

# In-vitro-Selektion spezifisch ligandenbindender Nucleinsäuren

Von Michael Famulok\* und Jack W. Szostak\*

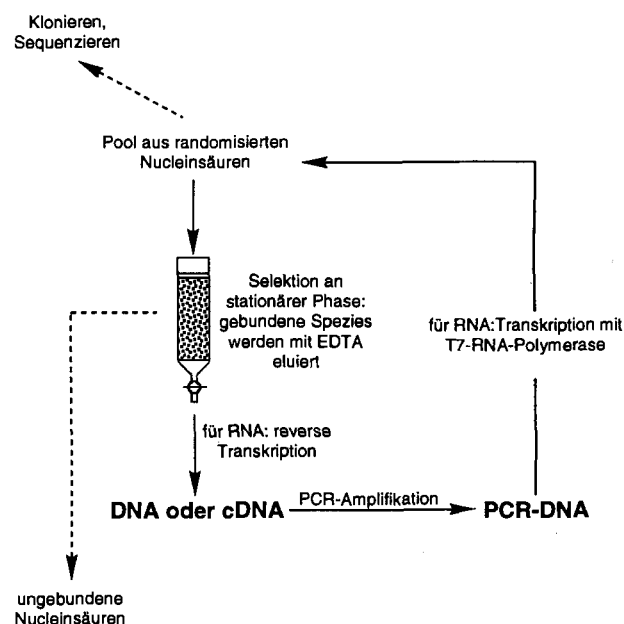
In-vitro-Selektion ist eine Methode, mit der gleichzeitig eine sehr große Zahl verschiedener Nucleinsäuremoleküle auf bestimmte Eigenschaften hin, z.B. Bindungsverhalten oder katalytische Eigenschaften, untersucht werden kann; ferner ist die Isolierung der sehr seltenen funktionellen Moleküle möglich. Mit dieser Technik wurden zum Beispiel die Bindungsstellen für Proteine an Nucleinsäuren untersucht, um Informationen über Protein-Nucleinsäure-Wechselwirkungen zu erhalten. Struktur und Funktion katalytischer RNA („Ribozyme“) wurden mit in-vitro-Selektion studiert; diese Untersuchungen führten zu neuen Ribozymen mit verbesserter katalytischer Aktivität. Auch die Substratspezifität katalytischer RNA konnte verändert werden, wobei DNA-spaltende Ribozyme erhalten wurden. Schließlich gelang die Isolierung von Nucleinsäuren, die spezifisch bestimmte „kleine“ organische Moleküle binden, sowie von RNA-Molekülen, die Tripelhelices mit Doppelstrang-DNA bilden. In diesem Aufsatz diskutieren wir Hintergrund, Design und Ergebnisse von genetischen in-vitro-Experimenten, die eine Brücke schlagen zwischen biochemisch-molekularbiologischen und organisch-chemischen Studien zur molekularen Erkennung.

## 1. Einleitung

Das rationale Design einer Nucleinsäure mit einer Tertiärstruktur, die komplementär zu einer beliebigen chemischen Struktur ist, ist nach wie vor unmöglich, weil man dazu nicht nur die zu einer Sequenz gehörende dreidimensionale Struktur, sondern auch die aufgrund der Ligandenbindung zu erwartende mögliche Strukturveränderung voraussagen können müßte. Daß es unmöglich ist, Nucleinsäurestrukturen zu designen, die komplementär zu Liganden *unbekannter* Struktur sind, versteht sich von selbst. Trotzdem ist es heute möglich, routinemäßig DNA- oder RNA-Moleküle zu isolieren, die sehr fest und spezifisch die unterschiedlichsten Liganden, wie Proteine, andere Nucleinsäuren und kleine organische Moleküle, binden. Dies verdanken wir neuartigen Techniken, die das Problem des Designs umgehen, indem sie die Isolierung sehr seltener Moleküle mit spezifisch ligandenbindenden Eigenschaften aus extrem großen Pools aus Nucleinsäuren mit zufälliger Sequenz ermöglichen<sup>[1]</sup>. Diese Methoden zur in-vitro-Selektion sind vor kurzem unabhängig voneinander in mehreren Laboratorien für eine ganze Reihe von Anwendungen entwickelt worden, von der Untersuchung von Proteinbindungsstellen an Nucleinsäuren bis zum Studium von Struktur und Funktion katalytischer RNAs.

Die Methode ist konzeptionell einfach: Zunächst wird eine große Bibliothek von Oligodesoxynucleotiden von komplett zufälliger Sequenz oder eine Bibliothek degenerierter Oligodesoxynucleotide mit möglichst vielen Varianten durch chemische Synthese erzeugt<sup>[2]</sup>. Diese Bibliothek aus DNA-

Sequenzen kann, wenn nötig, durch in-vitro-Transkription in eine RNA-Bibliothek umgeschrieben werden. Der Pool wird dann Selektionsschritten, die in der Anreicherung der interessierenden Moleküle resultieren, unterzogen. Weil nur ein äußerst geringer Bruchteil der zufälligen oder degenerierten Sequenzen funktionell ist, ist eine vollständige Reinigung in einem einzigen Selektionsschritt normalerweise nicht möglich. Daher wird der Pool der nach jedem Selektionsschritt erhaltenen Moleküle amplifiziert (vermehrt), so daß die funktionellen Moleküle in nachfolgenden Selektionsschritten weiter angereichert werden können. Die Amplifikation kann entweder durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)<sup>[\*\*][3]</sup> oder im Transkriptionsschritt erfolgen. Die Aneinanderreihung von Selektions- und Amplifikationsschrit-



Schema 1. Selektion ligandenbindender DNA- und RNA-Moleküle mit Hilfe von Affinitätschromatographie. Zur Selektion von DNA-Sequenzen werden reverse Transkription und Transkription nicht benötigt, doch sind asymmetrische PCR oder Einzelstrangreinigung notwendig, um die Bildung inaktiver Duplex-DNA aus komplementären Strängen zu vermeiden.

[\*] Dr. M. Famulok  
Institut für Biochemie der Universität München  
c/o Max-Planck-Institut für Biochemie  
Am Klopferspitz 18 a, W-8033 Martinsried  
Prof. Dr. J. W. Szostak  
Department of Molecular Biology, Wellman-9  
Massachusetts General Hospital  
Boston, MA 02114 (USA)

[\*\*] Wichtige Begriffe und Techniken sind am Ende des Beitrags in einem Glossar erläutert. Hingewiesen sei auch auf das sehr nützliche Lexikon: H. Ibelgaufits, *Gentechnologie von A-Z*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1990.

ten führt zu einer exponentiellen Zunahme der funktionellen Sequenzen, bis diese in der gesamten Population dominieren (Schema 1).

In-vitro-Selektion kann zur Analyse bekannter Nucleinsäuresequenzen herangezogen werden und bietet zum Beispiel die Möglichkeit zur schnellen Identifizierung wichtiger Basen, die nicht verändert werden können, ohne zu einem Verlust der Funktion zu führen, sei es in einer Proteinbindungsstelle eines DNA-Moleküls oder in einem RNA-Katalysator. Die Methode kann allerdings auch auf weit schwierigere Probleme angewendet werden, etwa zur Isolierung neuer Nucleinsäuremoleküle, die sehr spezifisch an kleine organische Moleküle, große regulatorische Proteine oder andere Zielmoleküle binden. Die de-novo-Isolierung von DNA- oder RNA-Sequenzen mit katalytischer Aktivität ist eine noch größere Herausforderung, der sich zur Zeit in mehreren Laboratorien gestellt wird.

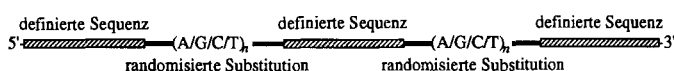
Ein unmittelbarer Vorteil der in-vitro-Selektion gegenüber den Standard-Methoden der in-vivo-Genetik ist der, daß Selektionsbedingungen, Bindungsspezifität oder die Reaktionen, für die selektiert werden soll, unabhängig von den durch die zelluläre Physiologie bedingten Einschränkungen sind. Ein weiterer großer Vorteil ist, daß Pools mit mehr als  $10^{15}$  unterschiedlichen Spezies einem Screening unterworfen werden können, was die Wahrscheinlichkeit für die Erzeugung mindestens eines Moleküls mit den gewünschten Eigenschaften deutlich erhöht.

## 2. Design von in-vitro-Selektionsexperimenten

Ein in-vitro-Selektionsexperiment kann, je nach Ziel, entweder mit komplett zufälligen („randomisierten“) Sequenzen oder mit einer Bibliothek von teilweise zufälligen Sequenzen beginnen. Teilweise zufällige Sequenzen werden normalerweise zur Analyse von Strukturen einer bekannten

funktionalen Sequenz oder zur Isolierung einer Sequenzvariante mit veränderten Eigenschaften herangezogen. Ein bestimmter Prozentsatz zufälliger Nucleotide kann dazu in einen Teil oder die gesamte zu untersuchende Sequenz eingeführt werden. Es kann aber auch eine kurze Region in einer längeren definierten Sequenz vollkommen zufällig synthetisiert werden. In beiden Fällen wird eine Familie von unterschiedlichen und doch eng verwandten Sequenzen erzeugt (Schema 2).

### a) Vollständige Randomisierung in Teilsequenzen



### b) Teilweise randomisierte ("n %doped") Sequenz



Schema 2. Beispiele für teilweise randomisierte Sequenzen: a) Teilsequenzen innerhalb einer zu untersuchenden definierten Nucleinsäuresequenz werden durch komplett randomisierte kurze Regionen substituiert. b) Eine zu untersuchende Nucleinsäuresequenz wird so synthetisiert, daß ein bestimmter Prozentsatz von Nucleotiden zufällig in eine definierte Sequenz eingeführt wird. Im Prinzip handelt es sich hierbei um die Synthese einer Nucleinsäuresequenz mit extrem hoher Mutationsrate.

Nach der Selektion hat man in der Regel immer noch einen Pool funktioneller Moleküle; eine vergleichende Sequenzanalyse ermöglicht dann die Identifizierung von Basenpositionen, die klassifiziert werden können als a) variabel und daher für die Funktion unnötig, b) hochkonserviert, was auf ihre Bedeutung für die Funktion hinweist, und c) mit anderen Basenpositionen covariabel, was für eine Wechselwirkung zwischen diesen Positionen spricht.



*Michael Famulok, geboren 1960 in Fulda, studierte von 1981–1989 Chemie an der Universität Marburg, wo er 1989 bei G. Boche promovierte. 1989 und 1990 arbeitete er als Postdoktorand mit J. Rebek, Jr., am Massachusetts Institute of Technology über molekulare Erkennung durch abiotische Rezeptormoleküle. Danach ging er als Postdoktorand zu J. W. Szostak (1990–1992), wo er sich mit in-vitro-Selektion befaßte. Derzeit arbeitet er an seiner Habilitation am Institut für Biochemie an der Universität München. Seine Interessensgebiete sind die molekulare Erkennung und Katalyse durch Nucleinsäuren.*



*Jack W. Szostak wurde 1952 in London geboren. Von 1968 bis 1972 studierte er an der McGill University in Montreal, Kanada, bis zum B. Sc. Das Hauptstudium (1972–1977) absolvierte er an der Cornell University, wo er bei Ray Wu promovierte. Nach einer Postdoc-Tätigkeit im gleichen Arbeitskreis ging er als Assistant Professor ans Dana Farber Cancer Institute und an die Harvard Medical School; dort arbeitete er über Rekombination und Chromosomenstruktur. Er ist derzeit Professor für Genetik an der Harvard University mit Labors am Massachusetts General Hospital in Boston. Seine Forschung konzentriert sich auf das Studium der Struktur und Funktion von RNA-Enzymen sowie auf den Ursprung des Lebens.*

Die de-novo-Isolierung von Nucleinsäurerezeptoren mit Spezifität für bestimmte Biomoleküle oder kleine Substrate verlangt am Anfang eine sehr große Bibliothek komplett zufälliger Sequenzen, die von definierten Primer-Bindungsstellen flankiert sind, was die Amplifizierung der selektierten Moleküle ermöglicht (Schema 3).



Schema 3. Aufbau synthetischer DNA-Oligonucleotide, die für die Transkription in eine Bibliothek von RNA-Molekülen mit randomisierten Sequenzinsertionen designed sind.

Die generelle Strategie zur Maximierung der Wahrscheinlichkeit für die Anwesenheit von substratspezifischen Tertiärstrukturen besteht in der Verwendung eines Pools von maximaler Komplexität zu Beginn des Selektionsexperiments<sup>[4]</sup>. Durch automatisierte Oligonucleotidsynthese<sup>[5]</sup> kann eine Komplexität von etwa  $10^{13}$ – $10^{15}$  verschiedenen Molekülen erhalten werden<sup>[6, 7]</sup>. Prinzipien für das Design von in-vitro-Selektionsexperimenten und Poolsynthesen sind beschrieben<sup>[8]</sup>.

### 3. Anwendungen

#### 3.1. Selektion von DNA-Molekülen zur Proteinerkennung

Der erste Bericht über die in-vitro-Selektion zufälliger DNA-Sequenzen stammt von Oliphant et al.<sup>[9]</sup>, die eine Affinitätschromatographie zufälliger DNA-Sequenzen durchführten; dabei wurden die Selektionsschritte ohne Amplifikation hintereinander geschaltet. Die Analyse der selektierten Sequenzen geschah durch Ligierung in ein Plasmid, Transformation und Klonierung. Man kann daher von einer in-vitro-Selektion/in-vivo-Amplifikation sprechen. Das Selektionssystem wurde zur Isolierung von DNA-Sequenzen, die das Protein GCN4 binden, angewendet. GCN4 ist ein transkriptionsaktivierendes Protein, das innerhalb der Promotorregion vieler Hefegene bindet, die für Enzyme des Aminosäurebiosyntheseapparats codieren. Wichtig für die Bindung von GCN4 an DNA schien eine Sequenz von neun Basenpaaren zu sein. Um die Details dieser Ortsspezifität sowie die Rolle flankierender Nucleotide zu untersuchen, wurde eine DNA-Region von 23 Nucleotiden von zufälliger Sequenz synthetisiert, die auf jeder Seite von verschiedenen Restriktionsschnittstellen flankiert waren. Einzelstrang-DNA wurde dazu chemisch synthetisiert und als Templat zur Herstellung von radioaktiver Doppelstrang-DNA (dsDNA) verwendet, die dann in Gegenwart einer Träger-DNA an GCN4-derivatisierter Agarose selektiert wurde. Gebundene DNAs wurden anschließend eluiert, mit Restriktionsenzymen verdaut und dann drei weiteren Cyclen chromatographischer Selektion unterzogen. Nach der letzteren Selektionsrunde wurden 0.01 % der Input-DNA zurückerhalten. Klonierung und Sequenzierung dieser DNA ergab, daß 40 von 43 Klonen die symmetrische Sequenz TGA(C/G)TCA enthielten, und sechs dieser sieben Basen in den drei anderen Klonen auftraten. Ein solch hoher Konservierungsgrad deu-

tet darauf hin, daß die wichtigsten GCN4/DNA-Kontakte höchstwahrscheinlich in dieser Region zu finden sind.

Über das erste Experiment, bei dem in-vitro-Selektion und in-vitro-Amplifikation kombiniert wurden, berichteten 1989 Kinzler und Vogelstein, die DNA-Sequenzen mit Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor TFIIIA selektierten<sup>[10a]</sup>. Anstelle von synthetischer randomisierter DNA verwendeten diese Autoren hochfragmentierte humane DNA als Quelle für ihren Anfangspool. Diese DNA wurde mit Verbindungsstücken derivatisiert, die Restriktionsschnittstellen enthielten, um die nachfolgende Klonierung und Sequenzanalyse zu ermöglichen. Die Selektion von DNA-Fragmenten mit Bindungsstellen für TFIIIA wurde durch Immunpräzipitation von Protein-DNA-Komplexen mit anti-TFIIIA-Antikörpern erreicht; die selektierte DNA wurde dann durch PCR amplifiziert. Durch Vergleich der Sequenzen selektierter Moleküle konnte die Bindungsstelle identifiziert werden. In ähnlichen Experimenten wurde die Bindungsstelle des humanen GL1-Zinkfinger-Proteins bestimmt<sup>[10b]</sup>.

Ein System zur Selektion von Protein-bindenden DNA-Molekülen, das ausschließlich auf in-vitro-Techniken (einschließlich chemischer Synthese der DNA-Moleküle) basiert, wurde von Thiesen und Bach beschrieben<sup>[11]</sup>. Als Modellprotein für diese Studien wurde ein Fragment des DNA-bindenden humanen Transkriptionsfaktors SP1 verwendet. Die chemisch synthetisierte DNA enthielt zwölf Nucleotide zufälliger Sequenz, die von definierten Primer-Bindungsstellen flankiert waren. Durch PCR wurde doppelsträngige DNA synthetisiert, diese mit dem SP1-Fragment inkubiert und die DNA-Protein-Komplexe an Nitrocellulosefiltern gebunden. Ein Oligonucleotid mit definierten SP1-Bindungsstellen wurde als Vergleichssequenz und für Konkurrenzbindungsassays verwendet. Gebundene DNAs wurden mit einem Zink-Chelator, der die Zinkfinger-Domänen des SP1-Proteins denaturiert, eluiert und die DNA durch PCR-amplifiziert<sup>[12]</sup>. Nach fünf Selektionsrunden wurden 19 von 20 Oligonucleotiden an SP1 gebunden. Die relativen Affinitäten einiger dieser DNAs wurden in Gegenwart der Vergleichs-DNA durch Bandshift-Elektrophorese getestet. Zwei Sequenzen, S2 und S3, zeigten bis zu zehnfach stärkere Bindung als die bekannte Bindungsstelle der Vergleichs-DNA. Die Sequenzierung klonierter DNAs ergab erstaunliche Ähnlichkeit der Sequenzen untereinander. Einige der selektierten bindenden Sequenzen unterschieden sich nur in einer Base von der SP1-Consensus-Sequenz GGGGCGGGGC. S2 und S3, die Sequenzen mit der größten Affinität zu SP1, sind an drei Basenpositionen mutiert.

##### 3.1.1. Charakteristika der Bindung von basischen Helix-Loop-Helix-Proteinen an DNA

Über eine dritte Variation zum Thema DNA-Protein-Erkennung wurde von Blackwell und Weintraub berichtet<sup>[13]</sup>, die Selektion und PCR-Amplifikation in mehreren Cyclen wie oben beschrieben durchführten, den Aufwand des Klonierens und Sequenzierens der vielen selektierten individuellen DNA-Moleküle allerdings vermieden, indem sie einfach den gesamten Pool von DNA-Molekülen als Gemisch sequenzierten. Blackwell und Weintraub untersuchten die DNA-Sequenz, an die verschiedene basische Helix-Loop-

Helix-Proteine (bHLH-Proteine), z.B. MyoD, binden. Die bHLH-Proteine sind eine Familie von Transkriptionsaktivatoren mit einem konservierten Satz basischer Aminosäuren, der für die DNA-Erkennung wichtig ist und unmittelbar an eine Region angrenzt, von der man annimmt, daß sie Helix-Loop-Helix-Struktur hat und an der Oligomerisierung beteiligt ist<sup>[14]</sup>. MyoD ist für die Induktion Muskel-spezifischer Gene in Muskelzellen verantwortlich, während die anderen bHLH-Proteine mehrere Sätze gewebespezifischer Gene in anderen Geweben induzieren<sup>[15]</sup>. Die Bindung von MyoD und allen weiteren bHLH-Proteinen an DNA erfolgt in vitro allerdings an die gleiche übereinstimmende Sequenz CANNTG<sup>[16]</sup>.

Um herauszufinden, ob die unterschiedlichen in-vivo-Effekte dieser Proteine von Unterschieden bei ihrer Bindung an DNA herrühren, führten Blackwell und Weintraub eine Reihe von in-vitro-Selektionsexperimenten durch. Dazu wurde zunächst ein Pool synthetischer DNA-Moleküle mit der Consensus-Sequenz CANNTG erzeugt, in dem die beiden zentralen und einige der flankierenden Positionen vollständig randomisiert wurden. Dieses Gemisch von DNA-Sequenzen wurde mit dem Protein (MyoD, E2A, E52 oder Heterooligomeren dieser Proteine) inkubiert und die DNA-Protein-Komplexe mit Hilfe des Elektrophorese-Mobility-Shift-Assay isoliert. Nach der Amplifikation der DNA durch PCR wurde diese DNA als Pool sequenziert, ohne vorher zu klonieren. Durch diese Technik werden Dauer und Aufwand von Selektionsexperimenten drastisch reduziert, weil sie es ermöglicht, alle zusätzlich zur definierten CANNTG-Sequenz an der spezifischen Erkennung beteiligten Basen direkt vom Sequenziergel abzulesen<sup>[17]</sup>. Durch die definierten Basen ist garantiert, daß die Orientierung des Proteins für jedes DNA-Molekül gleich ist. Unwichtige Basen oder Basen, die an basenspezifischen Wechselwirkungen unbeteiligt sind, liegen im selektierten Pool als Gemisch vor und treten so auch in der Sequenzierleiter auf. Mit dieser schnellen Analysemethode können durch in-vitro-Translation erzeugte mutierte Proteine leicht auf Veränderungen in ihrem Bindungsverhalten hin „gescreent“ werden. Es könnten aber durch die Sequenzierung eines Gemisches anstelle individueller Sequenzen wichtige Informationen verlorengehen, und zwar dann, wenn ein Pool unterschiedliche Sequenzen enthält, die gleich gut binden.

### 3.1.2. In-vitro-Selektion mit Hilfe von Immunpräzipitation

Die Reinigung von DNA-Protein-Komplexen durch Immunpräzipitation wurde als in-vitro-Selektionssystem von Pollock und Treisman verwendet<sup>[18]</sup>. Diese Methode hat den großen Vorteil, daß das Protein, dessen Bindungsstelle definiert werden soll, nicht in gereinigter Form vorzuliegen braucht. Die Autoren verwendeten Zellextrakte als Quelle für den Transkriptionsfaktor SRF (Serum Response Factor) und ein in-vitro-Translationssystem als Quelle für das *fos*-Oncoprotein. Die Selektionsstrategie war ähnlich wie in den bisher beschriebenen Experimenten: DNA wurde über eine Region von 26 Basen randomisiert, die von Primer-Bindungsstellen von 25 Nucleotiden Länge flankiert war. Der ungereinigte Extrakt wurde mit dem DNA-Pool und einer konkurrierenden DNA inkubiert (um die Bildung unspezifischer Komplexe mit der Pool-DNA zu erniedrigen) und die

SRF- oder *fos*-DNA-Komplexe mit SRF- oder *fos*-spezifischen Antikörpern präzipitiert. Gebundene DNA wurde gereinigt, PCR-amplifiziert und erneut selektiert; nach mehreren Selektionsrunden wurde kloniert und sequenziert.

Dieser Zugang wird sich besonders für die Untersuchung DNA-bindender Proteine, die posttranslationale Modifizierungen oder die Assoziation mit anderen Proteinen zur korrekten DNA-Erkennung benötigen, als nützlich erweisen. Proteine, die aus bakteriellen Überexpressionssystemen gewonnen wurden, können in solchen Fällen zu falschen Ergebnissen führen. Die Möglichkeit zur Verwendung von Proteinen, die durch in-vitro-Translation erhalten wurden, bedeutet, daß der Effekt von Mutationen im Protein auf die DNA-Bindungsspezifität sehr viel leichter zu untersuchen sein wird, da mutierte Proteine heutzutage vollständig in vitro erzeugt werden können (durch PCR-Mutagenese eines klonierten Gens und nachfolgender in-vitro-Transkription und Translation).

## 3.2. In-vitro-Selektion von RNA-Molekülen zur Proteinerkennung

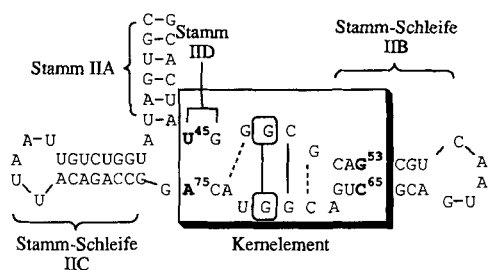
Proteinbindungsstellen an DNA sind relativ einfach zu bestimmen, da die meisten DNA-regulatorischen Elemente an die wohldefinierten Strukturen der B-Typ-Doppelhelix binden. Im Gegensatz dazu kann die Erkennung von Proteinen durch RNA von den durch die Primär-, Sekundär- oder Tertiärstruktur festgelegten Strukturdetails Gebrauch machen. Genauere Kenntnisse der strukturellen Erfordernisse können bisweilen mit Hilfe phylogenetischer Studien gewonnen werden, allerdings nur, wenn genügend Sequenzdaten zugänglich sind<sup>[19]</sup>. Dann nämlich können Kovariationen gefunden werden, die Rückschlüsse auf die Sekundär- oder Tertiärstruktur in der Bindungsstelle zulassen. Wenn jedoch nur unzureichende Variationen unter den zugänglichen Sequenzen gefunden werden, ist eine Ermittlung der relevanten Struktur nicht möglich. Computerberechnete RNA-Sekundärstrukturen können für derartige Analysen hilfreich sein, verfehlen aber oft die Voraussage funktionell wichtiger Strukturen<sup>[20]</sup>. Ein Beispiel ist das Rev-Protein: Sequenzierte HIV-Isolate zeigen in der Rev-Bindungsregion nur sehr geringe Variation, und mehrere unterschiedliche Faltungen der Sequenz waren möglich. Die in-vitro-Selektion scheint für derartige Fälle eine ideale Methode zur Erzeugung funktioneller Sequenzen zu sein, die von ausreichender Divergenz sind, so daß interessante Strukturinformationen durch vergleichende Sequenzanalyse gewonnen werden können.

### 3.2.1. Die Rev-Bindungsstelle

Das Rev-Protein in HIV und anderen eng verwandten Retroviren vermittelt den Transport der mRNAs von *gag*, *pol* und *env* vom Zellkern in das Cytoplasma infizierter Zellen und ist somit für die Replikation dieser Viren essentiell<sup>[21]</sup>. Rev bindet innerhalb eines 66 Nucleotide (nt) langen Segments in der zu transportierenden mRNA; der genaue Ort sowie die Struktur der Bindungsstelle waren jedoch kontrovers<sup>[22]</sup>. Bartel et al. verwendeten in-vitro-Selektion um diese Fragen zu klären<sup>[23]</sup>.

Zur Vermeidung der Selektion von Strukturen, die zu Rev in keiner Beziehung stehen, aber dennoch an das Protein binden, wurde das 66-nt-Rev-Bindungselement nicht vollständig randomisiert, sondern der Pool so synthetisiert, daß 65% der Basen Wildtypsequenz, 30% nicht-Wildtyp und 5% deletiert waren. Dieser Degenerierungsgrad wurde gewählt, damit Nucleotide, die eine wichtige Rolle in der Bindungsstelle spielen, als konserviert erkannt werden konnten, während alle unwichtigen Basen stark variieren. Außerdem erhoffte man sich die Erkennung wechselwirkender Basen durch Kovariation. Das synthetische DNA-Templat wurde durch PCR amplifiziert und dann zur Erzeugung eines RNA-Pools durch in-vitro-Transkription mit T7-RNA-Polymerase verwendet. Die Selektion erfolgte durch Reinigung der RNA-Protein-Komplexe an Nitrocellulosefiltern. Gebundene RNA wurde eluiert, zur Erzeugung von cDNA revers transkribiert, die cDNA PCR-amplifiziert und T7-transkribiert, um einen RNA-Pool zurückzuerhalten. Um die durchschnittliche Affinität der Pool-RNA für Rev relativ zur Wildtyp-Bindungssequenz zu bestimmen, wurde eine begrenzte Menge Rev mit einem Überschuß eines Gemisches aus Pool-RNA und der kürzeren Wildtyp-RNA inkubiert. Die Verteilung des Rev-Proteins zwischen den beiden RNAs ergab für den im letzten Zyklus erhaltenen Pool (der in drei Selektions-/Amplifikations-Runden erhalten worden war) eine dreimal bessere Bindung an Rev als die Wildtyp-RNA und eine 460fache Bindungserhöhung gegenüber dem am Anfang eingesetzten degenerierten Pool.

Die Klonierung von 31 Sequenzen aus dem letzten Pool ergab für 18 monoklonale RNAs ebenso gute oder bessere Bindung an Rev wie Wildtyp-RNA. Eine der Sequenzen bindet sogar zehnmal so gut wie der Wildtyp. Sämtliche konservierten Basen wurden in zwei Segmenten (U45 bis G53 und C65 bis A75) gefunden. Diese Segmente bilden den Kern der Rev-Bindungsstelle; sie paaren miteinander und bilden eine Stamm-Bauch-Stamm-Sekundärstruktur (Schema 4).



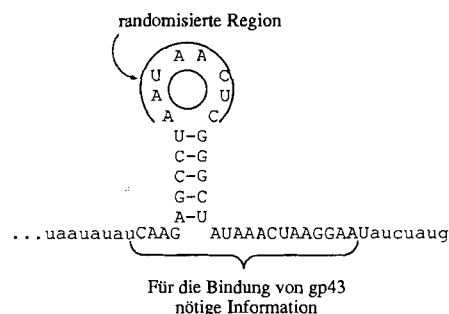
Schema 4. Sekundärstruktur des 66-nt-Rev-Responsive-Elements, bestimmt durch vergleichende Sequenzanalyse selektierter Rev-bindender RNAs. Die eingerahmte Region zeigt das Bindungsmotiv für die Rev-Erkennung. Das G:G-Basenpaar ist durch „eckige Kreise“ markiert.

Sieben der zehn Basen in der Bauch-Region sind hochkonserviert, was auf essentielle RNA-RNA- oder RNA-Protein-Kontakte hinweist. Die weitere Analyse der Covariation G48 und G71 deutete auf die Bildung eines für die Rev-Erkennung offenbar besonders bedeutenden Nicht-Standard-G48:G71-Basenpaares. Einfache G → A-Substitutionen einer der beiden Positionen reduziert die Rev-Bindung deutlich, wohingegen die A:A-Doppelmutation die Bindung wieder voll herstellt. Dieser Befund läßt darauf schließen,

daß das Basenpaar durch Rev nicht direkt erkannt wird. A:A und G:G können zwar isosterische Basenpaare bilden<sup>[24]</sup>, sind aber völlig unterschiedlich in der Geometrie der zugänglichen H-Donor- und Acceptorstellen. Vermutlich verändert das Purin:Purin-Paar die Geometrie des Zucker-Phosphat-Rückgrates und diese Veränderung – oder mögliche Konsequenzen – wird durch Rev erkannt.

### 3.2.2. Variationen der RNA-Bindungsstelle von T4-DNA-Polymerase

Die DNA-Polymerase des Bakteriophagen T4 (gp43) bindet an eine 36 Basenpaare (36 nt) lange Sequenz seiner eigenen mRNA, und hemmt dadurch seine eigene Translation<sup>[25a]</sup>. Ein essentieller Teil dieser Region ist eine Helix aus fünf Basenpaaren, die eine acht Nucleotide lange Schleife einschließt<sup>[26]</sup> (Schema 5).



Schema 5. Die 36 Nucleotide lange RNA-Bindungsstelle der T4-DNA-Polymerase (gp43). In der hier gezeigten Stamm-Schleifenstruktur wurden die acht Nucleotide der Schleife randomisiert.

Um die für die Bindung der DNA-Polymerase verantwortlichen Basen der Schleife zu ermitteln, randomisierten Tuerk und Gold die 8 nt lange Wildtyp-Sequenz der Schleife und selektierten funktionelle Sequenzen<sup>[25b]</sup>.

Die Synthese des 110 nt langen Templats erfolgte durch Ligation dreier synthetischer Oligonucleotide, von denen eines die randomisierte Sequenz enthielt. Ein Pool aus  $4^8$  (= 65 536) verschiedenen RNA-Molekülen wurde dann durch T7-Transkription erzeugt, und in vier Selektionscyclen wurden die Moleküle angereichert, die DNA-Polymerase binden (durch Bindung der RNA-Protein-Komplexe an Nitrocellulosefilter). Nach reverser Transkription, PCR-Amplifikation und Transkription wurde der angereicherte RNA-Pool einem erneuten Selektionszyklus unterzogen<sup>[27]</sup>. Nach der vierten Selektions-/Amplifikations-Runde unterschied sich das Bindungsverhalten der verbleibenden RNA nicht mehr von dem der reinen Wildtyp-Sequenz. Zwei Sequenzen dominierten im selektierten Pool: die Wildtyp-Sequenz AAUAACUC und eine weitere, AGCAACCU, die sich vom Wildtyp in vier Positionen unterscheidet. Die vier Mutationen liegen in dem Teil des Loops, der an die Stammstruktur angrenzt, und könnten so den Stamm um zwei weitere Basenpaare verlängern. In Filterbindungsstudien zeigten die Komplexe der beiden Varianten mit T4-DNA-Polymerase die gleichen Dissoziationskonstanten ( $K_D = 4.8 \times 10^{-9}$ ). Noch ist unklar, ob das Protein an die beiden unterschiedlichen Strukturen gleich gut bindet oder ob die

beiden Sequenzen zufällig sehr ähnliche Tertiärstrukturen bilden können.

### 3.3. Erkennung von Doppelstrang-DNA (dsDNA) durch RNA

Einzelstrang-DNA und RNA können in der großen Furche an DNA-Duplexe binden und können durch die Bildung von T-AT- und C<sup>+</sup>-GC-Basentriplets spezifisch Sequenzen erkennen. Um die Regeln der Doppelstrang-DNA-Erkennung etwas ausführlicher zu erkunden, verwendeten Pei et al.<sup>[28]</sup> in-vitro-Selektion zur Isolierung von RNA-Sequenzen, die an Polypurin:Polypyrimidin-Duplex-DNA binden können. Die Duplex-DNA war durch Disulfid-Linker an eine Thiol-Sepharosematrix gebunden. Kontrollexperimente ergaben, daß ein zu der Polypurinsequenz komplementäres Oligonucleotid in salzhaltiger Pufferlösung an der derivatisierten Säulenmatrix aufgehalten wurde, während es unter salzarmen Bedingungen eluierte. Eine Bibliothek aus RNA-Molekülen mit einer zufälligen Sequenz von 50 nt, flankiert von definierten Primer-Bindungsstellen wurde dann fünf Selektionscyclen für Bindung an die Duplex-DNA-Säule unterzogen. RNAs, die an die Thiol-Sepharosematrix selbst binden, wurden durch negative Selektion an underivatisierter Thiol-Sepharose entfernt. Die Sequenzierung von 17 Klonen des selektierten Pools ergab, daß die meisten Klone ausgedehnte Polypyrimidinzonen enthielten, die unter Bildung der erwarteten T-AT- und C<sup>+</sup>-GC-Basentriplets an die Duplex-DNA binden konnten. Überraschenderweise enthielten viele der selektierten Sequenzen falschgepaarte Basentriplets oder sogar Insertionen von sechs bis acht Basen. Weitere Selektionsexperimente dieser Art könnten sich bei der Klärung oder Erweiterung der Regeln zur Bildung stabiler Triplex-Strukturen als hilfreich erweisen.

### 3.4. Struktur und Funktion katalytischer RNAs

Das Intron der Klasse I (Group I Intron) innerhalb der präribosomalen RNA von *Tetrahymena* katalysiert seine eigene Entfernung, um reife rRNA herzustellen<sup>[29]</sup>. Diese Selbstspleißreaktion beginnt mit einem S<sub>N</sub>2-Angriff der 3'-OH-Gruppe eines freien Guanosins an der Phosphatgruppe am 5'-Ende des Introns. Dadurch wird die Phosphodiesterbindung zwischen dem Intron und dem 5'-Exon gebrochen und eine neue Bindung zwischen dem Guanotin und dem Intron gebildet. Die 3'-OH-Gruppe am Ende des 5'-Exons führt dann einen ähnlichen nucleophilen Angriff am 3'-Ende des Introns durch. Das Intron wird freigesetzt und die beiden Exonsegmente ligiert<sup>[30]</sup>. Die Struktur dieses RNA-Katalysators, seine Substratbindungseigenschaften und sein Katalysiemechanismus standen in den letzten zehn Jahren im Mittelpunkt vieler experimenteller Untersuchungen; in-vitro-Selektion verspricht für das Studium dieser und anderer Ribozyme sehr hilfreich zu sein.

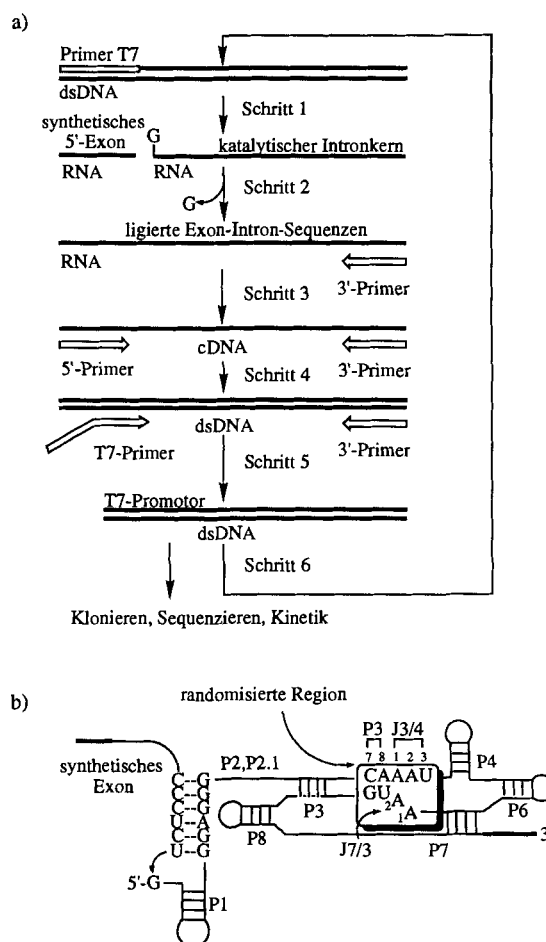
#### 3.4.1. Die Struktur des *Tetrahymena*-Ribozyms

Unsere Kenntnisse über die Struktur des *Tetrahymena*-Ribozyms verdanken wir zu einem guten Teil der vergleichen-

den Analyse der Sequenzen von über 100 Introns der Klasse I. Dieser Zugang hat sich als außerordentlich fruchtbar erwiesen und viele Hinweise auf die detaillierte Sekundär- und Tertiärstruktur dieses RNA-Enzyms gegeben. Der phylogenetische Zugang ist aber trotzdem vollkommen von der Verfügbarkeit ausreichend divergenter Sequenzen abhängig. Um diese Beschränkung zu vermeiden, haben Green et al.<sup>[31]</sup> ein Derivat des *Tetrahymena*-Ribozyms durch in-vitro-Selektion analysiert.

Das Selektionsverfahren basierte auf einer Umkehr der vom Ribozym katalysierten Spaltungsreaktion. Ein Ribozym, das dem Produkt des ersten Spleißschrittes entspricht, wurde hergestellt, d. h. das 5'-Exon wurde entfernt und das Guanosinsubstrat kovalent an das Intron gebunden. Die Addition eines synthetischen 5'-Exons ermöglicht dann die Umkehr der Reaktion, und zwar derart, daß das Exon unter Freisetzung des Guanotins an das Intron gebunden wird (Schema 6).

In dem Selektionsschema werden die durch die Exon-Ligierung neu eingeführten einheitlichen Sequenzen als Primer-Bindungsstellen für die PCR-Amplifikation genutzt. Daher können anschließend nur Moleküle, die an der Katalyse beteiligt waren, amplifiziert werden. Nachdem zunächst



Schema 6. a) Selektionsstrategie zur Bestimmung funktionell wichtiger Wechselwirkungen im *Tetrahymena*-Ribozym. Schritt 1: Transkription doppelsträngiger DNA (dsDNA) mit T7-RNA-Polymerase. Schritt 2: Nur die katalytisch aktiven Varianten können das 5'-Exon an den Kern ligieren. Schritt 3: Reverse Transkription der ligierten und unligierten RNAs. Schritt 4: PCR-Amplifikation der ligierten Exon-Intron-Sequenzen mit den 3'- und 5'-Primer-Bindungsstellen. Schritt 5: PCR erneuert die anfängliche Intron-Sequenz. Schritt 6: Zurück zu Schritt 1 für den nächsten Selektionszyklus. b) Die fünf- und vier-nt-Region, die innerhalb des für die katalytischen Eigenschaften wichtigen Teils des Ribozyms randomisiert wurde. Ebenfalls gezeigt ist die Sequenz, an die das synthetische Exon gebunden ist.

die so ligierten RNAs PCR-amplifiziert wurden, wird eine zweite PCR-Runde durchlaufen, die die anfängliche Intronsequenz einschließlich des während der Katalyse abgespaltenen Guanosins wiederherstellt. In-vitro-Transkription regeneriert daraus dann wieder RNA-Sequenzen, die für die nächste Selektionsrunde verwendet werden können.

Zwei Segmente von vier und fünf Nucleotiden Länge, von denen aufgrund vorhergehender Befunde vermutet wurde, daß sie miteinander wechselwirken<sup>[32]</sup>, wurden randomisiert<sup>[33]</sup>. Weil das gesamte Intron für eine chemische Synthese zu lang ist, wurde der Pool durch PCR-Amplifikation eines Plasmid-Templats unter Verwendung von Primern, die die randomisierte Sequenz enthielten, hergestellt. Nachdem mit dem Pool aus 4<sup>9</sup> (= 262144) verschiedenen Varianten drei Selektions-Amplifikations-Cyclen durchlaufen worden waren, zeigte der Pool 50 % der Aktivität der Wildtyp-Kontrolle. Die Klonierung individueller Varianten des selektierten Pools ergab den Wildtyp als die häufigste Sequenz. In den übrigen Sequenzen wurden einige invariante Positionen gefunden, während andere durchaus variabel waren. Zwei interessante Positionen variierten korreliert zueinander, was auf starke Wechselwirkungen zwischen diesen Positionen hinweist. Mit den so erhaltenen Informationen konnten Hypothesen<sup>[34]</sup> über tertiäre Wechselwirkungen zwischen Basen in der untersuchten Region geprüft werden.

### 3.5. Selektion für veränderte katalytische Eigenschaften

Robertson und Joyce berichteten kürzlich über ein in-vitro-Selektionssystem für Introns der Klasse I, das dem im vorigen Abschnitt beschriebenen ähnlich ist, aber zur Selektion von Varianten mit veränderter katalytischer Funktion ausgelegt ist<sup>[35]</sup>. Die Selektionsstrategie zeigt Schema 7.

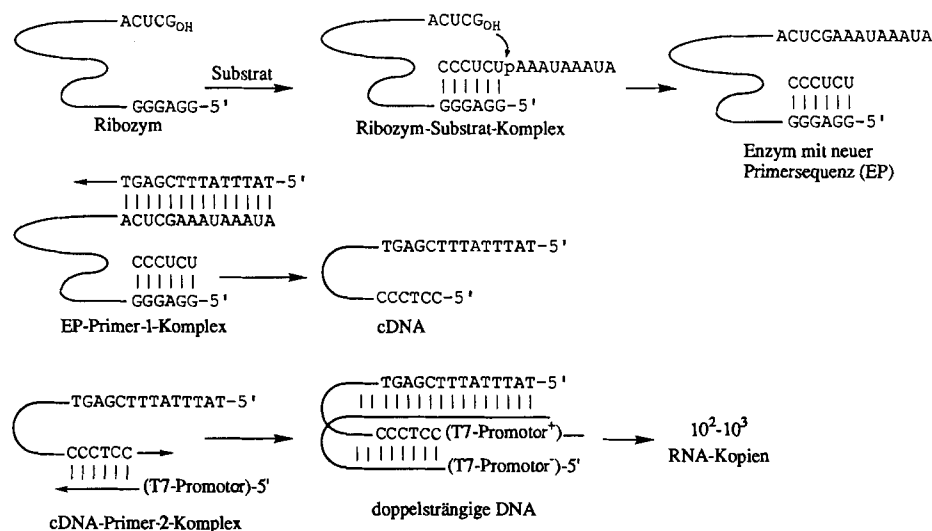
Die verwendete Reaktion kann als die Umkehr des zweiten Schrittes der Selbstsplicingreaktion (Exon-Ligierung) betrachtet werden. Ein Oligonucleotid, das die ligierten Exons repräsentiert, wird von der 3'-OH-Gruppe des Ribozyms angegriffen, was zur Spaltung des Oligonucleotids und zur Ligierung der 3'-Hälfte des Oligonucleotids an das Ribozym selbst führt. Diese neue 3'-Sequenz wird nur an die katalytisch aktiven Varianten des Ribozyms addiert, und deshalb kann der komplementäre Primer, der zur Initiierung der re-

versen Transkription benötigt wird, nur mit aktiven Molekülen hybridisieren. Aus der resultierenden cDNA wird mit Hilfe eines zweiten Primers dsDNA synthetisiert. Diese DNA wird dann allerdings nicht durch PCR amplifiziert, sondern die Amplifikation erfolgt als Konsequenz des Transkriptionsschrittes, in dem T7-RNA-Polymerase viele RNA-Kopien eines jeden DNA-Templats herstellt. Obwohl Robertson und Joyce versuchten, eine Ribozymvariante zu selektieren, die bevorzugt DNA statt RNA spaltet, scheinen hauptsächlich Varianten erhalten worden zu sein, deren Spaltungsaktivität sowohl für DNA- als auch für RNA-Substrate erhöht ist. Dennoch ist dieser Zugang über viele Selektionscyclen anwendbar, und die resultierende Fähigkeit, neue Ribozym-Aktivitäten zu „evolvierten“ verspricht höchst interessant zu werden.

Von selbstreplizierenden RNA-Molekülen wird angenommen, daß sie eine wichtige Rolle in der frühen Evolution des Lebens gespielt haben<sup>[36]</sup>. Die Introns der Klasse I sind in diesem Zusammenhang von Interesse, weil die Chemie der Selbstsplicing der Chemie existierender RNA-Polymerasen sehr ähnlich ist, wenn sich auch die Substrate deutlich unterscheiden. Tatsächlich wurden die katalytischen Eigenschaften von Ribozymen der Klasse I herangezogen, um primitive replikationsartige Reaktionen zu demonstrieren<sup>[37]</sup>. Weitere Modifikation dieser Ribozyme wird nötig sein, um ein RNA-Enzym zu erzeugen, das effizient und genau ein anderes RNA-Molekül kopieren kann. Solange nicht genug Information für ein rationales Design einer solchen RNA vorhanden ist, erscheint die in-vitro-Selektion am vielversprechendsten, um Fortschritte auf diesem Gebiet zu erzielen.

### 3.6. Molekulare Erkennung kleiner Substrate durch Nucleinsäuren

RNA-Enzyme (Ribozyme) haben genauso wie Protein-Enzyme Bindungsnischen und -taschen, die sehr spezifisch Substrate erkennen können<sup>[38]</sup>. Die Bindungsstelle für Guanosin im Tetrahymena-Ribozym<sup>[39]</sup> ist ein Beispiel dafür. Wechselwirkungen zwischen Wirkstoffen und DNA<sup>[40]</sup> oder Salzbrücken zwischen Arginin und dem Phosphat-Rückgrat<sup>[24]</sup> sind weitere Beispiele für mehr oder weniger sequenzspezifische Nucleinsäure-Liganden-Wechselwirkungen.

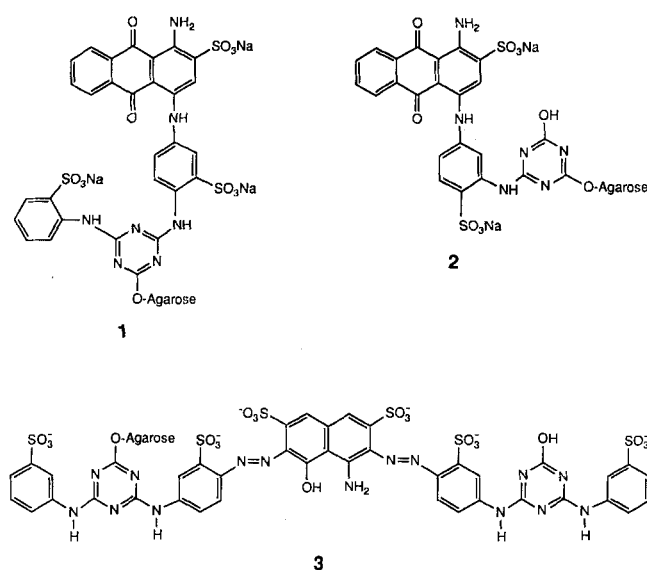


Schema 7. Strategie der Selektion zur Isolierung von Varianten des Tetrahymena-Ribozyms. Als Substrat wurden DNA-Oligonucleotide eingesetzt. Das Experiment ist so ausgelegt, daß diejenigen varianten Formen des Ribozyms selektiert wurden, die am besten mit dem DNA-Substrat reagieren können.

gen. Die relativ geringe Zahl von Beispielen für die Erkennung von kleinen Molekülen durch Nucleinsäuren läßt allgemeingültige Aussagen über diese Art molekularer Erkennung bislang nicht zu. Die Fähigkeit von Nucleinsäuren, kleine organische – auch abiotische – Moleküle zu erkennen, wie auch die Wahrscheinlichkeit, mit der eine zur spezifischen Erkennung fähige Sequenz in einem Pool zufälliger Sequenzen gefunden wird, wurde durch in-vitro-Selektionsexperimente untersucht.

### 3.6.1. Selektion für substratspezifische RNA-Rezeptoren

Ellington und Szostak verwendeten zur Selektion von RNA-Rezeptoren eine komplett zufällige Sequenz von 100 Basenpaaren, die von Primer-Bindungsstellen und dem T7-Promotor (siehe Schema 3) flankiert waren<sup>[41]</sup>. Im Pool waren mehr als  $10^{13}$  verschiedene RNA-Moleküle vorhanden; diese Zahl übertrifft die der möglichen Antikörper in der Maus ( $10^9$ – $10^{10}$ )<sup>[42]</sup>. RNA-Moleküle, die die Farbstoffe 1–3 binden, wurden durch Affinitätschromatographie mit Agarose, an die 1–3 kovalent gebunden waren, selektiert. Dehydrogenasen werden durch die gleiche Affinitätschromatographie gereinigt, weil die Farbstoffe 1–3 die Struktur von  $\text{NAD}^+$  und anderen Cofaktoren nachahmen<sup>[43]</sup>. Diese Liganden sind aromatische Verbindungen mit vielen Wasserstoffbrückendonatoren und -acceptoren und geladenen Gruppen, die alle zu starken Wechselwirkungen mit RNA in der Lage sein sollten (Schema 8).



Schema 8. Strukturen von Farbstoffmolekülen, die zur Selektion von spezifisch bindenden RNA-Molekülen verwendet wurden. 1: Cibacronblau 3G-A, 2: Reaktivblau 4, 3: Reaktivgrün 19.

Die Faltung von RNA in definierte dreidimensionale Strukturen wird durch zweiwertige Kationen induziert; deshalb wurde der RNA-Pool in einer  $\text{Mg}^{2+}$ -haltigen Pufferlösung auf die jeweilige Säule aufgebracht, und die nicht-bindenden Moleküle wurden mit demselben Puffer heruntergewaschen. Gebundene Spezies wurden dann mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) eluiert und amplifiziert. Nach den ersten Selektionsrunden wurde nur eine ge-

ringe Fraktion der RNA in der EDTA-Elution zurückerhalten; nach fünf Selektionscyclen zeigten jedoch etwa 50 % der Input-RNA Bindung an die Säule und wurden im EDTA-Elutionsschritt zurückgewonnen. In den fünf Selektionsrunden sind die bindenden Moleküle um den Faktor  $10^8$ – $10^{10}$  angereichert worden. Die Dissoziationskonstanten für die Bindung an 1–3 wurden durch analytische Affinitätschromatographie bestimmt und lagen zwischen 500  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ .

Der Pool selektierter RNAs enthielt sowohl farbstoffspezifische Moleküle als auch Moleküle, die anstatt an den Farbstoff an die Agarose binden. Die farbstoffspezifischen RNAs binden nur an diejenigen Farbstoffmoleküle, mit denen sie selektiert worden waren<sup>[44]</sup> (Tabelle 1).

Tabelle 1. Ermittlung der Spezifität der Bindung von RNAs an farbstoffderivatisierte Agarose.

Agarose derivatisiert mit	RNA selektiert an den Farbstoffen			
	1	2	3	Oligo(dT) [% Bindung]
1	63	1	1	6
2	8	85	1	5
3	7	1	73	6
Oligo (dT)	7	7	4	61

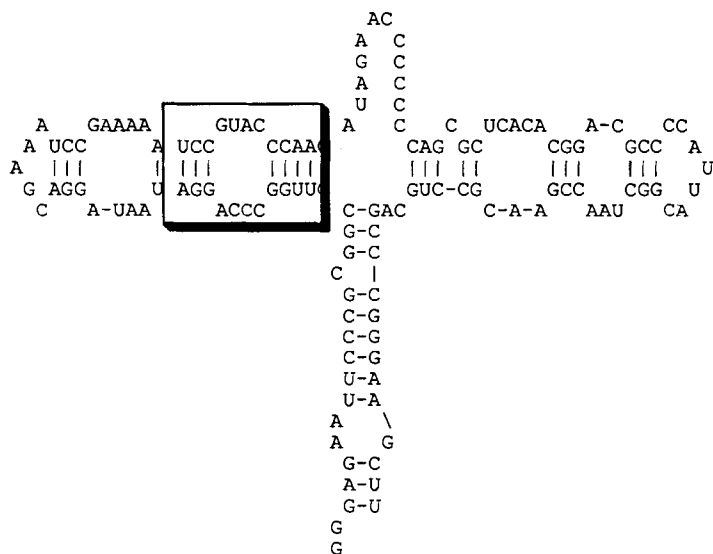
Die Spezifität, die in dieser Untersuchung beobachtet wurde, ist bemerkenswert angesichts der Ähnlichkeit der Strukturen der Farbstoffe 1 und 2. Die RNA-Rezeptoren zeigen sogar größere Spezifität für diese Liganden als viele Proteine<sup>[45]</sup>.

Um die Substrat-Bindungsstelle an bestimmten RNAs zu definieren, wurden die Template von zwei Klonen mit einer großen Anzahl von Mutationen synthetisiert (85 % Wildtyp, 5 % von jeder Nicht-Wildtyp-Base, siehe Schema 2b) und zur Herstellung neuer degenerierter RNA-Pools verwendet, die dann für Farbstoffbindung reselektiert wurden. Die Sequenzanalyse der neu selektierten Klone ergab konservierte Regionen, die wahrscheinlich die Bindungsstelle repräsentieren. Im Falle der RNA, die Cibacronblau 1 bindet, könnten die konservierten Sequenzen eine Stamm-Bauch-Stamm-Struktur bilden (Schema 9).

Kann die hier beschriebene Methode auch für kleinere Moleküle mit weniger potentiellen Wechselwirkungsstellen angewendet werden? Wir haben kürzlich einen RNA-Pool erhalten, der an D-Tryptophan-derivatisierter Agarose selektiert worden war. Die Bindung dieses Pools ist stereospezifisch<sup>[46]</sup>! Der Pool bindet an D-, aber nicht an L-Tryptophan-Agarose oder andere Substrate. Analytische Affinitätschromatographie eines der Klone ergab einen  $K_D$ -Wert von 18  $\mu\text{M}$ . Dieser Klon bindet an L-Tryptophan-Agarose mit einem  $K_D$  von mehr als 12 mM, was einer Differenz in den relativen Bindungsenergien von  $\Delta\Delta G = 3.8 \text{ kcal mol}^{-1}$  entspricht.

Der Befund, daß viele RNA-Sequenzen zwischen 1 und 2 oder D- und L-Tryptophan-Agarose unterscheiden können, zeigt, daß Bindungstaschen ähnlich denen in Proteinen selektiert wurden. Außerdem existieren immer viele Sequenz-„Lösungen“ für das Problem der Erkennung einer bestimmten Struktur.





Schema 9. Mögliche Sekundärstruktur der RNA B4-25, die an Reaktivblau 4 2 bindet. Im Kasten sind die Sequenzen, die in funktionellen Varianten konserviert waren und auch in einem unabhängigen Klon (B4-45) gefunden wurden.

Alle hier beschriebenen Experimente wurden mit Pools aus RNA-Molekülen durchgeführt. RNA und nicht DNA wurde für diese Experimente gewählt, weil die Existenz von tRNA und von RNA-Enzymen zeigt, daß RNA die zur molekularen Erkennung nötige komplexe dreidimensionale Struktur bilden kann. Einzelstrang-DNA unterscheidet sich jedoch von RNA nur dadurch, daß die 2'-Hydroxygruppe fehlt und sie eine 5-methylierte Version von Uracil (Thymin) enthält; sie sollte somit auch zur Faltung in komplexe Strukturen, die andere Moleküle erkennen können, fähig sein. Selektionsexperimente, ähnlich den oben beschriebenen, sind kürzlich mit Pools aus Einzelstrang-DNA-Molekülen durchgeführt worden<sup>[47]</sup>. Die Pools wurden durch asymmetrische PCR erhalten und amplifiziert, bei der einer der Primer effizienter ist als der andere, was zu einem Überschuß eines der beiden Stränge relativ zum Komplementärstrang führt. Einzelstrang-DNAs, die zur Bindung und Unterscheidung der oben beschriebenen Farbstoff-Agarosen in der Lage waren, konnten auf diese Weise problemlos erhalten werden. Die RNA-Version einer dieser DNA-Sequenzen bindet nicht an die entsprechende Farbstoff-Agarose, was zeigt, daß RNA- und DNA-Versionen der gleichen Sequenz hinsichtlich ihrer Eigenschaften in der molekularen Erkennung nicht äquivalent sind.

#### 4. Zusammenfassung und Ausblick

Wir haben hier eine Reihe von Anwendungen der in-vitro-Selektion diskutiert, von der Bestimmung von Proteinbindungsstellen an DNA und RNA über die Selektion verbesserter oder veränderter Ribozyme bis zur Synthese und Charakterisierung neuer Nucleinsäurerezeptoren. Wenn man auf die enormen Bemühungen blickt, die für das Design von kleinen Molekülen, die zur molekularen Erkennung fähig sind<sup>[48]</sup>, aufgewendet werden, dann mutet es fast ironisch an, daß die Methoden der Molekularbiologie es neuerdings ermöglichen, auf einfache Weise Nucleinsäuren zu isolieren, die genau diese Eigenschaften haben; beim Experimentator

ist aber keinerlei Kenntnis über die Struktur der (bindenden und gebundenen) Moleküle notwendig, und er weiß auch nichts über den Bindungsmechanismus. Sich vorzustellen, welche pharmakologische Anwendungen diese Technik hat, fällt leicht<sup>[49, 50]</sup>, und es erscheint durchaus einleuchtend, daß kürzere Oligonucleotide, die durch Bindung die Wirkung wichtiger Proteine hemmen, isoliert werden könnten<sup>[51]</sup>.

Nun kann vielleicht eines der interessantesten wissenschaftlichen Probleme bearbeitet werden: Können durch die Selektion von RNAs oder DNAs, die Liganden, die die Struktur des Übergangszustandes einer chemischen Reaktion nachahmen<sup>[52]</sup>, spezifisch binden, neue Biokatalysatoren, ähnlich den katalytischen Antikörpern<sup>[53]</sup>, erzeugt werden? Damit hätte man auch die Möglichkeit, experimentell diejenigen chemischen Reaktionen zu finden, die durch RNA (oder DNA) katalysiert werden können. Derartige Bemühungen könnten dazu dienen, die Plausibilität von Theorien, nach denen primitive Lebensformen einen komplexen Metabolismus auf der Basis von RNA-Katalyse entwickelt haben<sup>[54]</sup>, zu überprüfen.

#### 5. Glossar

**cDNA:** Abkürzung für komplementäre DNA; dabei handelt es sich um Einzelstrang-DNA, die durch die reverse Transkription eines RNA-Templats synthetisiert wurde.

**Elektrophorese-Mobility-Shift-Assay (EMSA) und Band-shift-Elektrophorese:** Methode zum Nachweis der Bindung eines Liganden, normalerweise eines Proteins oder Peptids, an eine Nucleinsäure. Die Bindung des Liganden beeinflusst die Mobilität des Polynucleotids im elektrischen Feld; die Nucleinsäure wandert langsamer im Gel, wenn sie an den Liganden gebunden ist.

**env, gag und pol:** Virale Gene, die für die Replikation von Retroviren notwendig sind; *env* codiert für die äußere Virushülle, *gag* für das Viruscapsid und *pol* für die reverse Transkriptase.

**fos-Oncoprotein:** Genprodukt von *fos*, einem Oncogen des Mäuse-Osteosarcomvirus. Es handelt sich um ein 55-kDa-Phosphoprotein, das im Zellkern lokalisiert ist; *fos* hilft als Transkriptionsaktivator für Wachstumsfaktoren, deren Transkription zu initiieren, indem es Heterodimere mit Proteinen wie dem Oncoprotein *jun* bildet. Die genaue Rolle, die das *fos*-Oncoprotein bei diesen Regulationsprozessen spielt, ist derzeit noch nicht vollständig verstanden (siehe beispielsweise M. J. Bishop, *Cell* 1985, 42, 23).

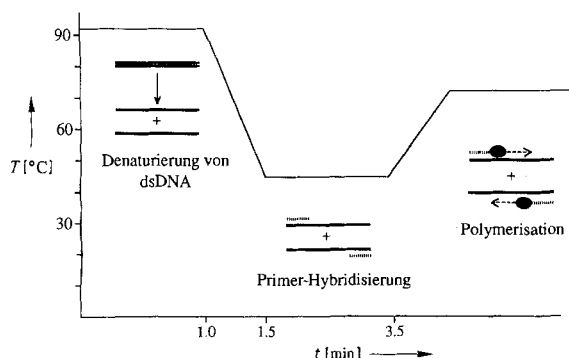
**Immunpräzipitation:** Technik zur schnellen Isolierung und Reinigung eines Antigens aus einem Proteingemisch. Diese Technik verwendet polyklonale oder monoklonale Immunglobuline (Igs), die spezifisch an das interessierende Protein binden. Der Antikörper/Antigen-Komplex wird durch die Bindung an ein Sekundärreagens, z.B. an einen anti-Antikörper, der an eine Trägermatrix gebunden ist, präzipitiert. Immunpräzipitation ist extrem empfindlich und selektiv: Bereits 100 pg eines radioaktiv markierten Proteins reichen zur Detektion aus. Die gewünschten Proteine werden normalerweise aus radioaktiv markierten Zellextrakten präzipitiert

(siehe beispielsweise D. J. Anderson, G. Blobel, *Methods Enzymol.* **1983**, 96, 111).

**In-vitro-Translation:** mRNAs, die durch in-vitro-Transkription erzeugt oder aus Säugerzellen extrahiert wurden, können in zellfreien Extrakten in ihre codierten Proteine translatiert werden (siehe beispielsweise P. A. Krieg, D. A. Melton, *Nature* **1984**, 308, 203).

**Phylogenetische Studien:** Unter Phylogenie versteht man die Beziehung zwischen Individuen, Spezies oder Populationen als eine Reflexion ihrer evolutionären Geschichte. In phylogenetischen Studien werden Klassifikationen auf der Basis evolutionärer Gemeinsamkeiten oder Unterschiede, z.B. in DNA-Sequenzen, vorgenommen und Verwandtschaftsbeziehungen aufgestellt.

**Polymerase-Kettenreaktion (PCR):** Technik, die die Amplifikation von DNA-Sequenzen ermöglicht. Anwendungen reichen von der Genetik über die Diagnose von Krankheiten bis zur forensischen Chemie. Das Schlüsselwerkzeug der PCR ist die hitzestabile DNA-Polymerase des Mikroorganismus *Thermus aquaticus*, Taq-DNA-Polymerase. Dieses Enzym hat sein Aktivitätsoptimum bei 72 °C, ist aber auch noch bei 95 °C stabil. Ein PCR-Cyclus (siehe Schema 10)



Schema 10.

besteht aus a) Denaturierung doppelsträngiger DNA in die beiden Einzelstränge (94 °C). b) Bindung (durch „Annealing“) der Primersequenzen an die einzelsträngigen Template. Primer-Bindungsstellen sollten mindestens 18–20 Basen lang sein; sie können aber auch deutlich länger sein. Je nach der Länge der Primer-Bindungsstellen kann die Annealingtemperatur von 40–60 °C reichen. Die Primer werden dem PCR-Gemisch in großem Überschuß zugesetzt. c) Synthese des Komplementärstranges durch Taq-DNA-Polymerase bei 72 °C.

Jeder PCR-Cyclus verdoppelt die Templatmenge, die im vorhergehenden Cyclus erzeugt worden war. Nach 20 PCR-Cyclen können im Idealfall  $2^{20} = 1\,048\,576$  Kopien des Input-Templats hergestellt werden. (Eine kurze und illustrative Diskussion der PCR-Technik bietet: H. Zinke, G. Gassen, *Angew. Chem.* **1990**, 102, A-292; siehe auch a) J. L. Marx, *Science* **1988**, 240, 1408; b) K. B. Mullis, *Sci. Am.* **1990**, 262, Nr. 4, S. 56; c) H. Ibelgaufs: *Lexikon Zytokine*, Medikon Verlag, München, **1992**, S. 66ff.

**Serum-Response-Faktor (SRF):** Transkriptionsfaktor, der an das *c-fos*-Serum-Response-Element (SRE) bindet, eine multifunktionelle regulatorische Region des *c-fos*-Promotors, die auf eine Reihe von Inducern anspricht (siehe C. Norman, M. Runswick, R. M. Pollock, R. Treisman, *Cell* **1988**, 55, 989).

**Zinkfinger:** Strukturmotiv in eukaryotischen transkriptionsregulierenden Proteinen. Zinkfinger haben eine Länge von etwa 30 Aminosäuren. Das Motiv enthält Histidin- und Cysteinreste, deren Seitenketten als Liganden für ein tetraedrisch koordiniertes  $Zn^{2+}$ -Ion dienen. Zur spezifischen DNA-Bindung sind mehrere Zinkfingerdomänen innerhalb der Proteinkette nötig; das Protein TFIIIA z.B. enthält zehn (siehe z.B. „Helix-turn-helix, zinc finger, and leucine zipper motifs for eucaryotic transcriptional regulatory proteins“: K. Struhl, *Trends Biochem. Sci.* **1989**, 14, 137–140).

Wir danken der Hoechst-AG und dem Fonds der Chemischen Industrie (Liebig-Stipendium für M. F.) für die großzügige Förderung unserer Arbeiten. Unseren Mitarbeitern und Kollegen David Bartel, Andrew Ellington, Rachel Green, Anusch Peyman, Mandana Sassanfar und Charles Wilson danken wir für ihre Beiträge und Diskussionen, Jon Lorsch für seine Hilfe bei der Erstellung des Glossars.

Eingegangen am 27. Dezember 1991 [Z 875]

- [1] a) Für eine kurze Diskussion siehe: R. Lewin, *New Sci.* **1990**, 128, 8, Dezember 1990, S. 30; b) J. W. Szostak, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, 17, 89.
- [2] Selbst in einer „sehr guten“ Bibliothek von z.B. 100 Basenpaaren ist nur ein relativ kleiner Bruchteil aller möglichen Sequenzen auch tatsächlich im Pool vorhanden. Das ist keine Konsequenz der Ineffizienz der chemischen Oligonucleotidsynthese: Wollte man sämtliche möglichen Permutationen einer Zufallssequenz von 100 Basen im Pool haben, so müßte man  $4^{100} = 10^{60}$  verschiedene Moleküle herstellen. Das entspricht einer Menge von nicht weniger als  $10^{38}$  kg DNA. Die zur Zeit gängigen Oligonucleotidsynthesen ermöglichen eine quantitative Abdeckung sämtlicher möglicher Sequenzpermutationen von 25 Basen oder weniger.
- [3] a) K. B. Mullis, F. A. Faloona, *Methods Enzymol.* **1987**, 155, 335; b) T. J. White, N. Arnheim, H. A. Ehrlich, *Trends Genet.* **1989**, 5, 185.
- [4] Diese Idee scheint auf den ersten Blick der allgemeinen Richtung der modernen Organischen Chemie, möglichst einheitliche Produkte herzustellen, entgegenzulaufen. Hier gilt die Devise: Je mehr unterschiedliche Moleküle in einer Synthese enthalten werden, um so besser. Es ist allerdings klar, daß saubere Reaktionsschritte mit möglichst großer Ausbeute zur Maximierung der Ausbeute an synthetischer DNA nötig sind. Hier könnten sich in Zukunft die neuen, von Noyori et al. entwickelten Methoden der Oligonucleotidsynthese bewähren, mit denen lange Oligonucleotide großer Reinheit erhalten werden: Y. Hayakawa, S. Wakabayashi, H. Kato, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 1691; Y. Hayakawa, H. Kato, T. Nobori, R. Noyori, J. Imai, *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* **1986**, 17, 97; Y. Hayakawa, H. Kato, M. Uchiyama, H. Kajino, R. Noyori, *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 2400. Es erscheint zudem erstrebenswert für die in-vitro-Selektion Sequenzen von 250 oder mehr Basen Länge einzusetzen. Solche Sequenzen können durch chemische Synthese nicht erzeugt werden, sind aber zugänglich, wenn definierte Restriktionsschnittstellen innerhalb des random-Oligonucleotids eingebaut werden, so daß mehrere Fragmente ligiert werden können (D. P. Bartel, M. Famulok, J. W. Szostak, unveröffentlicht).
- [5] J. W. Engels, E. Uhlmann, *Angew. Chem.* **1989**, 101, 733; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, 28, 716.
- [6] D. P. Bartel, M. Famulok, R. Green, J. W. Szostak, unveröffentlicht.
- [7] Eines der Hauptprobleme bei der Synthese längerer Sequenzen (150–200 Basen) liegt darin, daß mit zunehmender Kettenlänge verstärkt Depurinierungen auftreten (G. Remaud, X.-X. Zhou, J. Chattopadhyaya, M. Ovannen, H. Lönnberg, *Tetrahedron* **1987**, 43, 4453; siehe auch C. Tamm, E. Hodes, E. Chargaff, *J. Biol. Chem.* **1952**, 195, 49; C. Tamm, H. Shapiro, R. Lipshitz, E. Chargaff, *ibid.* **1953**, 203, 673). Das kann zu Verzweigungen des DNA-Stranges während der nachfolgenden Syntheseschritte oder zum Kettenabbruch führen. Solche Oligonucleotide sind dann durch PCR nicht mehr amplifizierbar. Eine Möglichkeit, diese Nebenreaktionen zurückzuführen, ist die Verwendung der aprotischen Lewis-Säure  $BF_3$  in Methanol anstelle der normalerweise zum Entfernen der Dimethoxytrityl-Schutzgruppe verwendeten protischen Säuren  $Cl_3CHCOOH$  oder  $Cl_3CCOOH$  (M. Mitchell, *Nucleic Acids Res.* **1990**, 18, 5321).

- [8] R. Green, A. D. Ellington, D. P. Bartel, J. W. Szostak, *Methods* **1991**, 27, 5.
- [9] a) A. R. Oliphant, K. Struhl, *Methods Enzymol.* **1987**, 155, 568; b) *Nucleic Acids Res.* **1988**, 16, 7673; c) A. R. Oliphant, C. J. Brandl, K. Struhl, *Mol. Cell. Biol.* **1989**, 9, 2944.
- [10] a) K. W. Kinzler, B. Vogelstein, *Nucleic Acids Res.* **1989**, 17, 3645; b) *Mol. Cell. Biol.* **1990**, 10, 634.
- [11] a) H.-J. Thiesen, C. Bach, *Nucleic Acids Res.* **1990**, 18, 3203; b) H.-J. Thiesen in *Immunological Methods* (Hrsg.: I. Lefkovits, B. Perris), Academic Press, Orlando, FL, USA, **1990**, S. 61–75.
- [12] Diese Technik der in-vitro-Selektion wurde „Target Detection Assay“ (TDA) genannt.
- [13] T. K. Blackwell, H. Weintraub, *Science* **1990**, 250, 1104.
- [14] P. Donner, I. Greiser-Wilke, K. Moelling, *Nature* **1982**, 296, 262; R. N. Eisenman, C. Y. Tachibana, H. D. Abrams, S. R. Hann, *Mol. Cell. Biol.* **1985**, 5, 114.
- [15] R. L. Davis, P.-F. Cheng, A. B. Lassar, H. Weintraub, *Cell* **1990**, 60, 733.
- [16] C. Murre, P. Schonleber McCaw, H. Vaessin, M. Caudy, L. Y. Jan, Y. N. Jan, C. V. Cabrera, J. N. Buskin, S. D. Hauschka, A. B. Lassar, H. Weintraub, D. Baltimore, *Cell* **1989**, 58, 537.
- [17] Diese Technik wurde als „Selected and Amplified Binding Sites“- oder „SAAB“-Technik bezeichnet.
- [18] R. Pollock, R. Treisman, *Nucleic Acids Res.* **1990**, 18, 6197.
- [19] a) C. R. Woese, R. Gutell, R. Gupta, H. F. Noller, *Microbiol. Rev.* **1983**, 47, 621; b) M. Levitt, *Nature* **1969**, 224, 759.
- [20] Strukturstabilität an sich muß nicht unbedingt das Kriterium für evolutionäre Konservierung sein, da unproduktive Faltungen durchaus energetisch niedriger liegen können als produktive.
- [21] a) M. H. Malim, J. Hauber, S.-Y. Le, J. V. Maizel, B. R. Cullen, *Nature* **1989**, 338, 254; b) B. K. Felber, M. Hadzopoulou-Cladaras, C. Cladaras, T. Copeland, G. N. Pavlakis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 1495; c) M. Emerman, R. Vazeux, K. Peden, *Cell* **1989**, 57, 1155; d) M.-L. Hammarikjöld, J. Heimer, B. Hammarikjöld, I. Sangwan, L. Albert, D. Rekosh, *J. Virol.* **1989**, 63, 1959.
- [22] a) M. H. Malim, L. S. Tiley, D. F. McCarn, J. R. Rusche, J. Hauber, B. R. Cullen, *Cell* **1990**, 60, 675; b) S. Heaphy, C. Dingwall, I. Ernberg, M. J. Gait, S. M. Green, J. Karn, A. D. Lowe, M. Singh, M. A. Skinner, *ibid.* **1990**, 60, 685; c) S. M. Holland, N. Ahmad, R. K. Maitra, P. Wingfield, S. Venkatesan, *J. Virol.* **1990**, 64, 5966.
- [23] D. P. Bartel, M. L. Zapp, M. R. Green, J. W. Szostak, *Cell* **1991**, 67, 529.
- [24] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer, New York, **1984**.
- [25] a) M. Andrade, N. Guild, T. Hsu, L. Gold, C. Tuerk, J. Karam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 7942; b) C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, 249, 505.
- [26] Der Bakteriophage RB69 enthält eine der T4-Struktur gleichende Stamm-Schleifen-Struktur in der entsprechenden Ribosomenbindungsstelle seines DNA-Polymerasegens: C. Tuerk, S. Eddy, D. Parma, L. Gold, *J. Mol. Biol.* **1990**, 213, 749.
- [27] Dieses Verfahren wurde von den Autoren „SELEX“ genannt (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment).
- [28] D. Pei, H. D. Ulrich, P. G. Schultz, *Science* **1991**, 253, 1408.
- [29] T. R. Cech, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 761; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 759.
- [30] a) T. R. Cech, A. J. Zaig, P. J. Grabowski, *Cell* **1981**, 27, 487; b) K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaig, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, *ibid.* **1982**, 31, 147; c) T. R. Cech, *Science* **1987**, 236, 1532; d) *Gene* **1988**, 73, 259; e) N. R. Pace, T. L. Marsh, *Orig. Life Evol. Biosphere* **1985**, 16, 97.
- [31] R. Green, A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, 347, 406.
- [32] Phylogenetische Vergleiche von Introns der Klasse I ergaben eine interessante potentielle Covariation: in 32 von 35 Introns der Klasse I ist das Basenpaar 7 im P3-Stamm (P3-7) ein G-C, die 2. Base in der Region, die P3 mit P7 verbindet (J3/7-2), ist ein A und die verbindende Region enthält drei Basen. In den drei verbleibenden Introns der Klasse I ist P3-7 ein G-C, J3/7-2 entweder ein U oder ein G, und J3/4 enthält nur zwei Basen. Auf der Basis solcher phylogenetischer Daten erscheint es plausibel, daß Nucleotide in dieser Region miteinander wechselwirken. S. Couture, A. D. Ellington, J. A. Doudna, R. Green, M. Hanna, U. Pace, J. Rajagopal, J. W. Szostak, *J. Mol. Biol.* **1990**, 215, 345.
- [33] J. M. Burke, M. Belfort, T. R. Cech, R. W. Davies, R. J. Schwyden, D. A. Shub, J. W. Szostak, H. F. Tabak, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 7217.
- [34] a) F. Michel, E. Westhof, *J. Mol. Biol.* **1990**, 216, 585; b) F. Michel, A. D. Ellington, S. Couture, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, 347, 578.
- [35] a) D. L. Robertson, G. F. Joyce, *Nature* **1990**, 344, 467; b) G. F. Joyce in *RNA: Catalysis, Splicing and Evolution* (Hrsg.: M. Belfort, D. Shub), Elsevier, Amsterdam, **1977**, S. 83.
- [36] a) Siehe Lit. [30 c]; b) P. A. Sharp, *Cell* **1985**, 42, 397; c) G. F. Joyce, *Nature* **1989**, 338, 519. Siehe auch: d) M. Famulok, J. S. Nowick, J. Rebek, Jr., *Acta Chim. Scand.* **1992**, 46, 315; e) A. D. Ellington, *Methods Enzymol.*, im Druck; f) A. Terfort, G. von Kiedrowski, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 626; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 654, zit. Lit.
- [37] a) J. A. Doudna, J. W. Szostak, *Nature* **1989**, 339, 519; b) J. A. Doudna, S. Couture, J. W. Szostak, *Science* **1991**, 251, 1605; c) T. R. Cech, *Nature* **1989**, 339, 507.
- [38] a) J. A. Latham, T. R. Cech, *Science* **1989**, 245, 276; b) D. W. Celander, T. R. Cech, *Biochemistry* **1990**, 29, 1355.
- [39] F. Michel, M. Hanna, R. Green, D. P. Bartel, J. W. Szostak, *Nature* **1989**, 342, 391.
- [40] F. Takusagawa, M. Dabrow, S. Neidle, H. M. Berman, *Nature* **1982**, 296, 406.
- [41] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, 346, 818.
- [42] J. Klein, *Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination*, Wiley, New York, **1982**, S. 219.
- [43] a) S. T. Thompson, K. H. Cass, E. Stellwagen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, 72, 669; b) C. R. Lowe, M. Glad, P.-O. Larsson, S. Ohlson, D. A. P. Small, T. Atkinson, K. Mosbach, *J. Chromatogr.* **1981**, 215, 303; c) K. Schneider, M. Pinkwart, K. Jochim, *Biochem. J.* **1983**, 213, 391; d) C. V. Stead, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1987**, 37, 55.
- [44] Für die selektierten RNA-Moleküle wurde der Begriff „Aptamer“ geprägt (lat. aptus = passen).
- [45] a) A. Ashton, G. M. Poyla, *Biochem. J.* **1978**, 175, 501; b) Y. D. Clonis, C. R. Lowe, *ibid.* **1980**, 191, 247.
- [46] M. Famulok, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3990.
- [47] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1992**, 355, 850.
- [48] Siehe zum Beispiel: a) J. M. Lehn, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 1347; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 1304; b) J. Rebek, Jr., *ibid.* **1990**, 102, 1347, bzw. **1990**, 29, 245; c) H.-J. Schneider, *ibid.* **1991**, 103, 1419 bzw. **1991**, 30, 1417.
- [49] M. L. Riordan, J. C. Martin, *Nature* **1991**, 350, 442.
- [50] J. Abelson, *Science* **1990**, 249, 488.
- [51] Die Verwendung unmodifizierter Oligonucleotide müßte sich wegen des Problems der Zelldurchdringung auf extrazelluläre Anwendungen beschränken.
- [52] a) L. Pauling, *Am. Sci.* **1948**, 36, 51; b) W. P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York, **1969**; c) P. A. Bartlett, C. K. Marlowe, *Biochemistry* **1983**, 22, 4618.
- [53] a) K. D. Janda, D. Schloeder, S. J. Benkovic, R. A. Lerner, *Science* **1988**, 241, 1188; b) P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1989**, 101, 1336; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, 28, 1283; c) P. G. Schultz, R. A. Lerner, S. J. Benkovic, *Chem. Eng. News* **1990**, 68, Nr. 22, 26.
- [54] a) Siehe Lit. [36 b]; b) L. E. Orgel, *J. Theor. Biol.* **1986**, 123, 127.