

JOACHIM ENGELS, INSTITUT FÜR ORGANISCHE CHEMIE UND CHEMISCHE BIOLOGIE

Nukleotide und Polypeptide Synthese, Sequenzierung, Struktur und therapeutische Anwendungen

Unsere Kernkompetenz ist die Synthese von DNA und RNA. Wir können sie gezielt verändern um analytische und biologische Anwendungen zu entwickeln. Für die Therapie haben wir synthetische Oligonukleotide konstruiert um Krebs und Viren mit Antisense Oligonukleotiden, Ribozymen, CpG-Oligos und RNAi zu bekämpfen. Für die Analyse entwickelten wir ein neuartiges Konzept der DNA Sequenzierung, das eine schnelle, parallele und exakte Analyse der Struktur erlauben wird. Des weitern ermöglichten wir die Abstandsmessungen in RNA und DNA durch gezieltes Einführen von Spinlabels für EPR Experimente. Auf dem Gebiet der Polypeptide untersuchten wir die Faltung und Sekretion des α -Amylase Inhibitors Parvulostat in *S. lividans*.

RNA INTERFERENZ

Nach der Entdeckung der RNA-Interferenz wurde schnell deutlich, dass sie über ein großes therapeutisches Potential verfügt. Für eine therapeutische Anwendung von siRNAs müssen noch einige Schwierigkeiten überwunden werden. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist die begrenzte Effektivität der siRNAs sowie deren Applikation. Die wichtigsten Gesichtspunkte für eine optimale Wirkung der siRNAs sind eine erhöhte Nukleaseresistenz/Erhöhung der Serumhalbwertszeit, effiziente zelluläre Aufnahme, keine Off-Target Effekte und geringe in vivo Toxizität. Um diese Voraussetzungen erfüllen zu können bedient man sich beim Design und bei der Synthese der siRNAs verschiedener Modifikationen wie z.B. der 2'-Position (siehe Abb. 1).

Verschiedene siRNAs mit unterschiedlichen Modifikationen zeigten ihre suppressive Wirkung in GFP-Expressionsexperimenten [1]. Diese Modifikationen zeigten ebenfalls Aktivität gegen Hepatitis-B-Viren.

CPG

CpG-Oligodesoxynukleotide sind Mimetika viraler oder bakterieller DNA. Sie enthalten ein unmethyliertes Cytidin-Guanosin-Dimer. Im Gegensatz zur mikrobiellen DNA, sind die Cytidine innerhalb von CpG-Motiven im humanen Genom weitgehend methyliert oder durch anschließende Deaminierung zu Thymin mutiert. Das endosomale Protein Toll-like Rezeptor 9 erkennt unmethylierte CpG-Oligodesoxynukleotide und induziert eine Immunreaktion, die zur Behandlung von Krebs, allergischen oder infektiösen Erkrankungen und als Hilfsstoff für Impfstoffe verwendet werden könnte. Um festzustellen, ob die Un-

JOACHIM ENGELS, INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY AND CHEMICAL BIOLOGY

Nucleotide and polypeptide synthesis, sequencing, structure, and therapeutic applications

Our expertise is synthesizing DNA and RNA. We can thus tailor analogues for potentially analytical and biological uses. Their analytical and therapeutic impact can be addressed precisely. For therapeutic purposes modified synthetic oligonucleotides have been constructed to fight cancer and viruses through Antisense oligonucleotides, Ribozymes, CpG-oligos and RNAi. For our analytical focus a novel concept of DNA sequencing will allow fast, parallel, and precise analysis of structure. In addition, distance measurement in RNA and DNA was made possible by introducing spin labels for EPR experiments. In the polypeptide field we have studied the folding and secretion of the α -Amylase inhibitor Parvulostat in *S. lividans*.

The following examples highlight our activities in the field of DNA, RNA and protein research.

RNA INTERFERENCE

RNA interference has recently been described as the innate defense mechanism of eucaryotic cells against double stranded RNA such as viral RNA. Major challenges for successful therapeutic application of RNAi are increased nuclease resistance, efficient cellular uptake, low in vivo toxicity and absence of off-target effects. Besides the use of fluorinated universal bases that are investigated for RNAi application in our group, we have successfully addressed 2'-OH modifications of natural nucleotides overcoming the problems of stability and uptake into specific cells. A large series of 21-mer siRNAs incorporating the modifications below (figure 1) showed high activity in GFP expression experiments [1]. These modifications have proved active e.g. in anti Hepatitis B virus experiments.

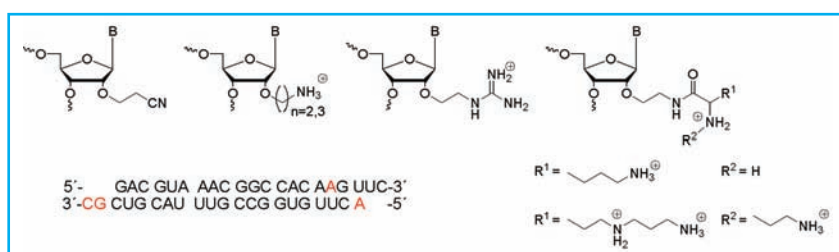


Abb. 1: Sequenz biologisch aktiver siRNA und synthetisierte 2'-OH-Modifikationen

Fig. 1: siRNA sequence and 2'-OH modifications for the marked nucleosides in gene silencing experiments

CPG

CpG deoxyoligonucleotides are mimics of viral or bacterial DNA. They contain an unmethylated cytidine-guanosine (CpG) dimer. In contrast to microbial DNA the cytidines in human genomes are mainly methylated or mutated to thymidine by deamination

of the methylated cytidine nucleotide. The Toll-like receptor 9, an endosomal protein, recognizes the unmethylated CpG-motif and induces an immune response. CpG oligonucleotides have been developed to treat cancer, allergic and infective diseases and as additives for bolstering the tolerance of vaccinations. The aim of our work is to investigate if

terscheidung zwischen methylierter und unmethylierter DNA auf einer starren Proteintasche des Toll-like Rezeptors 9 beruht, die keinen Platz für Substituenten enthält, wurde der sogar etwas größere Iod-Substituent eingeführt. Das iodierter CpG-Oligodesoxynucleotid bewirkte eine Interferon-alpha-Stimulierung in ähnlich großem Ausmaß wie das unsubstiierte CpG-Oligodesoxynucleotid. Dies widerlegt das Modell eines starren Rezeptors. Wahrscheinlich passt sich der Toll-like Rezeptor 9 flexibel seinem Liganden an, wobei der Iod-Substituent im Gegensatz zur Methylgruppe toleriert wird.

the discrimination of methylated and unmethylated CpG-motifs within the active site of the Toll-like receptor 9 is due to a rigid structure that sterically does not allow the presence of any substituent. Therefore a CpG-oligonucleotide was synthesized bearing a 5-iodo modified cytidine residue and tested for its potential of immune response stimulation. Surprisingly it caused an immune reaction similar to that of the unmodified CpG-motif. This disproves the model of an inflexible receptor. It can justly be assumed that the Toll-like receptor 9 has a certain ability to adapt to its ligand whereas the iodo substituent is tolerated in contrast to the methyl group.

FLUORESZIERENDE RNA

Fluorophor markierte RNA ist ein wichtiges Werkzeug in der Bioanalytik (z.B. für Faltungsstudien oder als "molecular beacon"). Unsere Arbeit konzentriert sich auf die Fluorophormarkierung in der 2-Position der Purin-Basen, da die minor groove in einer A-form RNA-Helix besser zugänglich sein sollte. Wir postulieren, dass zwei oder mehrere aromatische Fluorophore (z.B. Pyren) Stapel entlang der Helix bilden können. (siehe Abb. 2).

Die Modifikationen wurden mittels der in unserer Gruppe etablierten "on-column" Sonogashira Kupplung in RNA-Oligomere eingeführt (siehe EPR, Abb. 4). Wir konnten für ein kurzes 10mer Oligonucleotid zeigen, dass bei zweifach pyrensubstituierten Doppelsträngen nach Hybridisierung eine langwelligere Emission auftritt (siehe Abb. 2) [2]. Dieser Effekt kann für Faltungsstudien an RNA benutzt werden.

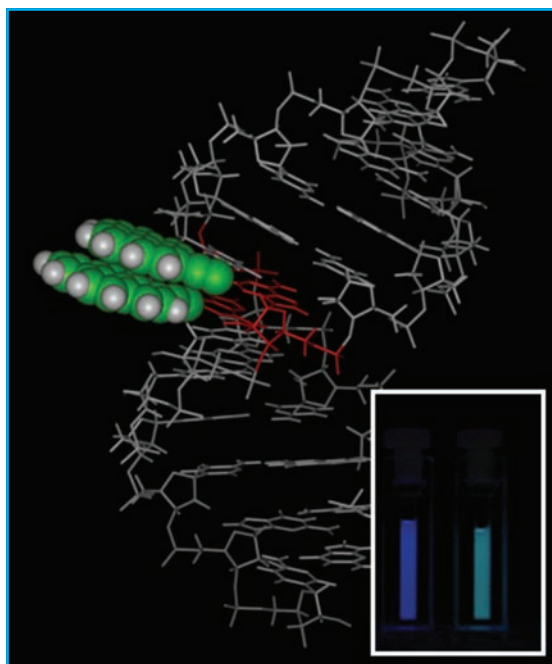


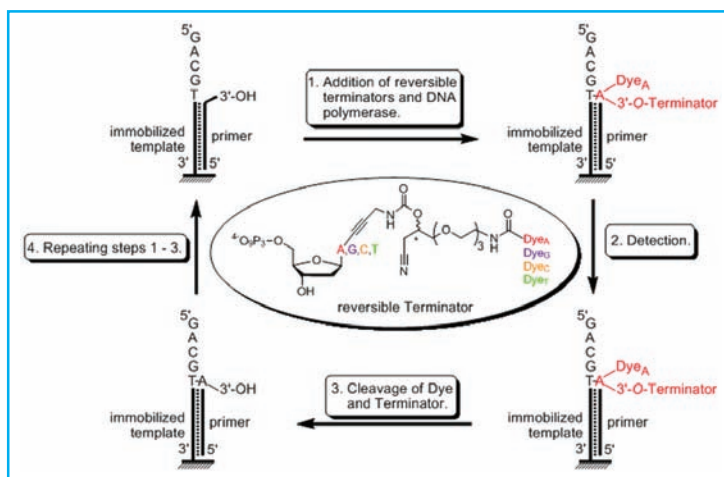
Abbildung 2: Molekulares Modell der pyrensubstituierten RNA; rechts-unten: Küvetten mit Oligonucleotid-Lösungen zur Veranschaulichung der bathochrom verschobenen Emission

Figure 2: molecular model of stacked pyrenes alongside a RNA helix, insert showing bathochromic shift (blue to greenish blue) upon hybridization

DNA-SEQUENZIERUNG

Die Methode des zyklischen, reversibel terminierenden (cyclic reversibly terminating CRT) Sequenzierens hat das Potential um den Ansprüchen an Hochdurchsatzsequenzierung zu genügen. Im Gegensatz zum Sequenzieren mittels der Sanger-Methode, die bis heute fast ausschließlich verwendet wurde, ist keine gelelektrophoretische Trennung notwendig, was einen hohen Grad an Parallelisierung, Zeit- und Geldersparnis ermöglicht. In Abb. 3 ist der Zyklus dieser Methode allgemein dargestellt.

Abbildung 3: Reversibler Terminator und CRT-Sequenzierungszyklus



FLUORESCENT RNA

Fluorescently labeled RNA is a useful tool mostly in RNA analytics (e.g. as molecular beacon or in folding studies). For RNA we focus on the fluorescence labeling in the 2-position of purine bases due to better accessibility in A-form duplexes. We envision that two or more aromatic fluorophores like pyrene might form stacks alongside an A-form helix (see molecular model in figure 2).

The modifications are synthesized according to our well established on-column Sonogashira coupling method (see EPR below, figure 4). For a short model RNA double strand we could show that twofold fluorescently labeled RNA exhibits bathochromic wavelength shifts upon hybridization which is even visible to the naked eye (see insert figure 2) [2]. This effect can be applied to gain insight far and above static observation into time resolved observation of RNA hybridization.

DNA SEQUENCING

Cyclic reversibly terminating (CRT) sequencing has the potential to fulfill the needs of high-throughput sequencing; it does not need gel electrophoretic separation and can be performed in a highly parallel fashion using array immobilized templates which presents an advance compared to Sanger sequencing. A general scheme for cyclic reversible terminating is displayed in figure 3.

A CRT sequencing cycle
Figure 3: reversible terminator for the different nucleobases and CRT sequencing cycle

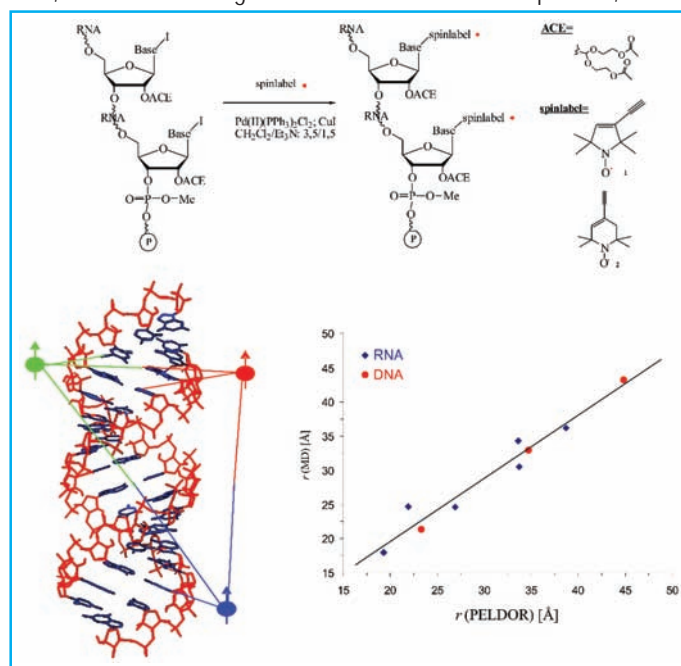


Die zu sequenzierenden Template werden auf einem Träger immobilisiert und mit den Primern hybridisiert, der eigentliche Sequenzierungszyklus besteht aus drei Schritten: (1) Polymerase-vermittelter Einbau des komplementären reversiblen Terminators in den immobilisierten Doppelstrang, (2) Detektion der Fluoreszenzsignale, die jeweils für eine der vier Basen spezifisch sind und (3) Spaltung der terminierenden Gruppe und des Reportermoleküls, um die 3'-OH Funktion wieder herzustellen und die Fluoreszenzsignale der bereits eingebauten Nucleotide zu beseitigen. Die Wiederholung dieser drei Schritte führt schließlich zur Sequenz des Templats.

EPR

Basierend auf dem großen Interesse an der Faltung und der räumlichen Anordnung von Oligomeren für das biologische Verständnis und für die Arzneimittelforschung untersuchen wir die dreidimensionale Struktur von DNA und RNA mittels Distanzmessungen. Eine Möglichkeit Abstände in Lösung zu messen, ist die EPR, dabei werden lange Distanzen zwischen zwei unterschiedlichen, ungepaarten Elektronen ermittelt (Abb. 4). Zur diesem Zweck synthetisieren wir Iod-modifizierte Oligo(desoxy)nukleotide, die während der Festphasensynthese mit verschiedenen Spinlabeln gekuppelt werden ($S=1/2$, ^{14}N und ^{15}N). Nach erfolgreicher Analyse von Model-RNAs und -DNAs wurde diese Methode auch auf biologisch relevante RNA-Fragmente angewendet [3,4].

Abbildung 4: oben: "on-column" Sonogashira-Kupplung mit verschiedenen Spinlabeln; unten-links: molekulares Modell mit drei verschiedenen Spinlabeln; unten-rechts: Korrelation zwischen experimentellen und theoretischen Abstandsmessungen



sists of three steps: (1) DNA polymerase mediated incorporation of the complementary reversible terminator into the immobilized double strand, (2) detection of the fluorescence signals specific for each of the four bases and (3) cleavage of the terminating moiety and the reporter molecule to restore the free 3'-OH group and remove fluorescence signals of already incorporated nucleotides. Repeating these three steps leads to the template sequence. In order to build up a new sequencer the system has to be integrated in a microfluidics system.

EPR

The folding of oligomers and their three-dimensional structure are areas of great interest for biological and medical research. Several methods to get distance information on DNA and RNA in solution are available. EPR can be used to measure long-range distances between different unpaired electrons. For this purpose we introduce different spin labels ($S=1/2$, ^{14}N and ^{15}N) into specific positions by iodo-modified bases in RNA or DNA sequences, via Sonogashira cross-coupling (see figure 4) [3]. Distances between 1.5 and 6 nm were reliably measured. After successfully working with small model-RNAs and DNAs in the A- and B-type, we transferred our labeling via "on column" concept to several biologically relevant RNA constructs [3,4].

PARVULUSTAT

Figure 4: top: on-column Sonogashira coupling and different spin labels; bottom left: molecular model with indicated spin labels for distance measurement; bottom right: correlation between experimental and theoretical data

PARVULUSTAT

Um das sehr interessante Gebiet der Proteinfaltung und Stabilität zu erforschen, mit einem Fokus auf die Disulfidbrücken, ist in unserem Arbeitskreis ein Protein etabliert worden, das wir angelehnt an den weltweit bekannten α -Amylaseinhibitor Tendamistat - Parvulustat (Z-2685) genannt haben; die Struktur wurde mittels NMR-Spektroskopie bestimmt [5]. Zur Untersuchung der Stabilität und Proteinfaltung wurden Inhibitorvarianten erzeugt, in denen jeweils zwei Cysteinreste, die in dem natürlich vorkommendem Parvulustat Disulfidbrücken bilden, durch verschiedene Aminosäuren ersetzt wurden. Die aktiven Inhibitorvarianten wurden in CD- und Fluoreszenz-Experimenten charakterisiert und die thermodynamische und kinetische Stabilität wurde ebenso bestimmt (Abb. 5).

In order to investigate the very interesting fields of protein folding and stability, with a focus on disulfide bridges, our group correctly described (through sequencing) the structure of Z-2685 isolated from *S. parvulus*. We thus baptized it Parvulustat in deliberate analogy to the well known α -Amylase inhibitor Tendamistat as an analogous inhibitor and ascertained its three dimensional structure by NMR [5]. To investigate stability and folding inhibitor variants were produced where the cysteine residues, which form disulphide linkages in the naturally occurring Parvulustat, were replaced by different amino acids. The active inhibitor variants were characterized by CD- and Fluorescence spectroscopy and their thermodynamic stability was determined. By this method a disulphide free Parvulustat will be available for the first time.

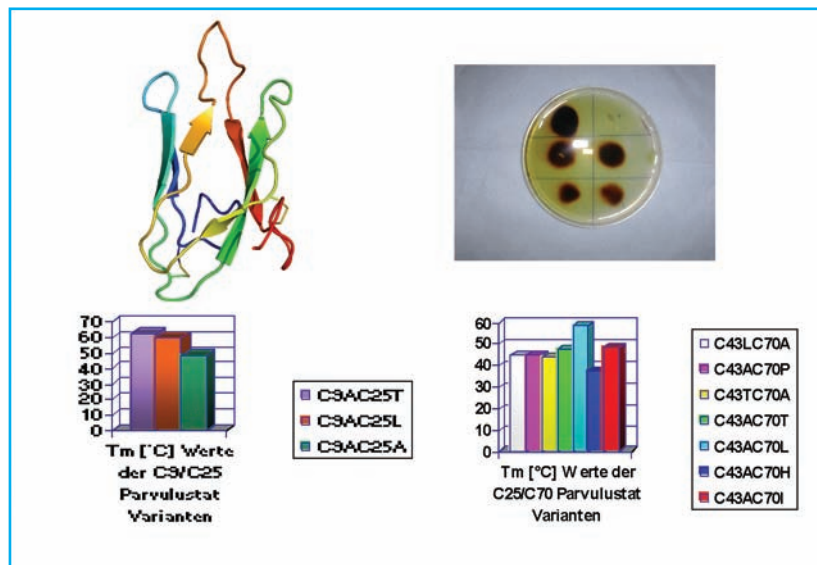


Abbildung 5: Oben links: Parvulustat NMR Struktur (PDB ID code: 2KER); Oben rechts: α -Amylase Platten Test mit der positiven C9AC25L Parvulustat Variante; Unten: Schmelzpunkte der Parvulustat Varianten

Figure 5: top left: Parvulustat NMR structure (PDB ID code: 2KER); top right: α -Amylase plate test with positive C9AC25L Parvulustat variante; down: T_m values of Parvulustat variants

LITERATUR / REFERENCES

- [1] Bramsen, J.B., Laursen, M.B., Bus, C., Hansen, T.B., Langkjær, N., Babu, B.R., Højland, T., Abramov, M., Van Aerschot, A., Odadzic, D., Smcius, R., Haas, J., Andree, C., Barman, J., Wenska, M., Srivastava, P., Zhou, C., Honcharenko, D., Hess, S., Müller, E., Bobkov, G.V., Mikhailov, S.N., Fava, E., Meyer, T. F., Chattopadhyaya, J., Zerial, M., Engels, J.W., Herdewijn, P., Wengel, J., Kjems J (2009) A large-scale chemical modification screen identifies design rules to generate siRNAs with high activity, high stability and low toxicity. Nucl. Acids Res. 2009, 37 (9), 2867-2881
- [2] Grünewald, C., Kwon, T., Piton, N., Förster, U., Wachtveitl, J., Engels, J.W. "RNA as scaffold for pyrene excited complexes" Bioorg. Med. Chem. 2008, 16 (1), 19-26.
- [3] Schiemann, O.; Piton, N.; Mu, Y.; Stock, G.; Engels, J.W.; Prisner, T.F. "A PELDOR-Based Nanometer Distance Ruler for Oligonucleotides" J.Am.Chem.Soc. 2004, 126, 5722-5729
- [4] Schiemann, O.; Piton, N.; Plackmeyer, J.; Bode, B.; Prisner, T. and Engels, J.W., "Spin labeling of oligonucleotides with the nitroxide TPA and use of PELDOR, a pulse EPR method, to measure intramolecular distance", Nature Protocols, 2007, 2, (4), 904-923.
- [5] Rehm, S.; Han, S.; Hassani, I.; Sokocevic, A.; Jonker, H.R.A.; Engels, J.W.; Schwalbe, H. „The High Resolution NMR Structure of Parvulustat (Z-2685) from Streptomyces parvulus FH-1641: Comparison with Tendamistat from Streptomyces tendae 4158" ChemBioChem 2009, 10(1), 119-127

KONTAKT / CONTACT:

Prof. Dr. Joachim W. Engels

Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
 Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie
 Max-von-Laue-Str. 7
 D-60438 Frankfurt am Main

Tel.: ++49 (0)69 798-29150
 Fax: ++49 (0)69 798-29148
 E-Mail: joachim.engels@chemie.uni-frankfurt.de
<http://www.web.uni-frankfurt.de/fb14/engels/>

