

5 DISKUSSION

5.1 Theorie der *in vitro* Selektion

Das Potential von evolutiven Prozessen zur Erzeugung und Optimierung von (bio-) chemischen Funktionen ist in den Naturwissenschaften unumstritten. Während die natürliche Evolution jedoch zur Ausbildung einer derartig reichhaltigen Palette an biologischen Aktivitäten fast fünf Milliarden Jahre zu Verfügung hatte, muss der Experimentator diesen Prozess zielgerichtet innerhalb weniger Wochen bis Monate realisieren [Arnold 1998].

Nukleinsäuren sind für ein solch evolutives und daher irrationales Design unter Laborbedingungen extrem gut geeignet, da sie Genotyp und Phänotyp inhärent in sich vereinigen [Schwienhorst 1999]. Eine supramolekulare Verknüpfung der katalytisch aktiven Funktionsträger mit den genetischen Informationsträger – wie z.B. bei der Verpackung von Proteinen und ihren Genen in Zellen [Drees 1999], Phagen [Smith & Petrenko 1997] oder Liposomen [Tawfik & Griffiths 1998] – ist hier nicht nötig. Dies erlaubt die Bearbeitung vergleichsweise großer Oligonukleotid-Bibliotheken und eröffnet damit die Möglichkeit zur Generierung völlig neuer Funktionen.

Der entscheidende Ausgangspunkt bei der Selektion von katalytischen Nukleinsäuren ist die Konstruktion einer geeigneten Startbibliothek [Wedel 1996]. In ihr muss mindestens eine Kopie des gesuchten Katalysators vorhanden sein. Mit zunehmender Länge des randomisierten Bereiches steigt dabei die Zahl der möglichen Sequenzen exponentiell an – man spricht auch von der kombinatorischen Explosion. Ab einer Länge von 25 randomisierten Positionen ist der sogenannte Sequenzraum, eine mathematische Umschreibung aller möglichen Sequenzen, nicht mehr synthetisch zu realisieren. Da insbesondere komplexere katalytische Aufgaben oft eine größere Struktur der entsprechenden Ribozyme voraussetzen, die aber viele degenerierte Positionen beinhalten kann, ist es dennoch sinnvoll, möglichst lange Sequenzen zu untersuchen. Rein mathematisch kann zudem gezeigt werden, dass viele Struktur motive in längeren Pools besser realisiert werden können als in kleineren Pools gleicher Komplexität [Sabeti *et al.* 1997]. Es wurde daher ein Startpool mit 120 randomisierten Positionen gewählt, der noch mit einer einzelnen Oligonukleotidsynthese erzeugt werden kann. Werden größere Bibliotheken benötigt, muss der Startpool aus mehreren Teilbibliotheken aufgebaut werden.

Um die Repräsentanz von funktionellen Sequenzen innerhalb des Pools zu erhöhen, kann dieser durch partielle Randomisierung mit bekannten Strukturmotiven „gedopt“ werden [Lorsch & Szostak 1994]. Diese Strategie ähnelt der zielgerichteten Evolution von Proteinen, die von bekannten Enzymen ausgeht und diese durch Mutationen, Screening und Rekombination von positiven Genfragmenten zu optimieren versucht [Arnold & Volkov 1999, Minshull & Stemmer 1999]. Da die molekulare Erkennung der Reaktanten Grundvoraussetzung für eine Katalyse ist, wurden in dieser Arbeit daher die bekannten Aptamer-Motive für Adenosinmonophosphat (AMP) [Sassanfar & Szostak 1993] und Nikotinamidmononukleotid (NMN) [Lauhon & Szostak 1995] partiell randomisiert in den Ausgangspool eingeblendet, um so die Bindung potentieller Nukleotid-Reaktanden zu erleichtern.

Für katalytische Nukleinsäuren hat sich das Konzept der direkten Selektion durchgesetzt, da es auf keinerlei rationellen Vorgaben basiert [Breaker 1997b]. Es werden weder Vorstellung zum Katalysemechanismus noch eine Formulierung des Übergangszustandes benötigt. Die Stärke der direkten Selektion – der intramolekular katalysierte „Umweg“ – ist jedoch gleichzeitig der inhärente Nachteil, die Beschränkung eines Reaktanten auf Nukleinsäure. Dieser kann mit dem hier entwickelten Konzept der linkergekoppelten Reaktanten umgangen werden. Die entscheidende Verbesserung ist dabei die Verwendung von Bibliotheken multifunktionaler Nukleinsäure-Reaktanten-Konjugaten [Jäschke & Seelig 2000].

5.2 Modifikation von Nukleinsäuren

Durch die zunehmende Anwendung von Oligonukleotiden als Genmarker [Englisch & Gauss 1991] oder Antisense-Inhibitor [De Mesmaeker *et al.* 1995] besteht ein verstärktes Interesse, die einzigartige molekulare Erkennung von Watson-Crick Basenpaaren mit anderen chemischen Eigenschaften zu kombinieren. Für kleine Oligonukleotide erlaubt dabei das in Abbildung 10 dargestellte Phosphoramiditverfahren die zielgerichtete Modifikation an beliebigen Positionen während der chemischen Synthese [Beaucage & Iyer 1993b]. So hat z.B. die Konjugation mit Fluorophoren die Detektion von Oligonukleotiden erheblich vereinfacht und die Verwendung von radioaktiven Sonden bei Standardprozeduren wie Sanger-Sequenzierung oder Northern/Southern-Blot-Verfahren nahezu überflüssig gemacht. Nukleinsäuren wurden ferner an Chelatoren gekoppelt, um so hochspezifische, künstliche Endonukleasen zu erzeugen [Trawick *et al.* 1998]. Konjugierte Interkalatoren stabilisieren die

Ausbildung von Tripelhelices im Antigene-Ansatz [Thuong & Helene 1993], während mit angekoppelten Crosslinkern DNA/RNA-Protein-Wechselwirkungen untersucht werden können. Nukleinsäure-Modifikationen sind ebenfalls nötig, um die Membranpermeabilität oder Nuklease Stabilität *in vivo* zu erhöhen [Jäschke *et al.* 1994].

Alle bisher genannten Modifikationen basieren auf dem Einbau entsprechender Phosphoramidite und sind auf kleine, chemisch synthetisierbare Oligonukleotide beschränkt. Größere, enzymatisch hergestellte Nukleinsäuren, wie sie für Selektionsexperimente benötigt werden, können nicht auf diese Weise modifiziert werden [Goodchild 1990].

Es wurde daher zunächst eine Methode entwickelt, um Reaktanten in enzymatisch synthetisierte RNA-Transkripte einzuführen. Zur ortsspezifischen, post-transkriptionalen Modifikation bieten sich die Enden der RNA an, wobei enzymatische Transformationen chemischer Derivatisierung wegen schonender Bedingungen und erhöhter Spezifität vorzuziehen sind. Die Konjugation erfolgte daher durch enzymatische Ligation eines synthetischen Dinukleotides an das 3'-Ende der RNA in Analogie zu den bekannten radioaktiven [England *et al.* 1980] und nicht-radioaktiven RNA-Markierungsmethoden [Richardson & Gumport 1983].

Das verwendete Enzym T4-RNA-Ligase benötigt dabei nur ein biphosphoryliertes Cytidin (pCp) als Erkennungsnukleotid und akzeptiert umfangreiche Modifikationen im weiteren 3'-Bereich [Barrio *et al.* 1978]. So können die weiteren Elemente des Linkers (PEG-Spacer, Photospaltstelle, Reaktant) in die RNA eingeführt werden. Das Dinukleotidanalogen selbst wurde, wie oben beschrieben, während der chemischen Synthese modifiziert.

Die T4-RNA-Ligase ist relativ sequenz-unspezifisch und toleriert im Gegensatz zu entsprechenden DNA-Ligasen [Moore & Sharp 1993] die 3'-Endheterogenitäten, die während der T7-Transkription entstehen [Milligan *et al.* 1987]. Im Vergleich mit der zeitgleich entwickelten RNA-Konjugation durch den Einbau von Initiatornukleotiden [Seelig & Jäschke 1997] während der Transkription sind die benötigten Überschüsse an Dinukleotid relativ gering, sodass die benötigten Mengen durch automatisierte Festphasensynthese im präparativen Maßstab hergestellt werden können. Die Ligationstrategie erlaubt zudem die Verwendung weit längerer Spacer, was für eine optimale Anordnung des Reaktanten zur RNA wichtig ist. So reichen z.B. die 18 Ethylenglykol-Einheiten des Linkers 1c aus, um eine ungehinderte Wechselwirkung eines terminal gekoppelten Reaktanten (z.B. AMP in 34b) mit dem Anticodon einer ligierten tRNA zu ermöglichen. Die fünf HEG-Einheiten der Linker 1b, 2b und 3b sind dagegen in der Lage, ca. 30 Basenpaare eines ausgestreckten DNA-Duplexes zu überbrücken [Wong *et al.* 1997]. Ein möglichst langer Spacer ist zudem von Vorteil, um

die lokale Konzentration des angekoppelten Reaktanten im Bezug auf die RNA zu senken. Je länger der Linker, desto eher gleicht die Situation der Konjugate den angestrebten Reaktionsbedingungen mit Reaktanten in freier Lösung, was zu einer erhöhten Bindungsaffinität der selektierten Ribozyme führen und damit eine *in-trans* Katalyse begünstigen sollte. Bei der Wahl des Spacers ist Polyethylenglykol die optimale Wahl wegen seiner chemischen Stabilität, seiner ausgezeichneten Löslichkeits- und Quelleigenschaften in wässrigen und organischen Lösungsmitteln, seiner biologischen Verträglichkeit und wegen der hohen Flexibilität durch die Oxobrücken [Jäschke *et al.* 1993]. PEG ist zudem ein strukturneutraler Spacer und bietet kaum Erkennungsmerkmale für mögliche Ribozyme. Er sollte damit weder bei der Faltung der Ribozyme noch bei der Bindung der Reaktanten eine Rolle spielen. In Verbindung mit Nukleinsäuren wurde PEG und speziell der hier verwendete HEG-Spacer zur Überbrückung von Basenpaaren und als Ersatz von Haarnadelschleifen verwendet [Benseler *et al.* 1993, Thomson *et al.* 1993].

Die Kopplung des Reaktanten an die RNA über einen synthetischen Linker bietet die Möglichkeit, eine selektiv ansteuerbare Spaltstelle einzuführen und so eine Kontrolle über den Reaktionsort während des Selektionsschrittes zu ermöglichen. Zur gezielten Spaltung sind in der Literatur verschiedene Möglichkeiten vorgeschlagen worden. So sind reduktiv spaltbare Disulfidbrücken beschrieben worden [Soukup *et al.* 1995], jedoch erlauben diese keine Variation des Oxidationspotentials und schränken so die Reaktionsbedingungen ein [Sengle *et al.* 2000]. Die gängigen Spaltreaktionen durch saure [Gildea *et al.* 1990] bzw. basische Hydrolyse werden dagegen von RNA nicht toleriert. Aus diesen Gründen wurde die Spaltstelle durch eine photoinduzierbare *o*-Nitrobenzyl-Einheit realisiert [Ordoukhanian & Taylor 1995], wie sie z.B. in der organischen Synthese als Schutzgruppe zur Anwendung kommt [Übersicht: Pillai 1980]. Wegen der extrem schnellen und selektiven Freisetzung werden diese als blockierte „caged“-Intermediate in letzter Zeit auch verstärkt in der Nukleotid-Chemie eingesetzt [Correl & Trentham 1993]. So sind photolytisch aktivierbare Antisense-Inhibitoren und Hammerhead-Ribozyme [Chaulk & MacMillan 1998] beschrieben worden. *o*-Nitrobenzyl-modifizierte Plasmide wurden vor kurzem als photolytisch regulierbare Gene beschrieben [Monroe *et al.* 1999]. Auch bei der affinitätschromatographischen Aufreinigung von synthetischen Oligonukleotiden wurden lichtempfindliche Spaltstellen eingesetzt [Olejnik *et al.* 1996].

Der besondere Vorteil einer Licht-induzierten Freisetzung der selektierten Nukleinsäuren von der Affinitätschromatographie-Festphase besteht in der hohen Stringenz und der breiten Kompatibilität mit verschiedensten Reaktionsbedingungen. Die *o*-Nitrobenzylgruppe erlaubt

die freie Wahl des pH, der Ionenstärke, des Lösungsmittels sowie des Redoxpotentials und ermöglicht so eine Freisetzung unter chemisch identischen Bedingungen wie bei der zuvor durchgeführte Abtrennung der inaktiven Spezies. Diese Strategie der Selektion mit photospaltbaren Linkern führte jüngst zur Isolierung von neuen Aminoacylierungs-Ribozymen [Ruppert & Jäschke, in Vorbereitung] und Michael-Additions-Katalysatoren. Im letzteren Fall wurde die Selektion parallel mit und ohne Photospaltung durchgeführt und es zeigte sich, dass die photolytische Stringenzerhöhung die Anreicherung der gewünschten Spezies um zwei Runden beschleunigte [Sengle & Famulok, pers. Mitteilung].

Während die Modifizierung der RNA-Bibliothek durch Ligation sowie das regiospezifische Selektionskriterium durch Photospaltung in allen Selektionsexperimenten identisch ist, muss die Ankopplung des Reaktanten an die jeweiligen chemischen Bedingungen angepasst werden. Wenn der Reaktant als Phosphoramidit aktiviert oder als entsprechende Festphase vorbereitet werden kann, ist ein Einbau in den Linker direkt während der automatisierten Oligonukleotidsynthese möglich und in der Regel auch vorzuziehen. Oft ist dies jedoch nicht möglich oder mit erheblichem synthetischen Aufwand verbunden, sodass für diese Fälle eine postsynthetische Modifizierungsstrategie entwickelt wurde. Biokonjugationen nutzen dabei vielfach die spezifische Reaktivität einzelner funktioneller Gruppen aus, um unter biokompatiblen Bedingungen selektive Umsetzungen zu ermöglichen [Hermanson 1996]. Hierbei sind vor allem Amino- und Thiol-spezifische Reagenzien, vereinzelt aber auch Imin-Bindungen und Diels-Alder-Reaktionen zu nennen [Faber 1996].

Die hier vorgestellten Amin-modifizierten Dinukleotidanaloga 2a und 2b erlauben die einfache, selektive und effektive Einführung entsprechend vorbereiteter Reaktanten. Die Aktivierung und Umsetzung als NHS-Ester wurde mit Biotin und anhand der Nukleobasen Adenin, Nikotinsäure und Orotsäure gezeigt. Eine *in situ* Aktivierung mit entsprechenden Kopplungsreagenzien, wie sie in der Peptidchemie geläufig sind [Knorr *et al.* 1989] und vereinzelt auch zur Biokonjugation in wässrigem Medium herangezogen wurden [Bannwarth & Knorr 1991], war für die Amin-modifizierten Dinukleotide 2 nicht geeignet. Liegt die Aminkomponente jedoch im Überschuss vor, wie im Falle der Kopplung der Carboxy-modifizierten Dinukleotidanaloga 3, ist eine *in situ* Aktivierung der limitierenden COOH-Gruppe mit EDC möglich. Diese wurde durch Umsetzung mit den amin-funktionalisierten Analoga von Biotin, AMP und ATP gezeigt. Die Konjugationseffizienz war jedoch deutlich geringer und die Aufarbeitung erheblich aufwendiger als bei den zuvor beschriebenen Kopplungsstrategien, sodass die *in situ* Aktivierung nur für Reaktanten in Frage kommt, die

einer separaten Aktivierung nicht oder nur schwer zugänglich sind. Für viele biologisch aktive Substanzen (siehe AMP und ATP) ist dies jedoch der Fall.

5.3 Selektion von Ribozymen

Redox-Katalysatoren spielen im modernen Zellmetabolismus eine zentrale Rolle und machen ca. ein Drittel aller Enzyme eines Organismus aus. Insbesondere bei der zellulären Energiegewinnung durch photosynthetischen Prozesse sind sie unersetzlich zur Umwandlung von solarer in elektrochemische Energie. Die Isolierung eines Photoredox-Ribozyms würde somit nicht nur signifikant die Hypothese einer präbiotischen RNA-Welt unterstützen [Yarus 1999], sondern wäre auch für die Entwicklung zellfreier photosynthetischer Verfahren von Interesse. Um zu untersuchen, ob RNA prinzipiell zur Beschleunigung derartiger Reaktionen in der Lage ist, wurde ein Selektionsexperiment zur RNA-katalysierten Photospaltung der *o*-Nitrobenzyl-Phosphatbindung durchgeführt. Diese verläuft nach dem in Abbildung 17b) gezeigten Mechanismus über eine intramolekulare Redoxreaktion, bei der die Nitrogruppe zur Nitrosogruppe reduziert und der Benzylkohlenstoff zum Keton oxidiert wird. Die Photoreaktion unterscheidet sich somit mechanistisch von der hydrolytischen Phosphodiester-Spaltung von RNA.

Eine Licht-induzierte, RNA-katalysierte Redoxreaktion wäre auch im Hinblick auf die *in vivo* stattfindende UV-Schädigung von DNA von Interesse, die insbesondere für die Entstehung von Haut-Tumoren verantwortlich gemacht wird. Untersuchungen hierzu zeigten bereits, dass DNA zu Photoreaktionen wie Thymidin-Dimerisierung in der Lage ist. Auch die *o*-Nitrobenzylgruppe erfüllt formal alle Kriterien, die zur Wechselwirkung mit Nukleinsäuren nötig sind. Der Benzolring kann zwischen zwei Basen interkalieren, die Nitrogruppe kann als Protonenakzeptor Wasserstoffbrücken z.B. mit der 2'-Hydroxylgruppe der Ribosen ausbilden und das Phosphat als Abgangsgruppe kann durch Mg^{2+} -vermittelte elektrostatische Wechselwirkungen korrekt positioniert werden.

Als Selektionskriterium wurde die Freisetzung von der Festphase nach erfolgreicher Spaltung herangezogen. Trotz einer Gegenselektion wurden dabei statt der gesuchten Photoredox-Ribozyme autokatalytische Phosphodiesterasen erhalten. Diese umgehen das Selektionskriterium, indem sie hydrolytisch eine Phosphatbindung im 3'-Primerbereich spalten. Der so verkürzte Primer ist nach wie vor zur Anlagerung des Primers und damit zur reversen Transkription in der Lage. Es ist anzunehmen, dass die selektierten Sequenzen

alternative Strukturen einnehmen können und so in einer inaktiven Form die Inkubation während der Ligation überstehen. Die erhaltenen Phosphodiesterasen sind im Hinblick auf RNA-Spaltung suboptimal, da die aktivsten Sequenzen während der Gegenselektion entfernt wurden. Zur Selektion von hochaktiven Phosphodiesterasen sollte auf die Protokolle von Breaker [Breaker & Joyce 1994a], Joyce [Santoro & Joyce 1997] oder Eckstein [Vaish *et al.* 1997] zurückgegriffen werden, die durch die in dieser Arbeit entwickelten Konjugationsstrategien erweitert werden könnten.

Der bei der zweiten Selektion beobachtete minimale Anstieg wurde zwar auf einen Lichteinfluss zurückgeführt; er ist jedoch nicht signifikant genug und könnte auch ohne eine RNA-Katalyse erreicht worden sein. Eine Beschleunigung in dieser Größenordnung kann auch durch andere optische Effekte erklärt werden. So wäre es denkbar, dass perfekte RNA-Duplexe angereichert wurden, welche die photospaltbare *o*-Nitrobenzyleinheit um ein vierfaches weniger abschirmen als die zufällig gefaltete RNA-Ausgangs-Bibliothek. Eine ähnliche Abnahme der optischen Quenchung durch RNA wäre z.B. bei der Anreicherung von Polyuridin zu erwarten, das einen geringeren Absorptionskoeffizienten als die anderen Basen hat.

Dass trotz allem keine Photoredox-Ribozyme isoliert werden konnten, lässt vermuten, dass die photolytische Spaltung der *o*-Nitrobenzylgruppe durch die Gegenwart der RNA auf Grund von Quencheffekten eher inhibiert als beschleunigt wird. In der Tat zeigt die *o*-Nitrobenzyleinheit ein ähnliches Absorptionsprofil wie die Nukleotide, wobei letztere wesentlich intensiver sind. Eine Verbesserung der Selektionsbedingungen würde in dieser Hinsicht sicher die Verwendung einer Photospaltstelle auf Nitroveratryl-Basis anstelle der *o*-Nitrobenzyleinheit bringen. Diese enthält wie z.B. in Abb. 8 gezeigt zusätzlich zwei meta- und para-ständige Methoxysubstituenten am Benzylrest, was eine bathochrome Verschiebung und eine erhöhte Photosensibilisierung bewirkt [Yoo & Greenberg 1995]. Da ein Einbau der in Abb. 8 gezeigten Nitroveratryl-Einheiten 15 und 16 durch das Phosphoramidit-Verfahren bisher nicht möglich war, sollte die Verwendung eines 1-Aminoveratryl-Derivates von 10 und dessen Einführung in den Linker durch Amidbindungsknüpfung in Betracht gezogen werden. Dass prinzipiell längerwellige Chromophore in Nukleinsäurekomplexen funktionstüchtig sein können, ist vor kurzem durch photolytische mRNA-Desaktivierung oder durch den Fluoreszenz-Resonanz Energietransfer (FRET) bei DNA-Sonden gezeigt worden [Tyagi & Kramer 1996].

Eine inhärenter Nachteil des hier verwendeten photospaltbaren Linkers liegt in der racemischen Verteilung des zu oxidierenden Kohlenstoffs der *o*-Nitrobenzylgruppe, die in der

ersten Stufe 5 der organischen Synthese des photoaktiven Phosphoramidites 9 entsteht (s. Abb. 7). Da RNA wie alle Biokatalysatoren selbst enantiomerenrein ist und somit ein Enantiomer des Reaktanten bevorzugen würde [Klußmann *et al.* 1996], ist die Konfiguration der Photospaltstelle für die notwendige Hydridabstraktion mit Sicherheit wichtig für die Katalyse. Ein potentiell Photoredox-Ribozym würde somit jeweils nur ein Enantiomer des Linkers effektiv photolytisch spalten, sodass die maximal selektierbaren Konjugate mit den racemischen *o*-Nitrobenzylgruppen um bis zu 50% reduziert wären. Dies ließe sich mit einer enantiomerenreinen Synthese von Dinukleotidanaloga durch den Einbau eines chiral eindeutigen Photophosphoramidites vermeiden.

5.4 DNA-Selektion mit linkergekoppelten Reaktanten

DNA unterscheidet sich von RNA durch das Fehlen der 2'-Hydroxylgruppe, was unter Umständen eine Einbuße in struktureller Hinsicht, mit Sicherheit aber eine eingeschränkte chemische Diversität mit sich bringt [Joyce 1998]. Dieser Unterschied führt andererseits zu einer erhöhten biologischen und chemischen Stabilität, was eine präparative Handhabung von DNA erheblich vereinfacht. Die Erforschung des katalytischen Potentials von DNA ist zudem von Interesse, um unter Umständen Hinweise auf eine aktive Beteiligung von DNA an zellulären Prozessen zu erhalten [Breaker 1997a]. Diese sind vorstellbar bei ungewöhnlich strukturierten DNA-Bereichen wie Holliday-Kreuzungen, Telomeren oder in der Replikationsgabel. Gerade diese DNA-Motive sind unmittelbar assoziiert mit hochrelevanten Phänomenen wie der genetischen Rekombination oder der Zellproliferation.

Um die jüngsten Erfolge in der RNA Katalyse mit dem katalytischen Potential von DNA zu vergleichen, wurde deshalb die Strategie der linkergekoppelten Reaktanten auf DNA erweitert. Dabei ist die Konjugation der DNA-Bibliothek mit potentiellen Reaktanten durch die Verwendung entsprechend modifizierter Primer erheblich einfacher, jedoch entstehen bei der PCR zunächst katalytisch inaktive Duplexe. Alle in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Isolierung einer Einzelstrang-DNA-Bibliothek basieren auf der Verwendung modifizierter Gegenprimer. So wurden bewusst ineffiziente Primer eingesetzt, um durch asymmetrische PCR bevorzugt einen DNA-Strang herzustellen [Ellington & Szostak 1992]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung eines biotinylierten Primers, der die Abtrennung des unerwünschten Gegenstranges durch Affinitätschromatographie erlaubt [Bock *et al.* 1992]. Da die Biotin-Streptavidin Interaktion hier jedoch ebenfalls zur Selektion der reagierten

Konjugate herangezogen wird, ist diese Strategie nicht mit dem Konzept der linkergekoppelten Reaktanten vereinbar. Die Herstellung der ssDNA gelang hier durch Verwendung eines Ribonukleotid-modifizierten Primers, der die selektive Hydrolyse und anschließende gelelektrophoretische Abtrennung der störenden Gegenstränge erlaubt [Silveira & Orgel 1995].

Der gekoppelte Reaktant Anthracen wurde als entsprechendes Phosphoramidit während der chemischen Synthese des modifizierten Primers eingeführt und anschließend durch PCR in die DNA-Bibliothek eingebaut. Durch die Konstruktion einer DNA-Startbibliothek mit gleichem Aufbau und gleicher Komplexität sowie durch Verwendung identischer Reaktions- und Selektionsbedingungen kann die untersuchte Diels-Alder-Reaktion direkt mit der entsprechenden RNA-Selektion verglichen werden [Seelig & Jäschke 1999b]. Da es nicht gelang, entsprechende DNA-Diels-Alderasen zu isolieren, muss angenommen werden, dass RNA zumindest für diesen Reaktionstyp deutlich besser als Katalysator geeignet ist als DNA. Da parallel eine Selektion mit einem hochstrukturierten Motiv durchgeführt wurde, dessen Sequenzraum kombinatorisch vollständig besetzt war, kann ein dem publizierten RNA-Motiv vergleichbares Desoxyribozym ausgeschlossen werden.

Eine Möglichkeit, die katalytischen Fähigkeiten von DNA zu erhöhen, besteht in der Erweiterung der chemischen Diversität [Eaton 1997, Sakthivel & Barbas III 1998]. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass dies durch den Einbau entsprechend modifizierter dNTPs erreicht werden kann. Diese Strategie erscheint um so aussichtsreicher, als in einer vorausgegangenen RNA-Selektion erst bei Einbau von Pyridin-modifizierten Uridinen katalytisch aktive RNA-Diels-Alderasen erhalten werden konnten [Tarasow *et al.* 1999].

5.5 Ausblick

Die hier entwickelte Methode der Selektion mit photospaltbaren Linkern ist prinzipiell für verschiedenste Selektionsexperimente anwendbar und explizit mit einer großen Bandbreite von Reaktanten kompatibel. Mit der vorgestellten Strategie könnten z.B. die Grundlagen einer potentiellen RNA-Welt näher untersucht werden [Bartel & Unrau 1999]. Ein zentraler Aspekt ist hierbei nach wie vor die RNA-katalysierte Synthese von RNA-Bausteinen, den Nukleotiden. Ein solches Ribozym wäre essentiell für einen selbsterhaltenden RNA-Organismus und seine Isolierung würde die RNA-Welt-Hypothese nachhaltig unterstützen. Hierzu sind die Nukleobasen-Konjugate der Dinukleotidanaloga 32a-c geeignet, die durch

Umsetzung mit dem aktivierten Zucker Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) analog der natürlichen Nukleinsäure-Biogenese in die entsprechenden Nukleotide überführt werden können. Die Reaktionsprodukte erwerben dabei die für Ribonukleotide typische 2', 3'-cis-Diolgruppe, über die sie anschließend durch Perjodat-oxidative Immobilisierung [Oh & Pace 1994] oder ein Borsäureaffinitätsgel selektiert werden können [Igloi & Kössel 1985].

Eine weitere essentielle Aktivität der RNA-Welt wäre die Aktivierung von Nukleotiden als Triphosphate. In Selektionsexperimenten hierzu könnte z.B. das AMP-Dinukleotidderivat 34b mit Adenosinmonophosphat als gekoppelten Reaktanten dienen, während das ATP-Derivat 34a ein entsprechendes Reaktionsprodukt darstellt.

Die Entwicklung maßgeschneiderter Katalysatoren ist eines der anspruchsvollsten Ziele in der organischen Synthese. Dabei bieten gerade Enzyme optimale Regio-, Stereo- und Substratspezifität bei milden Reaktionsbedingungen. Ein Vergleich mit den katalytischen Antikörpern lässt erahnen [Schultz & Lerner 1995], wo das Potential von (Desoxy-) Ribozymen liegen könnte. So wurden Antikörper-Katalysatoren für *exo*-Diels-Alder Reaktionen und *anti*-Baldwin-Zyklisierungen generiert, die unter normalen Reaktionsbedingungen kinetisch stark benachteiligt wären [Schultz & Lerner 1993]. Vor kurzem wurden katalytische Antikörper auch erstmals zur stereoselektiven Herstellung einer chiralen β -Hydroxyketon-Vorstufe in einer Epothilon-Synthese eingesetzt [Sinha *et al.* 1998]. Zur Isolierung von vergleichbaren Ribozymen könnte die hier entwickelte Selektion mit photospaltbaren Linkern einen wertvollen Beitrag leisten. Dies gilt insbesondere auch für die Variante der DNA-Selektion, wenn der synthetische Einsatz von Nukleinsäuren größere Mengen an Oligonukleotid voraussetzt [Jäschke *et al.* 1999]. Mit der kürzlich erteilten Zulassung des ersten Antisense-Medikamentes ist die Verfügbarkeit von Nukleinsäuren im Kilogramm- bis Tonnenmaßstab auch für die chemische Synthese denkbar [Persidis 1999, Wells 1999].

Durch die in dieser Arbeit entwickelten Konjugationsmethoden sollte die Modifizierbarkeit von kleinen synthetischen Oligonukleotiden generell auf größere enzymatisch hergestellte oder aus Organismen isolierte Nukleinsäuren übertragbar sein. Dies sollte bei der Suche nach RNA/DNA-Bindungspartnern sowie bei der Untersuchung von deren Interaktion von Nutzen sein. Die beschriebenen Konjugationsmethoden eignen sich insbesondere für eine Anwendung von Aptameren. So wurde ein Aptamer, das für das β -Amyloid der Alzheimer-Krankheit spezifisch war [Ylera-Dahmen 1998], durch Ligation mit dem Dinukleotid 1a biotinyliert. Dies erlaubte eine Immobilisierung an Streptavidin-beschichtete Gold-Nanopartikel und anschließend einen direkten Nachweis der Aptamerbindung durch

Elektronenmikroskopie. Entsprechende Aptamer-Konjugate sollten auch zur Herstellung von Aptamer-derivatisierten Affinitätschromatographie-Säulen oder Nukleinsäure-Chips geeignet sein.

Die Ankopplung von pharmazeutisch aktiven Molekülen an Aptamere stellt außerdem eine Möglichkeit für die zielgerichtete Applikation von Medikamenten dar [Smith *et al.* 1995]. Des Weiteren könnten Puromycin-derivatisierte photospaltbare Dinukleotide die Vorteile von PEG und der Photospaltstelle auch auf die Peptid-Fusionstechnik übertragen, mit der die Prinzipien der *in vitro* Selektion auch auf Peptide übertragen werden können [Roberts & Szostak 1997].

Die Primerderivate 45 und 47 lassen eine interessante Anwendung für die Analyse von DNA-Proben erkennen [Übersicht: Niemeyer & Blohm 1999]. Durch die räumlich getrennte Immobilisierung von PCR-Produkten auf Oberflächen im mikroskopischen Maßstab lassen sich sogenannte DNA-Chips herstellen, die eine (hochparallele) Untersuchung von komplexen Nukleinsäure-Gemischen erlauben [Chee *et al.* 1996]. So kann die Expression und Regulierung der gesamten mRNA im genomischen Maßstab in einem einzigen Experiment verfolgt werden [DeRisi *et al.* 1997].

Wegen der photolytischen Spaltbarkeit der DNA-Konjugate 45 und 47 sowie ihrer PCR-Produkte sind diese zudem speziell für massenspektroskopische Untersuchungen geeignet [Olejnik *et al.* 1998]. Sie könnten – ähnlich wie in Kapitel 4.6.3 beschrieben – auf Oberflächen immobilisiert und für enzymatische Nachweisverfahren benutzt werden (z.B. Sanger-Sequenzierung). Anschließend erlaubt die Laserbestrahlung gleichzeitig sowohl die Freisetzung von der Oberfläche als auch - wie in Abbildung 24a) dargestellt - die MALDI-TOF-Detektion der Primer-Komponente [Hausch & Jäschke 2000a]. Dies sollte für die Hochdurchsatz-Analyse von einzelnen Nukleotid-Mutationen in Genen (single nucleotide polymorphism, SNP) [Koster *et al.* 1998] sowie für ein massenspektroskopisches Sequenzieren von DNA von Vorteil sein [Kirpekar *et al.* 1998].