

# **1 EINLEITUNG**

## **1.1 Biokombinatorik und katalytische Oligonukleotide**

Die Wirkungsweise biologischer Makromoleküle als Enzyme ist eines der faszinierendsten Beispiele der chemischen Katalyse [Thomas 1994]. Durch die Selbstorganisation von Biopolymeren zu funktionellen Einheiten wird die Katalyse aller biologisch relevanter Reaktionen ermöglicht, welche die Grundlage des Lebens bilden [Kirby 1996].

Auch in der organischen Synthese besteht wegen der milden Reaktionsbedingungen und der hohen Regio-, Stereo- und Substratspezifität ein Bedarf am Einsatz von Enzymen. Da natürlich vorkommende Enzyme jedoch in der Regel auf ihre biologische Funktion beschränkt sind und sich für die meisten synthetisch interessanten Reaktionen keine katalytisch wirksamen Substanzen in der Natur finden lassen, wäre die Entwicklung künstlicher Enzyme von großem Nutzen [Tanmaya & Waldmann 1998].

Die Sequenz-Struktur-Wirkungsbeziehungen sind jedoch nach wie vor zu komplex, um eine gezielte Vorhersage gewünschter Eigenschaften oder ein rationelles Design neuer Katalysatoren zu ermöglichen [Corey & Corey 1996]. Da zur Entwicklung neuartiger Enzyme das theoretische Vorwissen nicht ausreicht, muss alternativ auf experimentelle Screeningverfahren zurückgegriffen werden, die sich allein an der katalytischen Wirkung orientieren [Benner 1993, Breaker & Joyce 1994b]. Um dabei die Chance eines zufälligen Auffindens von Katalysatoren zu erhöhen, ist es wichtig, möglichst viele verschiedene Substanzen herzustellen und zu testen [Lam *et al.* 1997, Nefzi *et al.* 1997, Pirrung 1997]. Durch die Methode der kombinatorischen Chemie [Balkenhohl *et al.* 1996, Terrett *et al.* 1995] können effizient hochkomplexe Molekülbibliotheken erzeugt werden, deren theoretische Größe die realisierbare Substanzmenge bei weitem überschreitet (z.B. die vollständige Bibliothek einer 120 Nukleotide langen Sequenz bestehend aus den Nukleotiden Adenosin, Cytidin, Thymin und Guanin würde  $4^{120}$  bzw.  $10^{72}$  Moleküle umfassen und über  $10^{48}$  kg wiegen, realisierbar sind z.Z. aber nur bis zu  $10^{16}$  Oligonukleotide) [Wedel 1996]. Die entscheidende Beschränkung ist jedoch die Charakterisierung der aktiven Substanzen innerhalb der Bibliothek. Die parallele Synthese von Reinsubstanzen erlaubt klassische Testverfahren mit hohem Durchsatz von Millionen von Molekülen [Fodor *et al.* 1991, Lam *et al.* 1991], was insbesondere bei der Herstellung von DNA-Chips zu neuen, interessanten Anwendungen geführt hat [Fodor 1997, Niemeyer & Blohm 1999]. Da man zur Entwicklung neuer Enzyme jedoch weit komplexere Ausgangsbibliotheken benötigt, die nicht mehr als Reinsubstanzen bewältigt werden können, ist man auf zusätzliche Verschlüsselungs-

[Needels *et al.* 1993, Nicolaou *et al.* 1995] oder Dekonvolutionsmethoden [Erb *et al.* 1994, Houghten *et al.* 1991] angewiesen, die nachträglich Auskunft über die Identität der isolierten Moleküle geben können [Kuntz *et al.* 1999]. Die Natur realisiert diese Verschlüsselung in Form von Genen, die für die biologisch aktiven Enzyme, Struktur- oder Regulationsfaktoren kodieren [Liu & Schultz 1999]. Das Screening erfolgt über die essentielle Funktion der Enzyme für die Vermehrung der Organismen und die kombinatorische Diversität wird durch Mutationen ständig neu eingeführt. Der große Vorteil von kombinatorischen Nukleinsäure-Bibliotheken ist, dass sie ihr eigenes Verschlüsselungssystem in sich tragen, so dass die gesuchten Sequenzen enzymatisch millionenfach repliziert werden können [Martin & Schultz 1999]. Dies ermöglicht eine gezielte Selektion nach aktiven Nukleinsäuren *in vitro*, wobei die zugrundeliegenden Prinzipien denen der natürlichen Selektion nach Darwin sehr ähnlich sind [Joyce 1992].

Während die klassische Funktion der Nukleinsäuren in der Speicherung und Weitergabe der genetischen Information liegt, ist seit der Entdeckung der Ribozyme (von Ribonukleinsäure und Enzym) durch T. R. Cech [Kruger *et al.* 1982] und S. Altman [Guerrier-Takada *et al.* 1983] bekannt, dass sich enzymatische Eigenschaften nicht mehr nur auf Proteine beschränken. Auch RNA-Moleküle sind in der Lage, komplexe dreidimensionale Strukturen auszubilden [Egli 1997] und dadurch katalytisch wirksam zu sein [Scott & Klug 1996]. Neben einer Vielzahl von Regulations- und Signalfunktionen [Murray & Jarrell 1999] besteht die biologische Funktion von natürlichen Ribonukleinsäure-Komponenten in der Regel in der Bearbeitung von genetischer Information, wie z.B. bei RNA-Viren (Hepatitis Delta Virus, Hairpin Ribozym), dem Splicen von mRNA (Gruppe I Intron von Tetrahymena [Cech 1990]), der tRNA-Prozessierung durch RNase P [Altman 1990], des RNA-gesteuerten Editierens von RNA [Cavaille *et al.* 1996], der Chromosomenverlängerung durch die Telomerase [Cech 2000] und in der ribosomalen Peptidsynthese [Noller 1991]. Viele dieser Nukleinsäuren wirken in Zusammenarbeit mit Proteinen, wobei die (katalytischen) Funktion dieser Ribonuklein-Protein-Komplexe oft maßgeblich von den Nukleinsäuren übernommen wird. Durch ein detailliertes Verständnis der Ribozyme können diese z.B. für medizinische Anwendungen genutzt werden. So kann gemäß der Watson-Crick Basenpaarungsregel die Erkennungsregion des RNA-schneidenden Hammerhead-Ribozyms [Uhlenbeck 1987] für nahezu beliebige Sequenzen verändert werden [Haseloff & Gerlach 1988], um so in einem modifizierten Antisense- oder Gentherapie-Ansatz gezielt pathogene Proteine auszuschalten [Persidis 1997].

Es wird diskutiert, dass die katalytischen RNA-Komponenten ebenso wie viele Ribonukleinsäure-Kofaktoren Relikte aus einer präbiotischen RNA-Welt sind, die später von der heutigen Protein-dominierten Biosphäre abgelöst wurde [Crick 1968, Orgel 1968]. Diese sogenannte RNA-Welt-Hypothese [Gilbert 1986] postuliert RNA-Moleküle als die ersten Träger des Lebens und stützt sich unter anderem auf die Sonderfunktion von Ribonukleinsäuren, nicht nur als Informationsträger sondern gleichzeitig auch als Funktionsträger wirken zu können [Lewin 1986]. Durch diese Kombination von Genotyp und Phänotyp könnten die ersten, präbiotischen Nukleinsäuren selbstreplizierend gewesen sein und sich damit unabhängig von anderen Stoffklassen (z.B. Proteine) entwickelt haben [Joyce 1989]. Diese Doppelrolle der Nukleinsäuren bildet auch die Grundlage der *in vitro* Selektion.

## 1.2 In vitro Selektion von funktionellen Nukleinsäuren

Mit der Entwicklung der kombinatorischen Chemie konnte 1990 zeitgleich von den Arbeitsgruppen Szostak [Ellington & Szostak 1990], Gold [Tuerk & Gold 1990] und Joyce [Beaudry & Joyce 1990] gezeigt werden, dass der duale Charakter von Nukleinsäuren genutzt werden kann, um durch künstliche Evolution Oligonukleotide mit neuen Eigenschaften zu generieren, die in der Natur nicht vorkommen.

Dieses ursprünglich zur Selektion spezifischer Liganden (Aptamere) entwickelte Verfahren, auch als SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) bezeichnet [Tuerk & Gold 1990], basiert auf einer systematischen, iterativen Anreicherung von spezifisch bindenden oder katalytisch aktiven Nukleinsäuren, ausgehend von einer kombinatorischen Nukleinsäure-Bibliothek (Pool). Dabei wird deren dualer Charakter ausgenutzt, um zunächst nach aktiven Molekülen zu selektieren, die anschließend amplifiziert werden können. Diese Möglichkeit zur Vervielfältigung der aktiven Spezies ist der entscheidende Vorteil gegenüber anderen Stoffklassen und Screeningverfahren, der es erlaubt, mehrere Selektions- und Amplifizierungsschritte hintereinander durchzuführen (Abb. 1) [Famulok & Szostak 1992]:

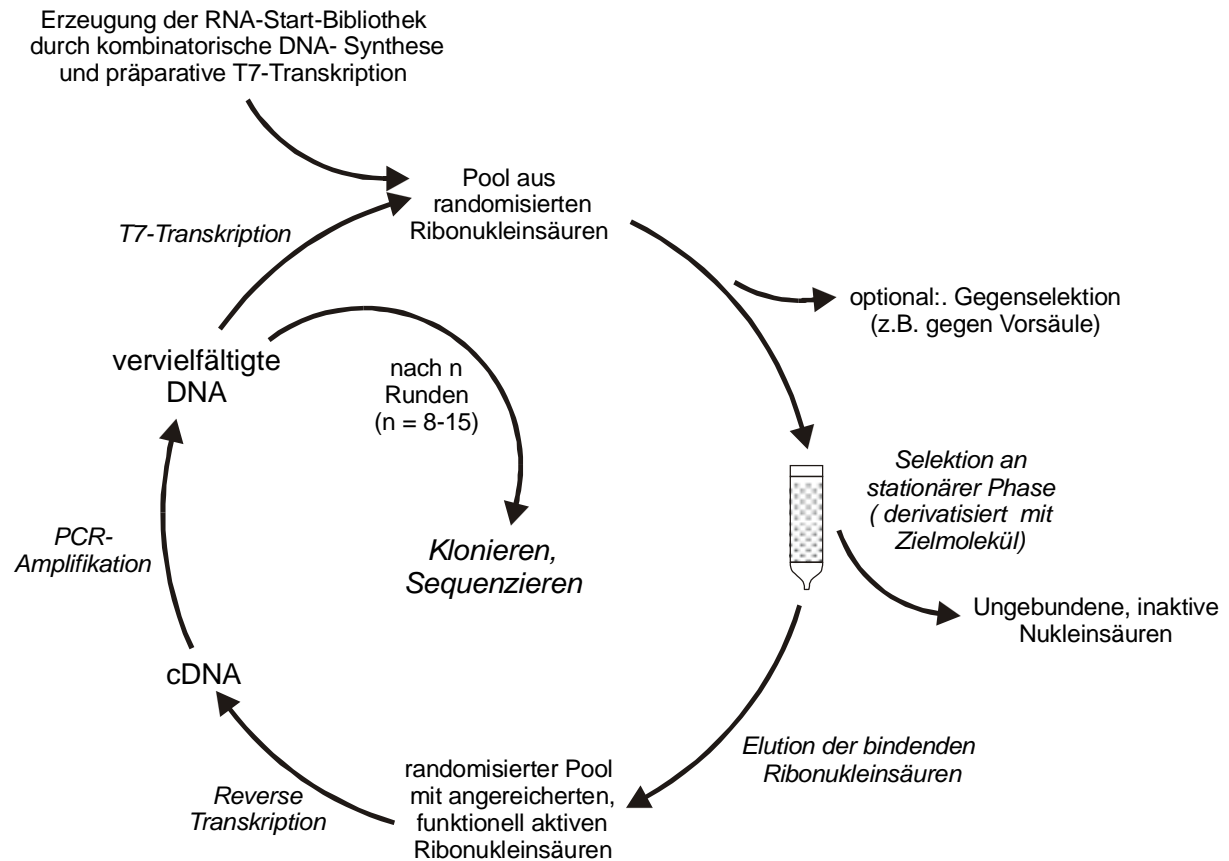


Abb. 1 Schema zur *in vitro* Selektion von hochaffinen Liganden (Aptamere); T7- und Reverse Transkription sind zusätzliche Schritte, wenn RNA-Bibliotheken untersucht werden.

Zunächst wird durch kombinatorische Synthese ein Startpool mit bis zu  $10^{16}$  einzelnen Sequenzen erzeugt, unter denen sich zufällig auch einige wenige Spezies mit den gewünschten Eigenschaften befinden. Dazu wird während der automatischen DNA-Synthese ein Gemisch der vier Nukleobasen eingesetzt, die statistisch in einen randomisierten Bereich eingebaut werden (Abb. 2). Die aktiven Moleküle in der Bibliothek werden nun durch Affinitätschromatographie aufgereinigt. Im Falle von spezifischen Bindern (auch als Aptamere bezeichnet, von lat. *aptus* = passend) wird dabei ein Säulenmaterial verwendet, das mit den Zielmolekülen beladen ist, für die spezifisch bindende (hochaffine) Liganden gesucht werden [Ciesiolka *et al.* 1996]. Dadurch werden bevorzugt die hochaffinen Aptamere am Säulenmaterial zurückgehalten und können anschließend unter denaturierenden Bedingungen oder durch kompetitive Elution mit freiem Zielmolekül wiedergewonnen werden. Die so angereicherten aktiven Oligonukleotide können durch Polymerasenkettenreaktion (PCR) amplifiziert werden, wobei im Falle von RNA-Bibliotheken diese erst in DNA umgeschrieben und nach der Amplifizierung durch T7-Transkription wieder in RNA zurückübersetzt werden müssen.

Da ein einzelner Selektionsschritt aufgrund von unspezifischer Adsorption oder statistischer Hintergrundreaktion nur eine 100-1000fache Anreicherung erlaubt, sind die gesuchten Sequenzen nach wie vor stark unterrepräsentiert. Daher muss der Zyklus von Selektion und Amplifikation mehrfach (typischerweise ca. 5-15 mal) wiederholt werden, bis die seltenen gewünschten Spezies die Poolpopulation dominieren. Die Isolierung und Charakterisierung kann dann durch konventionelle Methoden wie Klonieren und Sequenzieren erfolgen [Osborne & Ellington 1997].

Die Mehrheit der beschriebenen Selektionsexperimente für hochaffine Liganden hatten biologisch relevante Moleküle als Ziel und waren hauptsächlich gegen Proteine und Peptide, aber auch gegen komplexe Strukturen wie Phagen, Zellen oder Organbestandteile gerichtet [Übersicht: Gold *et al.* 1995]. Zum Teil sind diese Aptamere als Inhibitoren [Dang & Jayasena 1996], Antagonisten [Lee & Sullenger 1997] oder Kontrastmittel [Charlton *et al.* 1997] für eine pharmazeutische Anwendung in der klinischen Testphase [Übersicht: Famulok & Jenne 1998]. Auch für eine Reihe von kleinen, chemisch anspruchsvollen Zielmolekülen konnten spezifisch bindende Oligonukleotide mit Bindungskonstanten im submikromolaren Bereich gefunden werden, darunter Aminosäuren (Arginin, Valin), Kofaktoren (Biotin, Cyanocobalamin), Nukleotidanaloga (ATP, Riboflavin, Theophyllin), Glykosid-Antibiotika (Neomycin, Kanamycin, Tobramycin) und organische Farbstoffe [Übersicht: Jäschke *et al.* 1999].

Um die für den in Abb. 1 gezeigten Kreisprozess notwendigen enzymatischen Umwandlungen zu ermöglichen, müssen die Nukleinsäuren neben den randomisierten auch konstante Bereiche enthalten:

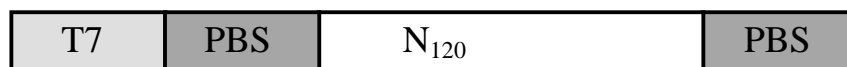


Abb. 2 Aufbau einer typischen DNA-Bibliothek zur *in vitro* Selektion  
PBS: konstante Primerbindungsstellen für PCR; N<sub>120</sub>: randomisierter Bereich (hier mit 120 Nukleotiden),  
T7: T7-Promotor zur Übersetzung in RNA-Bibliotheken, denen anschließend diese Promotorsequenz fehlt.

Dabei ermöglichen die konstanten Primerbindungsstellen die Hybridisierung der Primer für die reverse Transkription der RNA in DNA und deren anschließende Amplifizierung durch PCR (s. Abb. 1). Bei der Selektion nach RNA-Molekülen muss die DNA-Bibliothek zusätzlich eine Erkennungsregion für die T7-RNA-Polymerase - den sogenannten T7-Promotor - enthalten, um sie durch Transkription in RNA umschreiben zu können [Milligan *et al.* 1987].

Wie schon erwähnt, repräsentiert der Startpool in der Regel nur einen Bruchteil der theoretisch möglichen Sequenzen, in unserem Beispiel  $10^{15}$  von  $10^{72}$  Möglichkeiten (s. 1.1). Die aus einem solchen Pool erhaltenen Sequenzen sind daher höchstwahrscheinlich suboptimale Lösungen, können aber als guter Ausgangspunkt für eine Verfeinerung durch *in vitro* Evolution dienen. Bei dieser Variante der *in vitro* Selektion wird – wie in der Natur – in jeder Runde neue Diversität erzeugt, indem man die Amplifizierung mit mutagener PCR durchführt [Fromant *et al.* 1995]. So werden durch die Vervielfältigung mit fehlerhaft arbeitenden Polymerasen stets neue, leicht veränderte Sequenzen mit z.T. verbesserten Eigenschaften erzeugt, wodurch die gewünschten Eigenschaften wie Bindungsstärke oder –spezifität um mehrere Größenordnungen verbessert werden können [Szostak 1993].

Der kritischste und entscheidende Faktor bei einem Selektionsexperiment ist die Kontrolle über das richtige Selektionskriterium, auch als Stringenz bezeichnet. Experimentelle Gegebenheiten schränken eine exakte Suche ein, sodass sich Nukleinsäuren mit unerwünschten Eigenschaften durch spezifische Adsorption, Bindung an nicht-native Konformationen, Nebenreaktionen, überdurchschnittliche Amplifizierbarkeit etc. anreichern und die gesuchten Spezies unterdrücken können. Zudem unterliegen die Oligonukleotide zusätzlichem durch das Selektionsschema bedingtem Selektionsdruck, indem sie z.B. amplifizierbar sein müssen. Eine Möglichkeit, die Stringenz zu erhöhen, z.B. durch Unterdrückung der unspezifischen Bindung, wird als Gegenselektion bezeichnet. Dabei werden unerwünschte Moleküle mit negativen Eigenschaften aktiv abgereichert, indem z.B. vor dem eigentlichen Selektionsschritt eine Vorsäule eingeschaltet wird, die nicht mit Zielmolekülen beladen ist. So können Säulenbinder, die eine unerwünschte Affinität zum unmodifizierten Säulenmaterial haben, explizit herausfiltert werden (s. Abb. 1). Dieses Prinzip kann auch zur Verbesserung der Spezifität der isolierten Liganden herangezogen werden. So konnten gezielt RNA-Moleküle „gezüchtet“ werden, die mit 10000facher Diskriminierung zwischen Koffein und Theophyllin unterscheiden, obwohl sich diese nur in einer Methylgruppe unterscheiden [Jenison *et al.* 1994].

Ein geeignetes Selektionskriterium ist auch die Hauptschwierigkeit bei der Suche nach katalytischen Nukleinsäuren. Nach den Theorien von Haldane [Haldane 1930] und Pauling [Pauling 1946] kann Katalyse als Spezialfall einer Bindung des Übergangszustands angesehen werden, der dadurch energetisch abgesenkt wird. Dieses für katalytische Antikörper [Lerner *et al.* 1991, Schultz 1989] so erfolgreiche Konzept kann auf Nukleinsäuren übertragen werden, wenn gegen geeignete Übergangszustandsanaloga selektiert wird [Übersicht: Prudent & Schultz 1996]. So konnten Katalysatoren für eine Biphenylisomerisierung [Prudent *et al.*

1994], eine Metallierung [Conn *et al.* 1996] und eine Esterhydrolyse [Chun *et al.* 1999] gefunden werden, jedoch war die beobachtete Beschleunigung deutlich langsamer als die der katalytischen Antikörper oder der natürlichen Ribozyme. Zudem ist es nicht immer möglich, ein geeignetes Übergangszustandsanalogon für eine Reaktion zu formulieren und zu synthetisieren [Morris *et al.* 1994].

### 1.3 Direkte Selektion von Ribozymen

Während bei der Selektion von Aptameren deren Eigenschaft der spezifischen Bindung unmittelbar als Selektionskriterium genutzt werden kann, ist ein Hauptmerkmal von Katalysatoren, dass sie unverändert aus der Reaktion hervorgehen. Die katalytische Beschleunigung einer Reaktion kann daher zunächst nicht als Selektionskriterium herangezogen werden. Befinden sich das katalytische Zentrum und das Substrat jedoch im selben Molekül, dann stellt die katalytisch bevorzugte Reaktion der Substratregion eine bleibende Veränderung auch des Katalysators dar, über die dieser dann selektiert werden kann. Da durch diesen Umweg der intramolekularen Katalyse direkt die katalytische Aktivität selektierbar wird, spricht man hier von *direkter* Selektion als Spezialfall der *in vitro* Selektion [Bartel & Szostak 1993]:

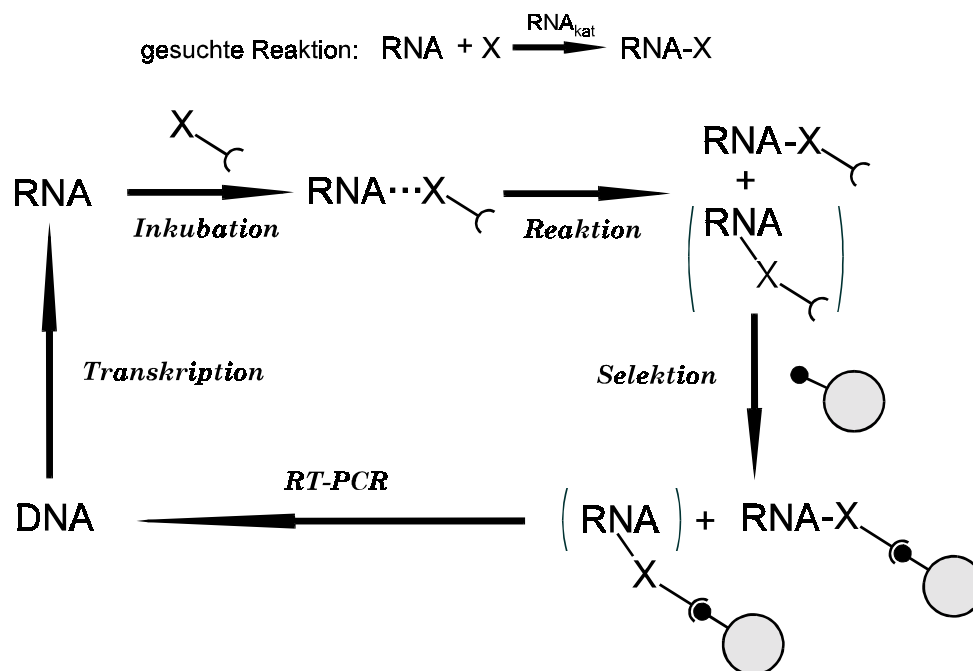


Abb. 3 Schema der direkten Selektion

X: freier Reaktant; in Klammern: mögliche Produkte durch Nebenreaktionen;

: derivatisierte Festphase (z.B. Streptavidin-Agarose); : Ankergruppe (z.B. Biotin);

Auf der Suche nach Katalysatoren für die Reaktion  $\text{RNA} + \text{X} \longrightarrow \text{RNA-X}$  wird der randomisierte RNA-Pool mit dem Reaktanten X inkubiert, der zur einfacheren Aufreinigung eine Ankergruppe (z.B. Biotin, s. Abb. 3) als Erkennungsmerkmal tragen kann. Da bevorzugt die RNA-Moleküle reagieren, die autokatalytisch aktiv sind, unterscheiden sich nach der Reaktion die aktiven Spezies von den inaktiven durch die kovalente Verknüpfung mit dem zweiten Reaktanten. Zur Abtrennung der inaktiven Moleküle können direkt die Eigenschaften des Reaktanten oder die Eigenschaften der mit eingeführten Ankergruppe herangezogen werden (im Fall von Biotin als Ankergruppe z.B. durch spezifische Immobilisierung mit einer Streptavidin-Festphase, s. Abb. 3). Die Amplifizierung der selektierten Moleküle erfolgt dann enzymatisch wie schon in Abb. 1 gezeigt [Tsang & Joyce 1996]. Nach erfolgreicher Selektion von selbstmodifizierenden RNAs ist es z.T. möglich, die Substratdomäne und das katalytische Motiv in unabhängige Sequenzabschnitte zu trennen und somit die gefundene Ribozymaktivität durch rationales Design auf eine intermolekulare Katalyse zu erweitern [Übersicht: Burgstaller & Famulok 1995].

Mit der direkten Selektion durch Selbstmodifizierung konnten erstmals künstliche Ribozyme erhalten werden, die unter anderem die Ligation [Bartel & Szostak 1993, Landweber & Pokrovskaya 1999, Rogers & Joyce 1999], Phosphorylierung [Lorsch & Szostak 1994], Aminoacylierung [Illangasekare *et al.* 1995] und Alkylierung [Wilson & Szostak 1995] von RNA katalysieren. Bei allen diesen Reaktionen ist jedoch mindestens ein Reaktionspartner immer ein RNA-Molekül (s. Abb. 2 und 3). Dies ist die Folge des Selbstmodifizierungskonzepts, da die Reaktion der RNA das Selektionskriterium darstellt. Folglich ist die konventionelle direkte Selektion auf die Katalyse von Reaktionen beschränkt, in denen mindestens ein Reaktionspartner die RNA selbst ist. Katalysatoren für Reaktionen zwischen zwei kleinen, organischen Verbindungen, die von zentraler Bedeutung sowohl für die organische Chemie als auch für den Metabolismus von Organismen sind, können daher nicht ohne weiteres mit der direkten Selektion gefunden werden [Übersicht: Lorsch & Szostak 1996, Williams & Bartel 1996].

Die Doppelfunktion der RNA als Substrat und Katalysator senkt zusätzlich die Stringenz der direkten Selektion. Die Randomisierung, durch die ursprünglich einzelne Sequenzen mit katalytischer Aktivität erzeugt werden, beeinflusst zusätzlich auch die Reaktivität der Substrate. Die Selektion erfolgt daher primär nach guten Substraten und nur indirekt nach katalytischer Aktivität. Gute Enzyme, die aber gleichzeitig schlechte Substrate sind, gehen verloren.



In einer Variante der direkten Selektion wurden modifizierte Nukleotide in die Nucleinsäuren eingebaut, um so Katalysatoren zu isolieren, die Reaktionen an den entsprechenden unnatürlichen Funktionalitäten beschleunigen. Diese waren jedoch nach wie vor Bestandteil von Oligonukleotiden und außerhalb dieses Kontextes konnte keine katalysierte Reaktion der unnatürlichen funktionellen Gruppen beobachtet werden [Wecker *et al.* 1996]. Der Ansatz zeigte aber einen möglichen Ausweg, um die direkte Selektion auf zwei beliebige Reaktanten zu erweitern.

### 1.4 Selektion mit linkergekoppelten Reaktanten

Um die Beschränkungen der direkten Selektion zu überwinden und sie auf die Katalyse RNA-fremder Reaktionen zu erweitern, wurde in der Arbeitsgruppe Jäschke die Selektion mit linkergekoppelten Reaktanten entworfen. Sie basiert auf der Verwendung von Nucleinsäure-Konjugat-Bibliotheken an Stelle von unmodifizierten Oligonukleotiden [Jäschke 1998]:

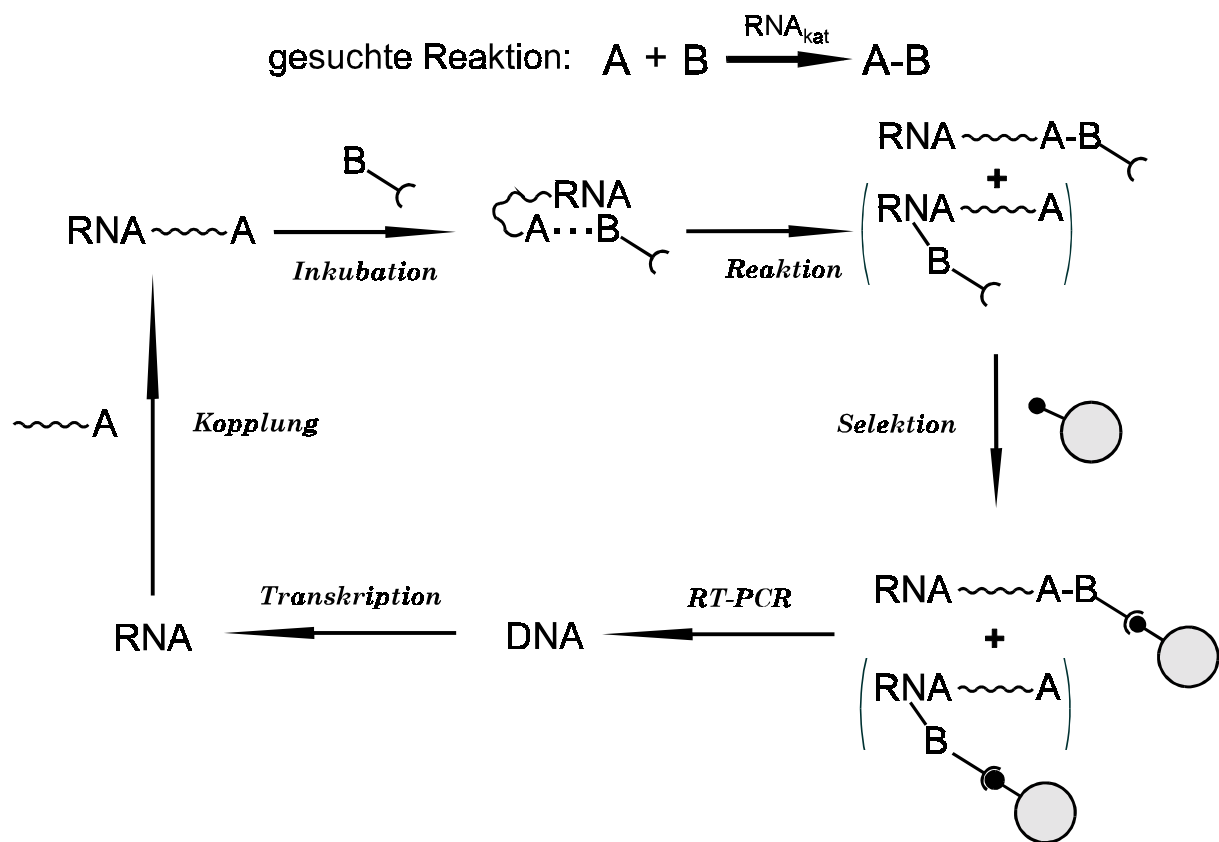


Abb. 4 Schema zur Selektion mit linkergekoppelten Reaktanten  
 A, B: Reaktanten; in Klammern: mögliche Produkte durch Nebenreaktionen;

: Derivatisierte Festphase (z.B. Streptavidin-Agarose); : Ankergruppe (z.B. Biotin); : Linker (z.B. PEG);

Wie bei der direkten Selektion können auch hier nur Ribozyme selektiert werden, die im Verlauf der Reaktion eine Ankergruppe erwerben. Durch die Verwendung von RNA-Reaktanten-Konjugaten kann jedoch nun die Reaktion am angekoppelten Reaktanten erfolgen und ist nicht mehr auf Selbstmodifizierung von RNA beschränkt. Da nach der neuen Methode die RNA bereits vor der Reaktion mit einem der beiden Reaktanten gekoppelt wurde (Reaktant A in Abb. 4), wird durch die Verknüpfung der beiden Reaktionspartner eine Verbindung von der Ankergruppe zur RNA hergestellt. Da bevorzugt die Reaktanten reagieren, die an eine katalytisch aktive RNA gekoppelt sind, können die aktiven Spezies durch den Erwerb der Ankergruppe selektiert werden. Der entscheidende Unterschied zur direkten Selektion ist hierbei, dass der Reaktant A ein beliebiges (auch RNA-fremdes) Molekül sein kann und dass die RNA nun keine Substrateigenschaften mehr zu besitzen braucht (vergl. Abb. 3 und Abb. 4). Diese wird nur nach katalytischer Aktivität selektiert. Um zu gewährleisten, dass sich das Ribozym und der Reaktant A frei zueinander orientieren können, sollte der Reaktant über einen möglichst struktureutralen Linker (Spacer) an die RNA gekoppelt werden [Übersicht: Frauendorf & Jäschke 1998].

Durch die künstliche Einführung des einen Reaktionspartners kann die gesuchte intermolekulare Katalyse von Reaktionen RNA-fremder Substanzen auf eine selektierbare intramolekulare Katalyse reduziert werden. Um die intramolekulare Katalyse gegenüber der katalytischen Umsetzung von Substraten fremder RNA-Sequenzen zu bevorzugen, sollte der Reaktionsschritt in hoher Verdünnung erfolgen. Diese Strategie führte kürzlich zur Isolierung von Ribozymen, welche die Reaktion eines angekoppelten Reaktanten katalysieren. Damit konnte erstmals die katalytische Aktivität von RNA auf eine Reaktion zwischen RNA-fremden Molekülen erweitert werden [Übersicht: Carola & Eckstein 1999]. Die gefundenen Ribozyme beschleunigen Diels-Alder-Reaktionen [Seelig & Jäschke 1999b, Tarasow *et al.* 1997], Peptid- [Zhang & Cech 1997] oder Glykosidbindungsknüpfung [Unrau & Bartel 1998] und katalysieren somit essentielle Reaktionen eines hypothetischen RNA-Metabolismus.

In dieser modifizierten direkten Selektion nimmt die Einführung des linkergebundenen Reaktanten eine Schlüsselstellung ein. Hierzu bieten sich chemische oder enzymatische Modifizierungen des 3'- oder 5'-Endes der RNA an. Diese Kopplung des Reaktanten muss in jeder Selektionsrunde neu geschehen, da der RNA-fremde Teil der Moleküle während der Amplifizierung verloren geht. Durch die klare Abgrenzung der RNA von dem angekoppelten Reaktanten durch den Linker wird eine anschließende Teilung von Ribozym- und Substratdomäne erleichtert, die für die Entwicklung von intermolekular wirkenden Katalysatoren mit mehrfachem Turnover unerlässlich ist. Die strikte Trennung von Substrat

und Enzym innerhalb eines Moleküls erlaubt zusätzlich eine exaktere Kontrolle über den Reaktionsverlauf, wodurch die Stringenz der Selektion erhöht werden kann.

## 1.5 Selektion mit spaltbaren Linkern (Linker der zweiten Generation)

Beide Methoden, die direkte und die linkergestützte Selektion, haben als gemeinsames Selektionskriterium den Erwerb einer Ankergruppe (z.B. Biotin), wodurch die Reaktionsprodukte vom inaktiven Rest abgetrennt werden können. In beiden Fällen ist es jedoch für die Auswahl unerheblich, in welchen Teil des Moleküls das Erkennungsmerkmal eingeführt wurde. Insbesondere bei reaktiven Substanzen ist aber zu erwarten, dass diese nicht nur in der gewünschten Weise mit endständigen RNA-Positionen (s. Abb. 3) bzw. endständig linkergekoppelten Reaktanten reagieren (s. Abb. 4). Auch innerhalb der RNA sind verschiedene funktionelle Gruppen wie z.B. 2'-OH-Gruppen der Ribosen oder Imidazolringe der Purin-Basen vorhanden, die - wie in Abb. 3 und Abb. 4 in Klammern gezeigt - mit dem freien Reaktanten reagieren können. Die entstehenden Nebenprodukte tragen ebenso wie die gesuchten Reaktionsprodukte eine Ankergruppe, daher werden sie im Selektionsschritt an der derivatisierten Festphase immobilisiert. Da sie trotz Modifikation z.T. noch revers transkribierbar [Lorsch *et al.* 1995] und damit amplifizierbar sind, werden die entsprechenden RNA-Moleküle selektiert, ohne in der gewünschten Weise reagiert zu haben.

Es ist außerdem damit zu rechnen, dass im Ausgangspool neben den gesuchten Sequenzen Nukleinsäuren vorhanden sind, die diese Nebenreaktionen katalysieren. Diese RNA-Moleküle entsprechen voll dem Selektionskriterium und können nicht durch das herkömmliche Selektionsschema (Abb. 3 und 4) von den gesuchten Sequenzen abgetrennt werden. Dadurch verzögert sich das Selektionsverfahren und die Analyse der erhaltenen Sequenzen wird erschwert. Oft dominieren bei der direkten Selektion die Katalysatoren für Nebenreaktionen sogar so sehr, dass nicht eine einzige Sequenz mit der gewünschten Aktivität isoliert werden kann [Chapman & Szostak 1995, Jenne & Famulok 1998]. So wurden neben den gesuchten 3'-Aminoacylasen RNA-Moleküle gefunden, die eine Aminoacylgruppe auf eine 2'-Hydroxylgruppe einer internen Ribose übertrugen [Illangasekare *et al.* 1995]. Ähnlich isolierten Wilson und Szostak statt der gesuchten 5'-terminalen S-Alkyltransferase Ribozyme, die sich an einem internen Guanin modifizierten [Wilson & Szostak 1995].

Während Nebenreaktionen bei der direkten Selektion ein inhärentes Problem sind, bietet die Selektion mit linkergekoppelten Reaktanten einen methodischen Ausweg, wenn mit der

Kopplung des Linkers gleichzeitig eine gezielt ansteuerbare Spaltstelle eingeführt wird [Jäschke 1998]:

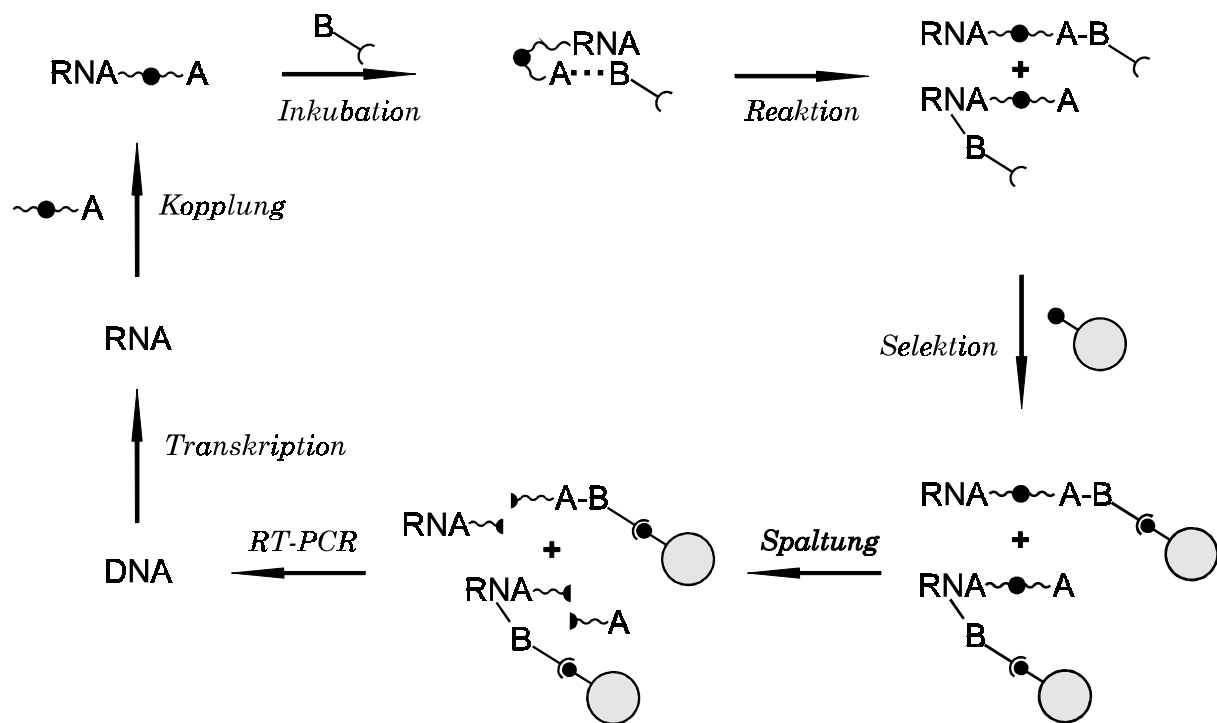


Abb. 5 Schema zur Selektion mit spaltbaren Linkern; A, B: Reaktanten;

 : Derivatisierte Festphase (z.B. Streptavidin-Agarose); 
  : Ankergruppe (z.B. Biotin); 
  : spaltbarer Linker;

Zwar kommt es auch mit dieser Methode zunächst zu Nebenreaktionen an der RNA, jedoch lassen sich nach der Immobilisierung an der derivatisierten Festphase zwei Gruppen von Molekülen unterscheiden (s. Abb. 5): Solche, die über den Linker mit der Festphase verknüpft sind (die gewünschten Produkte) und solche, die direkt gekoppelt sind (Nebenprodukte). Durch die Spaltung des Linkers können nun gezielt die RNA-Moleküle freigesetzt und amplifiziert werden, die über den Linker und das Produkt A-B mit der Festphase verknüpft waren. Die Nebenprodukte, die direkt mit der Festphase verknüpft waren, bleiben auch nach der Spaltung des Linkers immobilisiert (s. Abb. 5). Es erreichen somit nur die Moleküle die nächste Selektionsrunde, die in der gewünschten Weise miteinander reagiert haben.

Die Spaltstelle erhöht also die Stringenz durch ein zweites, regioselektives Selektionsereignis, wodurch die Anreicherung von unerwünschten Katalysatoren (solche, die Nebenreaktionen an der RNA katalysieren) unterdrückt wird. Eine ähnliche Strategie kam schon bei der Selektion von Aptameren zum Einsatz, um die Anreicherung von (unspezifischen) Säulenbindern auszuschalten. Dabei waren die Zielmoleküle reversibel an eine Festphase immobilisiert und nach Inkubation mit der Nukleinsäurebibliothek wurden die intakten Aptamer-Peptid Bindungskomplexe freigesetzt [Nieuwlandt *et al.* 1995].

## 1.6 Katalytische Desoxyribonukleinsäuren

In den vorangegangenen drei Abschnitten wurden Strategien zur Selektion von neuen Ribozymen aus RNA-Bibliotheken behandelt. Die Methodik der *in vitro* Selektion ist jedoch nicht auf Ribonukleotide beschränkt, auch DNA ist neben der Speicherung von Information prinzipiell zur Ausbildung von katalytisch aktiven Strukturen fähig [Sen & Geyer 1998]. Während jedoch etliche natürliche Ribozyme aus Organismen isoliert werden konnten, die dort essentielle katalytische Funktionen erfüllen, ist bisher kein Fall eines biologischen Desoxyribozyms bekannt [Li & Breaker 1999]. Es wird diskutiert, dass die Ursache hierfür in der fehlenden 2'-OH Gruppe liegt, in der sich DNA und RNA unterscheiden [Breaker 1997a]. Diese soll sowohl für die größere strukturelle Vielfalt von RNA verantwortlich sein, als auch durch die zusätzliche chemische Funktionalität direkt an katalytischen Prozessen beteiligt sein. In der Tat wurden bei den jüngst veröffentlichten Strukturen von natürlichen Ribozymen [Batey *et al.* 1999] und künstlichen Aptameren [Hermann & Patel 2000] intensive Wechselwirkungen der 2'-Hydroxylgruppen in Form von Metallionenkoordination oder Wasserstoffbrücken gefunden. In geringerem Maße sind aber zumindest für einzelsträngige DNAs durchaus ungewöhnliche Struktur motive wie Haarnadelschleifen, Pseudoknoten, Guaninquartette, DNA-Kreuzungen, Z-DNA, P-DNA und Tripelhelices bekannt [Rich 1993], die z.T. wichtige biologische Funktionen wie bei den Telomeren [Weilbaecher & Lundblad 1999] oder in der genetischen Rekombination haben.

Dass auch DNA in der Tat katalytisch aktiv sein kann, wurde erst durch *in vitro* Selektionsexperimente erfolgreich gezeigt [Übersicht: Breaker 1997b]. So wurden neben verschiedensten hochaffinen DNA-Aptameren [Übersicht: Osborne & Ellington 1997] Desoxyribozyme für DNA-Ligation [Cuenoud & Szostak 1995], DNA-Phosphorylierung [Li & Breaker 1999] sowie für DNA- [Carmi *et al.* 1996] und RNA-Spaltung [Breaker & Joyce 1994a, Santoro & Joyce 1997] beschrieben. Technisch unterscheiden sich die Selektionen von DNA und RNA dadurch, dass die gesuchten DNA-Sequenzen theoretisch direkt mit PCR amplifiziert werden können und deshalb keine T7- oder reverse Transkription nötig ist. Auch bei DNA bleibt die direkte Selektion jedoch auf die Selbstmodifikation beschränkt.

Wegen der erhöhten chemischen und biologischen Stabilität ist die Verwendung von DNA gegenüber RNA-Molekülen von Vorteil, zumal der synthetische Aufwand zur Herstellung deutlich geringer ist. Es gibt daher ein wirtschaftliches Interesse, inwieweit die katalytischen Fähigkeiten von Nukleinsäuren auf DNA übertragen werden können