam, R. Hilgenfeld, Z. Rao, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003, 100, 13190.
- 11) W.-D. Schubert, C. Urbanke, T. Ziehm, V. Beier, M. P. Machner, E. Domann, J. Wehland, T. Chakraborty, D. W. Heinz, Cell 2002, 111, 825.
- 12) Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B. T. Chait, R. MacKinnon, Nature 2003, 423, 33.
- 13) A. Kuo, J. M. Gulbis, J. F. Antcliff, T. Rahmann, E. D. Lowe, J. Zimmer, J. Cuthbertson, F. M. Ashcroft, T. Ezaki, D. A. Doyle, Science 2003, 300, 1922.
- 14) J. Abramson, I. Smirnova, V. Kasho, G. Verner, H. R. Kaback, S. Iwata, Science 2003, 301, 610.
- 15) S. Murakami, R. Nakashima, E. Yamashita, A. Yamaguchi Nature 2002, 419, 587.
- 16) E. W. Yu, G. McDermott, H. I. Zgurskaya, H. Nikaido, D. E. Koshland Jr., Science 2003, 300, 976.

- 17) G. Kurisu, H. Zhang, J. L. Smith, W. A. Cramer, *Science* 2003, 302, 1009
- 18) P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, N. Krauss, *Nature* 2001, 411, 909
- 19) A. Zouni, H. T. Witt, J. Kern, P. Fromme, N. Krauss, W. Saenger, P. Orth, *Nature* 2001, 409, 739
- 20) N. Kamiya, J. R. Shen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 98
- 21) V. Yankovskaya, R. Horsefield, S. Tornroth, C. Luna-Chavez, H. Miyoshi, C. Leger, B. Byrne, G. Cecchini, S. Iwata, *Science* 2003, 299, 700
- 22) H. Kettenberger, K. J. Armache, P. Cramer, *Cell* 2003, 114, 347
- 23) S. D. Lahiri, G. Zhang, D. Dunaway-Mariano, K. N. Allen, *Science* 2003, 299, 2067.
- 24) G. M. Blackburn, N. H. Williams, S. J. Gambelin, S. J. Smerdon, *Science* 2003, 301, 1184c.
- 25) K. N. Allen, D. Dunaway-Mariano, *Science* 2003, 301, 1184d.



**Norbert Sträter** (Jahrgang 1965) studierte Chemie an der Universität Münster, wo er 1994 bei Bernt Krebs promovierte. Von 1994 bis 1997

war er als Postdoc bei William N. Lipscomb in Harvard. Anschließend wechselte er an das Institut für Chemie der FU Berlin (Labor Wolfram Saenger), wo er im Jahr 2001 habilitierte. Seit 2002 hat er die Professur für Strukturanalytik von Biopolymeren an der Fakultät für Chemie und Mineralogie der Universität Leipzig im Biotechnologisch-Biomedizinischen Zentrum inne. Seine Arbeitsgebiete sind die strukturelle Biochemie und die Proteinkristallographie.



**Timm Maier** (Jahrgang 1974) studierte Biochemie an der Universität Tübingen, und fertigte bei Wolfgang Voelter im Jahr 1999 seine Diplomarbeit an. Anschließend wechselte er an

die Freie Universität Berlin, wo er bei Wolfram Saenger in seiner Doktorarbeit die Struktur von zwei Proteinen des humanen Sphingolipid-Stoffwechsels aufklärte. Nach der Promotion im Dezember 2003 begann er Anfang 2004 einen Postdoc-Aufenthalt in der Gruppe von Nenad Ban an der ETH Zürich und beschäftigt sich weiter mit der Kristallstrukturanalyse von Proteinen.

## Engineering therapeutischer Proteine

### Der Paradigmenwechsel zu den Biopharmazeutika

◆ Lange erschienen Proteine für die pharmazeutische Industrie wenig attraktiv. Als Haupthindernis für deren therapeutische Anwendung galt die fehlende orale Verfügbarkeit. Die Gentechnik wurde deshalb in erster Linie zur Herstellung rekombinanter Proteine als Wirkstoff-Targets für Struktur-Funktions-Analysen sowie zur Etablierung von Screening-Assays in der Medizinischen Chemie eingesetzt. Dagegen beschränkte sich die Produktion „therapeutischer Proteine“ zunächst auf klassische humane Biomoleküle, wie Insulin, Blutgerinnungsfaktoren oder Wachstumshormon, die sich in konventionellen Substitutionstherapien einsetzen ließen und dementsprechend große Märkte eroberten.

Die pessimistische Einschätzung hinsichtlich der Eignung von Proteinen als originäre „biopharmazeutische“ Wirkstoffe hat sich in den letzten Jahren allerdings gewandelt, wie unter anderem zwei jüngst erschienene Monographien belegen.<sup>1,2)</sup> Den Wendepunkt dieser rasanten Entwicklung illustriert vermutlich am besten Herceptin (Entwicklungsname: Trastuzumab), ein bei Genentech entwickelter humanisierter Antikörper (Abbildung 1), der in Kombination mit konventionellen Cytostatika zur Behandlung von metastatisierendem Brustkrebs eingesetzt wird. Dessen Entstehungsgeschichte, von der Entdeckung des Targets über die Entwicklung als Wirkstoff in einem Biotechnologie-Unternehmen bis zu den regulatorischen Entscheidungsprozessen, ist inzwischen in einem Sachbuch nachzulesen.<sup>3)</sup>

Proteine mit ihrer hochentwickelten molekularen Erkennungsfähigkeit sind den klassischen niedermolekularen Arzneimitteln zumindest im Hinblick auf die Spezifität der pharmakologischen Wirkung häufig überlegen. In der Regel ist ih-

re Toxizität geringer, da die Polypeptide letztlich auf physiologischem Weg zu Aminosäuren abgebaut werden. Der Nachteil der notwendigen Verabreichung über die Blutbahn durch Injektion oder Infusion wird gerade im Fall lebensbedrohlicher Erkrankungen von den Patienten in Kauf genommen. Das zunehmende Verständnis der Struktur-Funktions-Beziehungen der Proteine bietet zudem die Möglichkeit, derartige Wirkstoffe für medizinische Anwendungen „maßzuschneidern“.

Dies betrifft nicht nur den biologischen Wirkmechanismus, sondern auch pharmakologische Parameter, die durch Variation der Aminosäuresequenz beeinflusst werden können: also Targetspezifität und -affinität sowie Pharmakokinetik und Toxizität/Metabolisierung (s. den Artikel „Neuartige Biopharmazeutika durch gezielte Manipulation pharmakologischer Parameter“, *Nachr. Chem.*, im Druck). Zudem eröffnen sich sogar andere, nicht mehr mit Eingriffen verbundene Darreichungswege.<sup>4)</sup> Aufgrund dieser Produktvorteile wird für Proteintherapeutika ein schnell wachsendes Marktpotential von über 59 Mrd. US\$ bis zum Jahr 2010 erwartet.<sup>5,6)</sup> Weltweit waren im September 2003 bereits 148 gentechnisch hergestellte Arzneimittel auf dem Markt. Davon haben 64 Biopharmazeutika, die insgesamt 30 Proteinwirkstoffe repräsentieren, erst in den letzten drei Jahren die Zulassung der Behörden erhalten.<sup>7)</sup>

### Neuartige therapeutische Proteine

◆ Das Anwendungspotential von durch Protein-Engineering gewonnenen Biopharmazeutika verdeutlichen einige in jüngerer Zeit zugelassene Medikamente sowie Produktkandidaten, die sich in fortgeschrittenen klinischen Prüfungsphasen befinden. Abgesehen von der hier zitierten Fachliteratur finden sich detaillierte Informationen zu deren Zusammensetzung und Eigenschaften im Fall der bereits zugelassenen Proteintherapeutika auf den Web Sites der U.S. Food and Drug Administration ([www.fda.gov](http://www.fda.gov)) oder der European

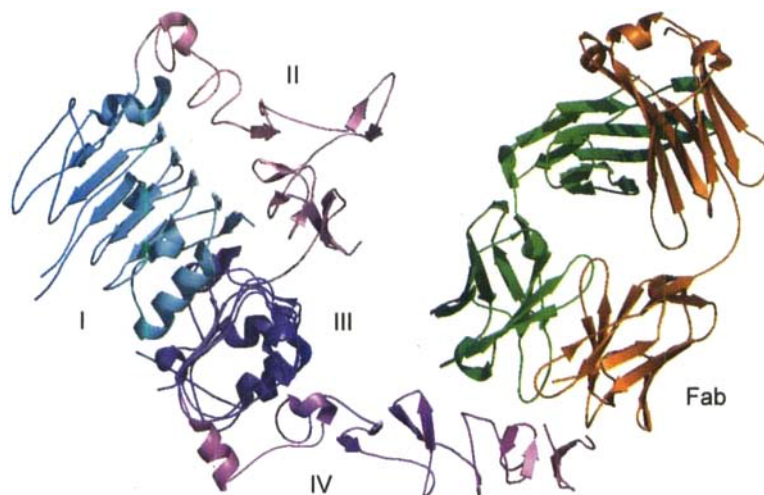


Abb. 1. Komplex aus dem Fab-Fragment des humanisierten Antikörpers Herceptin (Trastuzumab; leichte Kette orange, schwere Kette grün) und der extrazellulären Region (sHER2) seines humanen Rezeptor-Targets pHER2/neu.<sup>25)</sup> Diese zeigt mit ihren vier Domänen im Vergleich zu der ebenfalls aufgeklärten unkomplexierten Kristallstruktur von sHER2 der Ratte beinahe die gleiche Konformation. Offenbar wird ein aktivierter Zustand eingenommen, ähnlich wie er von der Bindung des EGF (an der Kluft zwischen Domäne I und III) an den verwandten Rezeptor sHER1 bekannt ist.

- Agency for the Evaluation of Medicinal Products (www.emea.eu.int).

Ein nunmehr klassisches Beispiel ist das Insulin, das als erstes gentechnisch hergestelltes Proteintherapeutikum (Humulin von Genentech) vor mehr als 20 Jahren in den Handel kam. In den üblichen Formulierungen aggregiert natives Humaninsulin zu Dimeren und Hexameren, was eine durchaus erwünschte Depotbildung nach subkutaner Injektion zur Folge hat. Durch Veränderung der Aminosäuresequenz kann die Kinetik der Disaggregation und damit der Zeitverlauf der Bioverfügbarkeit des aktiven Insulins im Blutstrom beeinflusst werden. In den vergangenen drei Jahren wurden zwei Präparate mit gezielt manipulierter Pharmakokinetik zugelassen. „Insulin Aspart“ (NovaLog von Novo Nordisk) und „Insulin Lispro“ (Humalog von Eli Lilly) wirken besonders schnell, da das Insulin-Monomer entweder durch eine einzelne Aminosäuresubstitution, Prolin B28 gegen Asparaginsäure (Aspart), oder durch Permutation von Lysin B28 und Prolin B29 (Lispro) stabilisiert wurde. Demgegenüber verfügt „Insulin Glargine“ (Lantus von Aventis) über

verzögerte Wirkung und eignet sich zur Einstellung einer länger andauernden basalen Hormonkonzentration. Hierbei wurde der isoelektrische Punkt durch Austausch des C-terminalen Asparaginrests der A-Kette durch Glycin sowie Anhängen zweier zusätzlicher Argininreste an die B-Kette erhöht, was die Präzipitatbildung nach der Injektion sogar verstärkt.<sup>8)</sup>

Tenecteplase (TNKase von Genentech bzw. Metalyse von Boehringer Ingelheim), ein gentechnisch veränderter Gewebe-Plasminogenaktivator zur thrombolytischen Behandlung des Herzinfarkts,<sup>7)</sup> ist ein Beispiel für einen enzymatischen Wirkstoff. Das 527 Aminosäuren umfassende Glycoprotein weist zwei Aminosäuresubstitutionen in der „Kringle 1“-Domäne auf (Threonin 103 zu Asparagin und Asparagin 117 zu Glutamin) sowie einen vierfachen Alaninaustausch der Reste 296–299 in der Proteasedomäne, die das Plasminogen in das letztlich fibrinolytisch wirkende Plasmin überführt.<sup>9)</sup> Tenecteplase hat erhöhte Affinität zu Fibrin und zeigt in dessen Gegenwart verstärkte Aktivität, wobei die erhöhte Fibrinspezifität eine verminderte systemische Plasminogenspaltung bewirkt. Zudem führte

das Protein-Engineering zur Resistenz gegenüber dem Plasminogenaktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) sowie zu deutlich verlängerter Plasma-Halbwertszeit, was die Verabreichung durch Bolusinjektion (in einer rasch applizierten Portion) anstelle Infusion gestattet.

Trastuzumab (Herceptin) ist ein „humanisierter“ Antikörper, der gegen den HER-2/neu-Wachstumsfaktorrezeptor (p185<sup>HER-2</sup>) gerichtet ist (Abbildung 1).<sup>10,11)</sup> Seine Komplexbildung mit dem Rezeptor hat dessen beschleunigte Internalisierung zur Folge, wodurch die aggressive Proliferation der Tumorzellen gebremst wird. Die insgesamt sechs Peptidschleifen (CDRs), die die Antigenbindungsstelle des Immunglobulins bilden, wurden gentechnisch von einem zuvor generierten monoklonalen Antikörper der Maus (4D5) auf ein humanes Immunglobulingerüst transplantiert, um Abstoßungsreaktionen im Patienten zu reduzieren. Tatsächlich trat bei 903 untersuchten Patienten nur in einem Fall eine HAHA-Immunantwort (human-anti-humanisierter Antikörper) auf.<sup>12)</sup> Als intaktes Immunglobulin muß dieses Biopharmazeutikum übrigens in Zellkultur produziert werden, um die für die biologische Funktion und lange Serumhalbwertszeit erforderliche Glycosylierung in der Fc-Region zu gewährleisten.

Die Zulassung von Adalimumab (Humira von Abbott) in den USA im Dezember 2002 markiert den Beginn einer neuen Generation von Antikörpertherapeutika.<sup>13)</sup> Adalimumab wurde ursprünglich als rekombinantes Antikörperfragment D2E7 aus einer Phage-Display-Library von humanen Immunglobulingenen, die bei Cambridge Antibody Technology hergestellt worden war, selektiert. Dieser Antikörper bindet das proinflammatorische Cytokin TNF- $\alpha$  (Tumornekrose-Faktor), blockiert dessen Interaktion mit dem TNF-Rezeptor und wird als antagonistischer Wirkstoff zur Behandlung der schweren Rheumatoiden Arthritis (RA) eingesetzt. Im Gegensatz zu den nachträglich durch CDR-Trans-

plantation humanisierten Antikörpern wird Humira aufgrund der Gewinnung seiner Bindungsregion aus einem klonierten menschlichen Gen-Pool als „humaner“ Antikörper klassifiziert, was jedoch nicht dahingehend zu verstehen ist, dass dieses letztlich immer noch rekombinante Biomolekül in dieser Form tatsächlich im menschlichen Immunsystem vorkommt.

Etanercept (Enbrel von Immunex, Vertrieb durch Amgen und Wyeth) ist ein den Antikörpern strukturell verwandter Wirkstoff aus der Klasse der Immunadhäsine, die durch gentechnische Proteinfusion aus dem Fc-Teil eines Immunglobulins und der extrazellulären Domäne eines Rezeptors – oder auch einem anderen Bindungsprotein – hergestellt werden. Etanercept enthält ein Fragment des p75-TNF-Rezeptors und kann damit TNF- $\alpha$  komplexieren.<sup>14)</sup> Die Fc-Region bewirkt endosomales Recycling und damit erheblich verlängerte Serumhalbwertszeit. Aufgrund der bivalenten Natur des Immunadhäsins sowie der trimeren Quartärstruktur des Cytokins werden zudem hochmolekulare Aggregate gebildet, die von Phagozyten aufgenommen werden können. Der Blockbuster Enbrel ist ebenfalls zur Behandlung der RA zugelassen.

Ein weiteres Immunadhäsins, das kürzlich Aufmerksamkeit erregt hat, ist „VEGF-Trap“ (von Regeneron und Aventis). VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ist ein Mediator des Gefäßwachstums nicht nur während der Embryonalentwicklung, sondern auch bei der Tumorgenese. Die zweite extrazelluläre Domäne des hochaffinen VEGF-Rezeptors 1 (Flt-1) wurde in diesem Fall mit der dritten extrazellulären Domäne des niedrigaffinen VEGF-Rezeptors 2 (Flk-1/KDR) und diese wiederum mit der Fc-Region eines IgG fusioniert.<sup>15)</sup> Das entstehende lösliche dimere VEGF-Rezeptorprotein ist mit seiner Dissoziationskonstante im subpicomolaren Bereich konkurrierenden Antikörperpräparaten überlegen. Der VEGF-Antagonist unterbindet nicht nur die Vaskularisierung, sondern zerstört selektiv auch bereits gebil-

te Gefäße in Tumoren. VEGF-Trap befindet sich in klinischen Studien der Phase I für solide Tumoren sowie Lymphome und kommt zudem für Anwendungen in der Ophthalmologie in Betracht.

### Aktuelle Entwicklungen, Ausblick

◆ Die ermutigenden Erfolge der proteinbasierten Wirkstoffentwicklung haben eine Reihe von Forschungsansätzen stimuliert. Im Mittelpunkt steht unter anderem die Proteinglycosylierung, die einerseits für die biologische Aktivität sowie die pharmakokinetischen Eigenschaften zahlreicher Biopharmazeutika essentiell ist, andererseits aber besonderen Aufwand wegen des notwendigen Einsatzes höherer Zellen zur Produktion verursacht. Zudem ist die üblicherweise auftretende Heterogenität der N-Glycosylierung von Asparaginseitenketten ein schwer zu kontrollierender Parameter.

Ein im Hinblick auf die posttranslationale Modifizierung unkonventioneller Lösungsansatz wurde im Fall des „synthetischen Erythropoese-Proteins“ (SEP) beschrieben.<sup>16)</sup> Die 166 Aminosäuren umfassende Polypeptidkette des humanen Erythropoetins (EPO) wurde an zwei der vier natürlichen Glycosylierungspositionen mit negativ geladenen Polymergruppen kovalent derivatisiert (Abbildung 2). Deren Struktur war bezüglich der selektiven Linkerchemie, des resultierenden hydrodynamischen Radius und der für die Rezeptorbindungsfähigkeit günstigen negativen Ladung (pI  $\approx$  5,0) optimiert. Die in ihrer molekularen Zusammensetzung monodisperse und hochdefinierte Substanz zeigte sowohl in Zellkultur als auch im Tiermodell erythropoetischen Effekt, wobei die Serumhalbwertszeit gegenüber rekombinantem EPO zwei- bis dreifach verlängert war. Ob sich dieser künstliche Wirkstoff jedoch in den für eine Marktzulassung erforderlichen Quantitäten auch unter ökonomischen Aspekten synthetisieren lässt, bleibt abzuwarten.

Eine Strategie zur Intervention entzündlicher Prozesse bietet das

Design dominant-negativer Varianten von TNF.<sup>17)</sup> Dieses proinflammatorische Cytokin wird in Form eines Transmembranproteins als Vorläufer synthetisiert und durch Proteolyse als Homotrimer mit 52 kDa freigesetzt. Die anhand der bekannten Raumstruktur geplante Doppelmutante Alanin145-Arginin / Tyrosin87-Histidin zeigt einerseits erheblich verringerte Affinität zu den TNF-Rezeptoren und, im Einklang damit, um mehr als vier Zehnerpotenzen schwächere Aktivierung der entsprechenden intrazellulären Signalwege. Andererseits ist diese Variante zur Bildung von Heterotrimeren mit nativem TNF befähigt, wobei in vitro 80% Austausch innerhalb von 20 min beobachtet wird und eine quasi ideale statistische Verteilung der heterooligomeren Spezies auftritt. Da offenbar schon die Anwesenheit einer einzelnen modifizierten Untereinheit im Trimer mit der biologischen Aktivität interferiert, sollte ein zehnfacher Überschuss der dominant-negativen Variante in mehr als 99% Verlust an funktionellem nativem TNF-Homotrimer resultieren. Tatsächlich konnte mit dieser TNF-Variante, die zwecks verlangsamter Clearance zudem mit Polyethylenglycol (PEG) derivatisiert war, in einem Rattenmodell der Kollagen-induzierten Arthritis ein deutlicher antiinflammatorischer Effekt demonstriert werden.<sup>17)</sup>

Erhebliches Einsatzpotential haben Biopharmazeutika nicht nur bei den Autoimmunerkrankungen, sondern auch in der Onkologie. Während konventionelle Chemotherapeutika ihre toxische Wirkung gegenüber dem Tumor in erster Linie aufgrund dessen schnellerer Zellteilungsrate entfalten, versprechen Proteinwirkstoffe, die gegen Zelloberflächenrezeptoren auf dem malignen Gewebe gerichtet sind, wesentlich höhere Spezifität und damit geringere Nebenwirkungen. Diese Aussichten erklären den Boom in der Entwicklung humanisierter Antikörper in den letzten Jahren mit derzeit etwa vier für die Onkologie zugelassenen Wirkstoffen und mehr



als 400 Produktkandidaten in klinischen Versuchen.<sup>18)</sup> Einen vermutlich bloß vorläufigen Rückschlag erhielt dieser Trend im Jahr 2002 mit dem Debakel um die Zulassung des humanisierten Antikörpers Cetuximab (Erbix von ImClone Systems). Cetuximab ist gegen den EGF-Rezeptor gerichtet, welcher auf einem Drittel aller soli-

den Tumoren überexprimiert wird. Nachlässigkeiten im Zusammenhang mit den klinischen Studien zur beschleunigten Zulassung, die aufgrund der ursprünglich vielversprechenden Daten bei der Behandlung von Dickdarmkrebs und Kopf- und Nackentumoren beantragt worden war, führten zu juristischen Konsequenzen sowie – über die nachtei-

ligen wirtschaftlichen Folgen für das Unternehmen hinaus – zu einer ernüchterten finanziellen Bewertung der Antikörperbranche insgesamt.<sup>18)</sup> Inzwischen präsentierte allerdings die Firma Merck, die die Vermarktungsrechte für Erbitux in Europa besitzt, die Ergebnisse ihrer „BOND“-Studie, welche die Wirksamkeit des Proteintherapeutikums in beeindruckender Weise und wohldokumentiert belegen.<sup>19)</sup> Im Dezember 2003 wurde es in Kombination mit dem Cytostatikum Irinotecan zur Darmkrebstherapie in der Schweiz zugelassen.

Antikörper in ihrer intakten Form als humanisierte Immunglobuline sind im Prinzip als Wirkstoffe einer „ersten Generation“ zu betrachten, die nun den Weg für weiterentwickelte Proteintherapeutika mit erweitertem Profil ebnen. Bei Immunreagenzien der „zweiten Generation“ ist der Fc-Teil des Antikörpers durch andere Proteine ersetzt, die wie im Fall der Immuntoxine neue Effektorfunktionen verleihen.<sup>20)</sup> Die Zellerkennungsfunktion wird hierbei in der Regel durch Single-Chain-Fv-Fragmente vermittelt, die sich besser als die größeren Fab-Fragmente von Antikörpern zur Herstel-

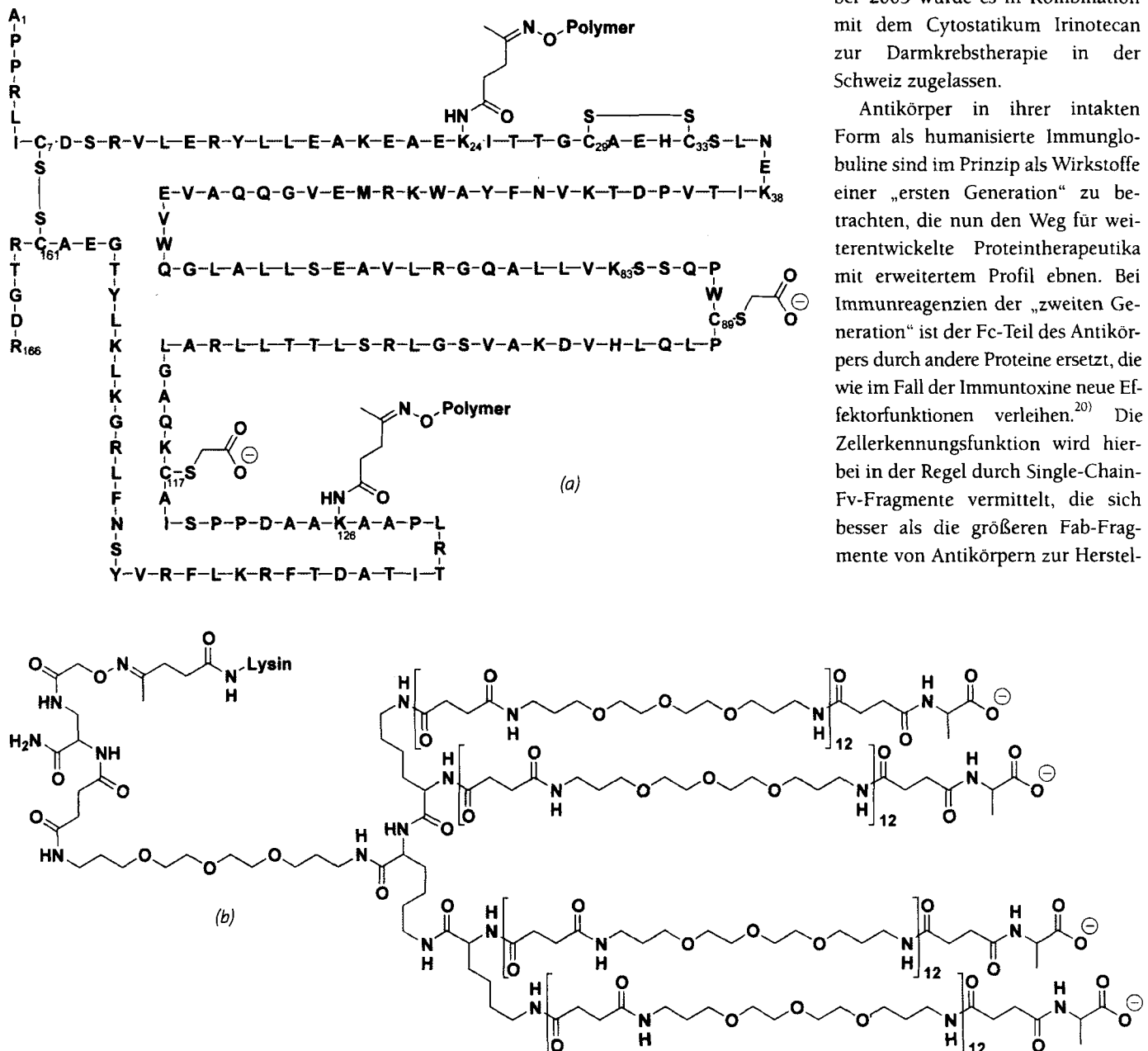


Abb. 2. Primärstruktur des SEP<sup>161</sup> (im Einbuchstaben-Code) mit seinen chemischen Modifizierungen (oben) sowie Aufbau der glycomimetischen artifiziellen Polymerseitenkette (unten). Vier Cysteinreste sind an den beiden intramolekularen Disulfidbindungen (7–161 und 29–33) beteiligt, während zwei weitere Cysteinreste in carboxymethylierter Form anstelle strukturell ähnlicher Glutamatreste (89, 117) eingeführt wurden. Zwei der vier natürlicherweise glycosylierten Aminosäuren (24, 38, 83: N-glycosyliertes Aparagin; 126: O-glycosyliertes Serin) wurden bei der Festphasen-Peptidsynthese durch N-Lävulinyll-Lysin ersetzt und diese anschließend durch Oxim-Ligierung mit dem geeigneten dendrimerartigen Polymer verknüpft. Das komplette Polypeptid wurde schließlich durch Thioester-vermittelte chemische Ligierung aus vier ungeschützten Peptidfragmenten (1–32, 33–88, 89–116 und 117–166) an drei der Cystein-Positionen zusammengesetzt, partiell carboxymethyliert und zur Bildung der Disulfidbindungen oxidiert sowie in die native Konformation gefaltet.

lung von Fusionsproteinen eignen. Allerdings weisen diese minimalen antigenbindenden Immunglobulinfragmente ihrerseits Nachteile in der praktischen Anwendung auf, insbesondere wegen der intrinsisch schwachen Faltungsstabilität und des schwer kontrollierbaren Aggregationsverhaltens. Demzufolge zeichnet sich bereits ein Bedarf für immuntherapeutische Wirkstoffe der „dritten Generation“ ab, die wohl gänzlich auf Antikörperbestandteile verzichten werden und ihre Target-Erkennungsfunktion mit robusteren maßgeschneiderten Bindungsproteinen zuwege bringen. Ein Beispiel für ein geeignetes Protein-Scaffold<sup>21)</sup> bieten die „Anticaline“, die auf der Grundlage menschlicher Lipocalinproteine konstruiert werden.<sup>22)</sup>

Vielversprechende Perspektiven hinsichtlich der vereinfachten Anwendung eröffnen schließlich neuartige Formulierungen, die die nicht-invasive parenterale Verabreichung von Biopharmazeutika ermöglichen. Alternativ zur subkutanen und intravenösen Injektion sind therapeutische Proteine im Prinzip auch über die Schleimhäute der Atemwege, also pulmonal resorbierbar.<sup>4)</sup> Bekanntestes Beispiel ist Exubera, ein inhalierbares Insulin,<sup>23)</sup> das von Aventis und Pfizer gemeinsam vermarktet werden soll. Die Applikation erfordert Aerosole aus 1–3 µm großen Proteinpartikeln, deren Herstellung mittlerweile in einem einstufigen Verfahren durch Sprühtrocknung aus überkritischen Flüssigkeiten gelingt (Inhale/Nektar-Verfahren). Adsorbiert auf Glaskügelchen können sie bis zu zwei Jahre bei Raumtemperatur gelagert werden. Optimierungsbedürftig ist noch die Bioverfügbarkeit, die nur 10–15 % des subkutan injizierten Insulins erreicht,<sup>24)</sup> der Rest geht wahrscheinlich durch Akkumulation bzw. Metabolisierung in Makrophagen verloren.

Nicht zuletzt mit solchen Ausichten auf die Vermeidung der „Spritze“ ist mit dem Einzug wirksamer Proteintherapeutika in den medizinischen Alltag ein Trend eingeleitet, der die Arzneimittelentwicklung insgesamt revolutionieren wird.

**Arne Skerra**  
Lehrstuhl für Biologische Chemie  
Technische Universität München  
skerra@wzw.tum.de  
**Karsten Schürle**  
Informationssekretariat  
Biotechnologie  
Dechema  
schuerle@dechema.de

- 1) P. Buckel, *Recombinant Protein Drugs*, Birkhäuser, Basel, 2001.
- 2) K. Dembowski, P. Stadler, *Novel Therapeutic Proteins – Selected Case Studies*, Wiley-VCH, Weinheim, 2001.
- 3) R. Bazell, *Her-2: The Making of Herceptin, a Revolutionary Treatment for Breast Cancer*, Random House, New York, 1998.
- 4) R. U. Agu, M. I. Ugwoke, M. Armand, R. Kinget, N. Verbeke, *Respir. Res.* 2001, 2, 198.
- 5) S. A. Marshall, G. A. Lazar, A. J. Chirino, J. R. Desjarlais, *Drug Discov. Today* 2003, 8, 212.



**Arne Skerra** (Jahrgang 1961) hat in Darmstadt und München Chemie studiert. Nach seiner Promotion am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität arbeitete er am Laboratory of Molecular Biology in Cambridge, England. Anschließend baute er eine eigene Arbeitsgruppe am MPI für Biophysik in Frankfurt/M. auf. 1994 erhielt er einen Ruf an die TU Darmstadt, wo er die Abteilung Proteinchemie leitete. Seit 1998 ist er Ordinarius an der TU München. 2003 wurde er in den Vorstand der Fachgruppe Biochemie der GDCh gewählt.



**Karsten Schürle** (Jahrgang 1962) studierte Chemie in Darmstadt. Auf die Promotion in Biochemie folgte ein Postdoc-Aufenthalt in Tokyo und Okayama (Japan). Anschließend Fortbildung zum Wissenschaftsjournalisten. Ab 1994 Redakteur bei der Deutschen Krebsgesellschaft, 1996 Wechsel als Referent zum Informationssekretariat Biotechnologie (ISB) bei der Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie (DECHEMA) in Frankfurt/M.

- 6) I. Zipkin, A. Michael, S. Writers, *BioCentury* 1999, 7(70), A1.
- 7) G. Walsh, *Nature Biotechnol.* 2003, 21, 865.
- 8) H. Berchtold, R. Hilgenfeld, *Biopolymers* 1999, 51, 165.
- 9) B. A. Keyt, N. F. Paoni, C. J. Refino, L. Berleau, H. Nguyen, A. Chow, J. Lai, L. Pena, C. Pater, J. Ogez, T. Etcheverry, D. Botstein, W. F. Bennet., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 3670.
- 10) M. M. Goldenberg, *Clin. Ther.* 1999, 21, 309.
- 11) J. S. Ross, K. Gray, G. S. Gray, P. J. Worland, M. Rolfe, *Am. J. Clin. Pathol.* 2003, 119, 472.
- 12) C. A. White, R. L. Weaver, A. J. Grillo-Lopez, *Annu. Rev. Med.* 2001, 52, 125.
- 13) B. Bain, M. Brazil, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2003, 2, 693.
- 14) M. M. Goldenberg, *Clin. Ther.* 1999, 21, 75.
- 15) J. Holash, S. Davis, N. Papadopoulos, S. D. Croll, L. Ho, M. Russell, P. Boland, R. Leidich, D. Hylton, E. Burova, E. Ioffe, T. Huang, C. Radziejewski, K. Bailey, J. P. Fandl, T. Daly, S. J. Wiegand, G. D. Yancopoulos, J. S. Rudge, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 11393.
- 16) G. G. Kochendoerfer, S. Y. Chen, F. Mao, S. Cressman, S. Traviglia, H. Shao, C. L. Hunter, D. W. Low, E. N. Cagle, M. Carnevali, V. Gueriguian, P. J. Keogh, H. Porter, S. M. Stratton, M. C. Wiedeke, J. Wilken, J. Tang, J. J. Levy, L. P. Miranda, M. M. Crnogorac, S. Kalbag, P. Botti, J. Schindler-Horvat, L. Savatski, J. W. Adamson, A. Kung, S. B. Kent, J. A. Bradburne, *Science* 2003, 299, 884.
- 17) P. M. Steed, M. G. Tansey, J. Zalevsky, E. A. Zhukovsky, J. R. Desjarlais, D. E. Szymkowski, C. Abbott, D. Carmichael, C. Chan, L. Cherry, P. Cheung, A. J. Chirino, H. H. Chung, S. K. Doberstein, A. Eivazi, A. V. Filikov, S. X. Gao, R. S. Hubert, M. Hwang, L. Hyun, S. Kashi, A. Kim, E. Kim, J. Kung, S. P. Martinez, U. S. Muchhal, D. H. Nguyen, C. O'Brien, D. O'Keefe, K. Singer, O. Vafa, J. Vielmetter, S. C. Yoder, B. I. Dahiyat, *Science* 2003, 301, 1895.
- 18) T. Gura, *Nature* 2002, 417, 584.
- 19) K. Haan, *BioCentury* 2003, 11(25), A3.
- 20) P. Carter, *Nat. Rev. Cancer* 2001, 1, 118.
- 21) A. Skerra, *J. Mol. Recognit.* 2000, 13, 167.
- 22) M. Vogt, A. Skerra, *ChemBioChem* 2004, 5, 191-199.
- 23) J. S. Patton, J. Bukar, S. Nagarajan, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1999, 35, 235.
- 24) L. Heinemann, A. Pfutzner, T. Heise, *Curr. Pharm. Des.* 2001, 7, 1327.
- 25) H. S. Cho, K. Mason, K. X. Ramyar, A. M. Stanley, S. B. Gabelli, D. W. Denney, Jr., D. J. Leahy, *Nature* 2003, 421, 756.

## Die Wiederentdeckung der RNA

◆ Gerade als die Forscher dachten, sie hätten mit der Sequenzierung des menschlichen Genoms die Rolle der wichtigsten Moleküle der Zelle entschlüsselt, tauchte eine lange missachtete Molekülspezies in einer Vielzahl von unterschiedlichen Formen auf: die RNA. Die lange gehegte Vorstellung, RNA sei lediglich eine Zwischenstufe auf dem Weg von der DNA zum Protein, wurde durch die Charakterisierung und Kristallisation des Ribosoms revidiert.<sup>1)</sup> Neben strukturbildenden Eigenschaften im Ribosom konnten der RNA erstmals „enzymatische“ Funktionen zugewiesen werden.

Erst als zu Beginn der 90er Jahre eine neue Form der Genregulation entdeckt wurde, die auf einer RNA-RNA-Bindung beruht, kam der Verdacht auf, dass RNA weit mehr Funktionen ausüben kann, als bisher angenommen.<sup>2)</sup> Die Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi)<sup>3-7)</sup> und mehrerer hundert kleiner regulatorischer RNAs<sup>8-15)</sup> führt heute zu ei-

nem Umdenken über viele Regulationsprozesse bei der Expression von Genen. Es ergeben sich neue Fragen nach Auswirkungen dieser Regulationsmechanismen auf Krankheiten, deren Entstehung wir bis heute nicht erschöpfend erklären können.

Abhängig von ihrer Entstehung sind diese kleinen RNAs bekannt als short interfering RNAs (siRNAs) oder microRNAs (miRNAs). Sie regulieren die Umschreibung von DNA in Protein meist als Repressoren, indem sie entweder komplementäre Messenger-RNAs (mRNAs) binden und zu deren Abbau beitragen (siRNAs → RNAi) oder durch Bindung z.B. an den 3' nichttranslatierten Bereich (3'-UTR) der mRNA zu einem Stopp der Translation führen (miRNAs → RNAu).<sup>16,17)</sup> (Abbildung 1)

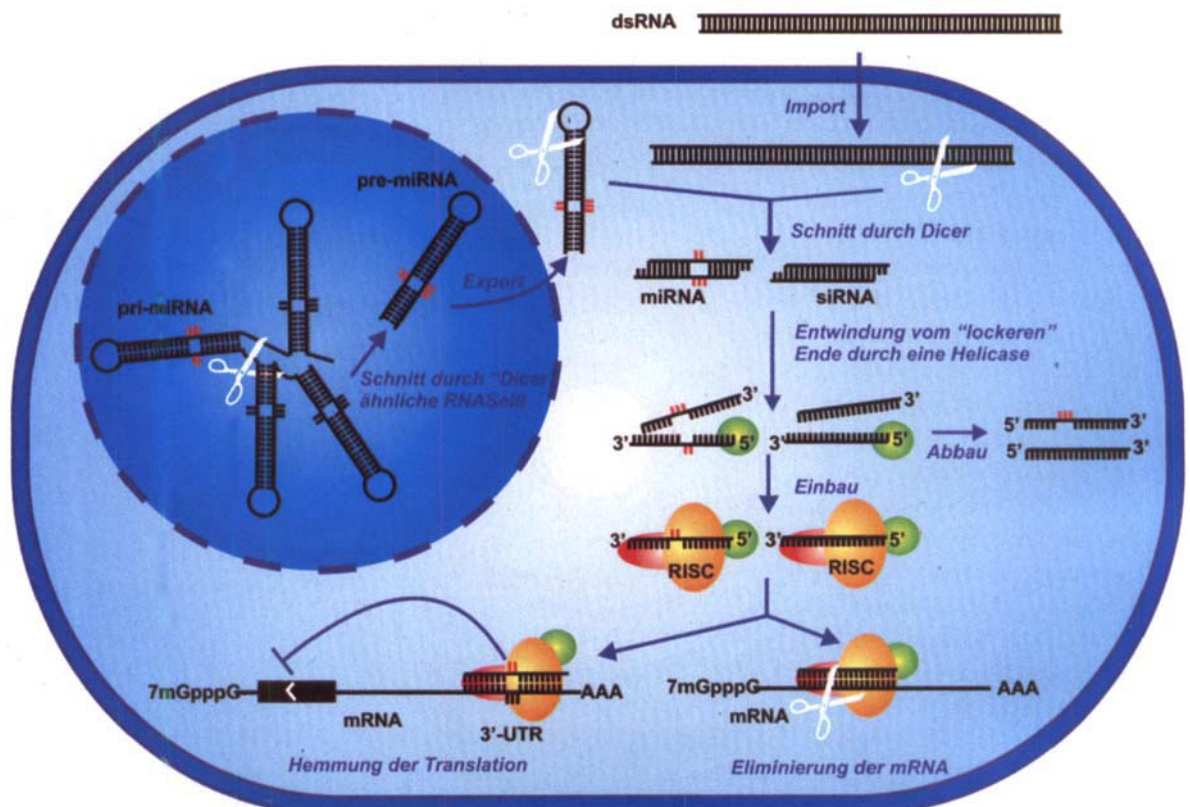
### Short interfering RNAs und RNA-Interferenz

◆ Short interfering RNAs (siRNAs) entstehen bei der Prozessierung von langen, doppelsträngigen RNAs (dsRNA) durch Dicer, einer Nuclea-

se aus der RNaseIII-Familie,<sup>18)</sup> und bilden die aktive RNA-Spezies bei der RNA-Interferenz (RNAi) [s. Trendberichte 2003, *Nachr. Chem.* 2003, 51, 316]. Charakteristische einzelsträngige Überhänge von zwei Nucleotiden an beiden 3'-Enden prägen den siRNA-Duplex von 21 bis 25 Nucleotiden.<sup>7)</sup> Sind solche siRNAs homolog zu mRNAs in der Zelle, so dienen beide Stränge der siRNA als komplementäre Sonden zum Aufspüren dieser mRNAs.<sup>19)</sup> Der doppelsträngige Komplex aus siRNA und mRNA wird durch eine Nuclease vom RNaseIII-Typ geschnitten, was zur Eliminierung der mRNA und zum Stopp der jeweiligen Proteinbildung führt.<sup>20)</sup>

Seit entdeckt wurde, dass sich perfekt paarende siRNAs auch bei Säugetieren dazu verwenden lassen, homologe mRNAs zu eliminieren, wird RNAi zum Ausschalten von Genfunktionen verwendet.<sup>21)</sup> Die Anwendung dieser Technik erstreckt sich von der Analyse von Proteinfunktionen ganzer Genome (Functionomix) bis hin zum Ausschalten von viralen und parasitären Genen sowie von Onkogenen. Die

Abb. 1.  
Nach dem Export aus dem Kern werden partiell doppelsträngige pre-miRNAs und dsRNA von Dicer in 18–25 nt lange miRNA- und siRNA-Duplexe prozessiert. Diese Intermediate werden durch eine Helicase entwunden, die nur einen Strang des Doppelstrangs an den RISC-Komplex übergibt, während der andere abgebaut wird. Der Grad der Basenpaarung entscheidet über die Funktion der Einzelstränge als siRNAs oder miRNAs.



Bedeutung der therapeutischen Anwendungen von RNAi ist noch nicht abzusehen. Sie beschränken sich nicht auf Infektionskrankheiten<sup>22,23)</sup> und Krebs,<sup>24)</sup> auch entzündliche Prozesse, Morbus Crohn und Überfunktionen verschiedener Organe können sich möglicherweise so behandeln lassen.

### Kleine RNAs für die Genregulation: microRNAs

◆ Bereits Anfang der 90er Jahre wurde eine andere Spezies von kleinen, nicht-kodierenden RNAs gefunden, die vermutlich eine erhebliche Rolle bei der Regulation der Differenzierung von Stammzellen spielen können. Eine Mutation in einer sehr kleinen RNA führt zu einer veränderten Genexpression im Fadenwurm *C.elegans*, wie Victor Ambros 1993 entdeckte.<sup>21)</sup> Die Bindung dieser kleinen RNA an das Ende einer messenger-RNA (mRNA) führte zur Stopp der Translation verschiedener mRNAs und damit zur Fehlentwicklung des Wurms. Sieben Jahre später wurde in *C.elegans* eine weitere kleine RNA mit genregulatorischen Eigenschaften gefunden.<sup>25)</sup>

Erst mit der Entschlüsselung der Genome verschiedener Spezies wurde deutlich, dass das Genom Hunderte von kleinen RNAs codiert, deren Bedeutung nicht darin liegt, in Protein umgeschrieben zu werden, sondern die regulatorische Eigenschaften aufweisen. Diese kleinen RNAs besitzen eine Größe von 18 bis 25 Nucleotiden und sind hochkonserviert von der Pflanze bis zum Menschen.<sup>26–28)</sup> Sie werden heute unter dem Begriff microRNAs (miRNAs) zusammengefasst.

Der Mechanismus der miRNA-Biogenese ist weitgehend unbekannt. Sie werden im Zellkern aus langen primären Vorläufer-RNAs (pri-miRNA) geschnitten, die haarnadelförmige Strukturen von etwa 70 Nucleotiden ausbilden (pre-miRNAs) (Abbildung 1). Diese pre-miRNAs verlassen den Zellkern und werden im Cytosol von einer Nuclease weiter bis auf ihre endgültige Länge gestutzt.<sup>27,29)</sup>

### Die Funktion der miRNAs

◆ Sequenzvergleiche von miRNAs mit bekannten Pflanzen-mRNAs ergaben als Zielmoleküle hauptsächlich Transkriptionsfaktoren, die in entwicklungsbiologische Prozesse eingreifen.<sup>28)</sup> Sie regulieren die Genexpression nach einer Zellteilung, bei der zwei unterschiedliche Zellen entstehen (asymmetrische Zellteilung), sowie Zellvermehrung (Proliferation) und Zelltod (Apoptose). *In vivo*- und *in vitro*-Studien in verschiedenen Organismen haben diese Vermutungen bestätigt.

Studien über die Morphogenese von Pflanzenblättern haben gezeigt, dass Mutationen im *CININNATA*-Gen (*CIN*-Gen) eine Kräuselung der Blätter von Löwenmäulchen zur Folge haben,<sup>30)</sup> da die Regulation der Zellteilung im Blatt gestört ist. Das *CIN*-Gen kodiert den Transkriptionsfaktor TCP, der wiederum die Expression verschiedener Gene während der Zellteilung einschaltet. In nicht-teilenden Zellen wird die Bildung von TCP unterdrückt. Die Mutanten mit den deformierten Blättern leiden unter Überproduktion von TCP und können daher die Zellteilung nicht stoppen. Der Überschuss von Zellen am Blattrand bewirkt, dass sich das normalerweise glatte Blatt kräuselt. Weigel und Mitarbeiter zeigten, dass die JAW-miRNA diese Feinregulation der TCP-Bildung auf mRNA-Ebene steuert. Diese bindet durch perfekte komplementäre Basenpaarung an den 3'-nichttranslatierten Bereich (3'-UTR) der TCP-mRNA. Dadurch bildet sich ein ein doppelsträngiges RNA-Fragment, das den Abbau der TCP-mRNA durch Nucleasen erleichtert und die Bildung des Proteins verhindert. Ohne TCP teilen sich die Zellen nicht mehr, und es entwickelt sich ein glattes Blatt.

### miRNAs bei Säugetieren

◆ miRNAs spielen nicht nur eine essentielle Rolle in der Entwicklung von Pflanzen und Invertebraten (Wirbellosen), sondern auch bei Säugetieren wie dem Menschen. Im Gegensatz zur Pflanzenwelt, in der

perfekt paarende miRNAs den Abbau der Ziel mRNA durch einen RNAi-ähnlichen Mechanismus stimulieren, weisen tierische miRNAs in der Regel keine perfekte Basenpaarung mit der Ziel-mRNA auf. Dies erschwert Auffinden von solchen miRNAs und deren Interaktionspartner deutlich.<sup>31,32)</sup> Tierische miRNAs führen durch imperfekte Basenpaarung am 3'-UTR der mRNA zu einem Translationsstopp im Ribosom.

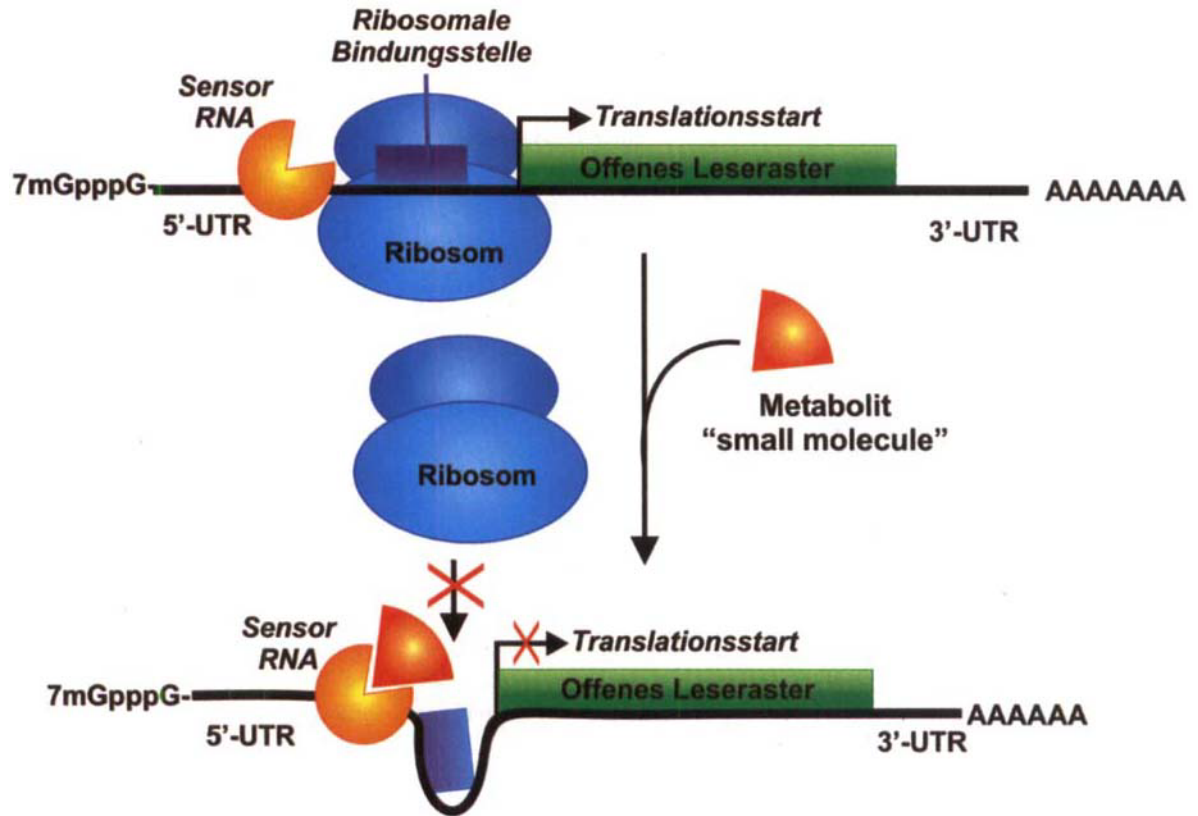
Beim Menschen wurden bisher weit über 200 miRNAs gefunden, deren Funktionen noch unbekannt sind.<sup>8)</sup> Mit der Bedeutung von mi-RNAs bei der Entwicklung von Säugern befassten sich Kawasaki und Taira.<sup>33)</sup> Sie identifizierten mit *HES1* das Zielgen einer miRNA (miR-23). *HES1* ist ein Transkriptions-Repressor und wird hauptsächlich in neuronalen Stammzellen gebildet, wo es die Differenzierung zu neuronalen Zellen verhindert. Durch Bindung an die mRNA von *HES1* blockiert miR-23 dessen Expression und ermöglicht damit eine Differenzierung zu neuronalen Zellen.

### miRNAs und Feinregulation

◆ Wahrscheinlich werden die microRNAs unsere Vorstellung über die Entstehung von Krebs grundlegend verändern. Ein Merkmal von Krebs ist der Verlust der Zellidentität und die unkontrollierte Vermehrung (Proliferation) von Zellen. Bisher herrschte die Ansicht, dass die Anreicherung von Mutationen in der Proteinsequenz von Onkogenen und Tumor-Suppressor-Genen dafür verantwortlich sind, dass Krebs entsteht. Die Identifizierung der miRNAs, die gerade für die Entwicklung von Organismen und Zellhomöostase wichtig sind, könnte diese Auffassung korrigieren. Da die miRNAs die Kontrolle der Zellteilung beeinflussen, kann eine gestörte Regulation der Genexpression in entwicklungspezifischen Genen bei der Entstehung von unkontrolliertem Wachstum eine Rolle spielen, wie neuere Daten zeigen.<sup>13,34)</sup>

siRNAs und miRNAs sind eng miteinander verknüpft, da die Pro-

Abb. 2.  
RNA als Metaboliten-Sensor und Translationsregulator. Die Abbildung zeigt schematisch die Regulation in Riboswitches. Der Metabolit bindet an den 5'-UTR und verändert die Struktur, so dass es nicht mehr zur Anbindung des Ribosoms kommen kann.



zisierung beider Spezies über den gleichen Mechanismus verläuft. Wie dsRNA als Vorläufer der siRNAs, werden auch die Vorläufer (pri-miRNA, pre-miRNA) der miRNAs mit ihren vielen Haarnadelstrukturen als partielle, doppelsträngige RNAs angesehen. Daher liegt eine Beteiligung des RNAi-Mechanismus an der Prozessierung der miRNAs nahe. Sowohl Dicer als auch der RNA-induzierte Silencing-Komplex (RISC) spielen bifunktionale Rollen bei der Regulation der Genexpression (Abbildung 1).<sup>19)</sup> Fehlt Dicer im Organismus reichern sich die langen hairpin-RNAs (pri-miRNAs) in der Zelle an, wodurch es zu unregulierter Zellteilung kommt. siRNAs und miRNAs sind funktionell austauschbar. Nur der Grad der Basenpaarung mit der Ziel-mRNA entscheidet über ihren Abbau oder den Translationsstopp.<sup>31,35)</sup>

#### Natürliche Riboswitches

◆ Eine wesentliche Errungenschaft der letzten zehn Jahre ist die Entwicklung synthetischer RNAs, die durch ihre individuelle Faltung spe-

zielle Funktionen übernehmen. Diese gefalteten RNAs, auch Aptamere genannt, können hypothetisch fast jede molekulare Zielstruktur von Proteinen bis hin zu „small molecules“ binden.<sup>36)</sup> Solche RNAs können so entworfen werden, dass sie enzymatische Eigenschaften besitzen (Ribozyme) und sogar allosterisch durch kleine Moleküle reguliert werden können. Möglicherweise kommen auch in vivo mRNAs vor, die ihre Translation durch kleine Metaboliten zu regulieren können. Warum solche RNAs bisher nicht gefunden wurden, ist unbekannt.

Erst 2002 gelang es Ron Breaker und Mitarbeitern, die erste RNA aus Bakterien zu charakterisieren, die direkt mit kleinen Metaboliten interagieren kann und dadurch die Translation des entsprechenden Proteins reguliert.<sup>37)</sup> mRNAs, die in *E. coli* an der Vitamin-B1-(Thiaminpyrophosphat)-Biosynthese beteiligt sind, können direkt und ohne die Hilfe von Protein-Kofaktoren mit Thiaminderivaten interagieren. Durch Bindung von Thiaminpyrophosphat kommt es zur Umfaltung der mRNA, zur Behinderung der Ribosom-

bindungsstelle und schließlich zum Abbruch der Proteinexpression. Breaker nennt diese Art von direkter Interaktion einen Riboswitch. Warum bisher nur sehr wenige solcher Elemente bekannt sind, liegt an ihrer Herkunft. Es wird spekuliert, dass solche RNA-Kontrollelemente im 5'-nichttranslatierten Bereich (5'-UTR) der mRNA aus einer Zeit in der Entwicklung des Lebens stammen, in der Proteine noch nicht existierten.<sup>38)</sup> Heute sind mehrere Riboswitches in bakteriellen RNAs bekannt (Abbildung 2).<sup>39-43)</sup>

Neben der Entdeckung Hundert von microRNAs, die die Translation von mRNAs durch Bindung an nicht translatierte Bereiche auf verschiedenen Arten regulieren, revolutionieren Riboswitch-Domänen im 5'-nichttranslatierten Bereich von mRNAs das gesamte Feld der RNA-vermittelten Genregulation und öffnen neue Forschungsperspektiven.<sup>44)</sup>

Ute Schepers  
Universität Bonn  
schepers@uni-bonn.de

- 1) N. Ban, P. Nissen, J. Hänsen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* 2000, 289, 905–920.
- 2) R. C. Lee, R. L. Feinbaum, V. Ambros, *Cell* 1993, 75, 843–854.
- 3) A. Fire, S. Q. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* 1998, 391, 806–811.
- 4) A. J. Hamilton, D. C. Baulcombe, *Science* 1999, 286, 950–952.
- 5) S. M. Hammond, E. Bernstein, D. Beach, G. J. Hannon, *Nature* 2000, 404, 293–296.
- 6) P. D. Zamore, T. Tuschl, P. A. Sharp, D. P. Bartel, *Cell* 2000, 101, 25–33.
- 7) S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* 2001, 411, 494–498.
- 8) M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, J. Meyer, A. Borkhardt, T. Tuschl, *RNA* 2003, 9, 175–179.
- 9) M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, W. Lendeckel, T. Tuschl, *Science* 2001, 294, 853–858.
- 10) N. C. Lau, L. P. Lim, E. G. Weinstein, D. P. Bartel, *Science* 2001, 294, 858–862.
- 11) V. Ambros, R. C. Lee, A. Lavanway, P. T. Williams, D. Jewell, *Curr. Biol.* 2003, 13, 807–18.
- 12) R. C. Lee, V. Ambros, *Science* 2001, 294, 862–864.
- 13) J. Brennecke, D. R. Hipfner, A. Stark, R. B. Russell, S. M. Cohen, *Cell* 2003, 113, 25–36.
- 14) L. P. Lim, N. C. Lau, E. G. Weinstein, A. Abdelhakim, S. Yekta, M. W. Rhoades, C. B. Burge, D. P. Bartel, *Genes Dev.* 2003, 17, 991–1008.
- 15) B. J. Reinhart, E. G. Weinstein, M. W. Rhoades, B. Bartel, D. P. Bartel, *Genes Dev.* 2002, 16, 1616–1626.
- 16) J. C. Carrington, V. Ambros, *Science* 2003, 301, 336–338.
- 17) A. M. Denli, G. J. Hannon, *Trends Biochem. Sci.* 2003, 28, 196–201.
- 18) E. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond, G. J. Hannon, *Nature* 2001, 409, 363–366.
- 19) D. S. Schwarz, G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, P. D. Zamore, *Cell* 2003, 115, 199–208.
- 20) A. A. Caudy, R. F. Ketting, S. M. Hammond, A. M. Denli, A. M. Bathoorn, B. B. Tops, J. M. Silva, M. M. Myers, G. J. Hannon, R. H. Plasterk, *Nature* 2003, 425, 411–414.
- 21) C. Arenz, U. Schepers, *Naturwissenschaften* 2003, 90, 345–359.
- 22) J. M. Jacque, K. Triques, M. Stevenson, *Nature* 2002, 418, 435–438.
- 23) C. D. Novina, M. F. Murray, D. M. Dykxhoorn, P. J. Beresford, J. Riess, S. K. Lee, R. G. Collman, J. Lieberman, P. Shankar, P. A. Sharp, *Nat. Med.* 2002, 8, 681–686.
- 24) D. P. Cioca, Y. Aoki, K. Kiyosawa, *Cancer Gene Therapy* 2003, 10, 125–133.
- 25) B. J. Reinhart, F. J. Slack, M. Basson, A. E. Pasquinelli, J. C. Bettinger, A. E. Rougvi, H. R. Horvitz, G. Ruvkun, *Nature* 2000, 403, 901–906.
- 26) C. Llave, Z. X. Xie, K. D. Kasschau, J. C. Carrington, *Science* 2002, 297, 2053–2056.
- 27) Y. Lee, C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim, V. N. Kim, *Nature* 2003, 425, 415–419.
- 28) M. W. Rhoades, B. J. Reinhart, L. P. Lim, C. B. Burge, B. Bartel, D. P. Bartel, *Cell* 2002, 110, 513–520.
- 29) Y. Lee, K. Jeon, J. T. Lee, S. Kim, V. N. Kim, *EMBO J.* 2002, 21, 4663–4670.
- 30) J. F. Palatnik, E. Allen, X. Wu, C. Schommer, R. Schwab, J. C. Carrington, D. Weigel, *Nature* 2003, 425, 257–263.
- 31) G. Hutvagner, P. D. Zamore, *Science* 2002, 1, 1.
- 32) V. Ambros, B. Bartel, D. P. Bartel, C. B. Burge, J. C. Carrington, X. Chen, G. Dreyfuss, S. R. Eddy, S. Griffiths-Jones, M. Marshall, M. Matzke, G. Ruvkun, T. Tuschl, *RNA* 2003, 9, 277–279.
- 33) H. Kawasaki, K. Taira, *Nature* 2003, 423, 838–842.
- 34) M. T. McManus, *Seminars in Cancer Biology* 2003, 13, 253–258.
- 35) A. A. Caudy, M. Myers, G. J. Hannon, S. M. Hammond, *Genes Dev.* 2002, 16, 2491–2496.
- 36) M. Famulok, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1999, 9, 324–329.
- 37) W. Winkler, A. Nahvi, R. R. Breaker, *Nature* 2002, 419, 952–956.
- 38) H. B. White, *J. Mol. Evol.* 1976, 7, 101–104.
- 39) N. Sudarsan, J. K. Wickiser, S. Nakamura, M. S. Ebert, R. R. Breaker, *Genes Dev.* 2003, 17, 2688–2697.
- 40) W. C. Winkler, A. Nahvi, N. Sudarsan, J. E. Barrick, R. R. Breaker, *Nat. Struct. Biol.* 2003, 10, 701–707.
- 41) W. C. Winkler, S. Cohen-Chalamish, R. R. Breaker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 15908–15913.
- 42) D. A. Rodionov, A. G. Vitreschak, A. A. Mironov, M. S. Gelfand, *Nucleic Acids Res.* 2003, 31, 6748–6757.
- 43) J. Vogel, V. Bartels, T. H. Tang, G. Churakov, J. G. Slagter-Jager, A. Huttenhofer, E. G. Wagner, *Nucleic Acids Res.* 2003, 31, 6435–6443.
- 44) G. Elliott, P. O'hare, *Cell* 1997, 88, 223–233.



**Ute Schepers**, Jahrgang 1966, studierte von 1986 bis 1992 Chemie und Biochemie in Bonn und promovierte dort bei Konrad Sandhoff. Von 1998 bis 2000 arbeitete sie als Postdoctoral Fellow und Research Associate an der Harvard Medical School in Boston. Seit ihrer Rückkehr nach Bonn im Jahr 2000 arbeitet sie an ihrer Habilitation über die Kombination von chemischen und genetischen Methoden zur Weiterentwicklung der RNA-Interferenz in Säugtieren.

GDCh

# Beruf- und Karriere-Service

der GDCh



Information

Arbeitsvermittlung

Fördermaßnahmen

Gesellschaft Deutscher Chemiker  
 Karriereservice  
 Postfach 90 04 40  
 60444 Frankfurt am Main  
 Telefon: (069) 7917-665  
 Telefax: (069) 7917-322  
 E-Mail: [karriere@gdch.de](mailto:karriere@gdch.de)