

Cofaktor-abhängige Selbstspaltung von DNA-Bibliotheken mit einer 3'-5'-Phosphoamidatbindung**

Jens Burmeister, Günter von Kiedrowski* und Andrew D. Ellington

Dr. Leslie E. Orgel zum 70. Geburtstag gewidmet

Die Technik der gerichteten molekularen Evolution^[1] hat sich zu einem leistungsfähigen Werkzeug der evolutiven Biotechnologie entwickelt. Durch In-vitro-Selektionstechniken gelang es, RNA-Aptamere für molekulare Zielstrukturen zu isolieren^[2] sowie künstliche Ribozyme mit erstaunlichen katalytischen Eigenschaften zu entwickeln.^[3] Neuere Untersuchungen auf der Basis von DNA ergaben, daß auch Desoxyribozyme mit interessanten katalytischen Eigenschaften durch In-vitro-Selektion zugänglich sind.^[4] Die Technik der gerichteten molekularen Evolution könnte sich bei der Suche nach einem exponentiell selbstreplizierenden System auf der Basis von Oligodesoxynucleotid-Analoga ebenfalls als nützlich erweisen.^[5] Ziel dieser Arbeit war die Selektion eines 5'-Aminooligodesoxynucleotides, das zur Katalyse der Carbodiimid-abhängigen Kondensation der Tridesoxynucleotide CCGp und pCGG unter Bildung des hexameren 3'-5'-Pyrophosphates CCGppCGG fähig ist.^[6] Ein solches Aminooligodesoxynucleotid könnte als nucleophiler Katalysator des Phosphoryltransferschrittes im Sinne einer Abgangsgruppe fungieren (Abb. 1). Ähnliche Transphosphorylierungen unter Beteiligung von Phosphoamidaten und Pyrophosphaten treten bei Reaktionen auf, die von der T7-DNA-Ligase katalysiert werden.^[7]

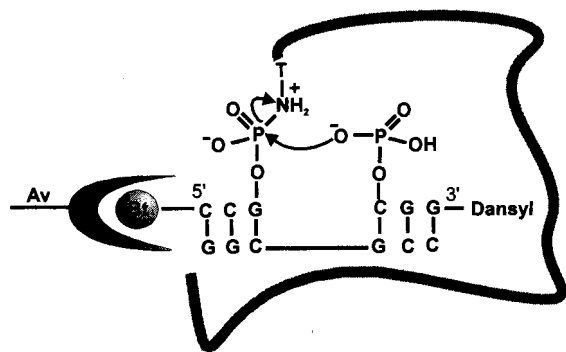
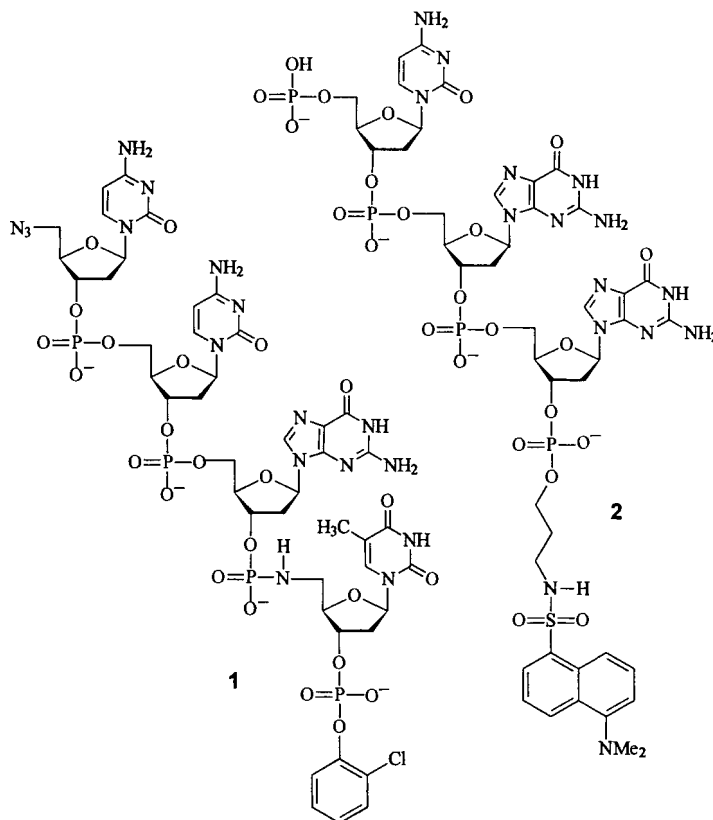


Abb. 1. Schematische Darstellung der Templat-gesteuerten Transphosphorylierung (Av = Avidin, Bt = Biotin).

Um die geplante Transphosphorylierung besser zu verstehen, haben wir zunächst die nichtkatalysierte Reaktion zwischen den Modellverbindungen N3-CCGpnT **1** und p-CGG-Dansyl **2** durch HPL-Chromatographie unter Fluoreszenz- und UV-Detektion untersucht.^[8] Selbst nach langen Reaktionszeiten (bis zu



zwei Monaten) konnte das durch Phosphoryltransfer entstehende fluoreszierende Hexadesoxynucleotid N3-CCGppCGG-Dansyl nicht nachgewiesen werden. Es trat ausschließlich Hydrolyse der 3'-5'-Phosphoamidatbindung (pn-Bindung) ein, wobei der Logarithmus der Hydrolysegeschwindigkeit linear vom pH-Wert abhängt. Zwischen pH = 3 und 7 liegt folgende Gesetzmäßigkeit für die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung vor [Gl. (1)].^[9]

$$\lg(k/h^{-1}) = 1.2 - 0.97 \times \text{pH} \quad (1)$$

Ausgehend von diesen Modellstudien planten wir, mit In-vitro-Selektionsmethoden Nucleinsäuresequenzen aufzufinden, die zur Katalyse der pn-Bindungsspaltung und möglicherweise auch zur Beschleunigung der Pyrophosphatligation befähigt sind. Hierzu synthetisierten wir einen modifizierten Primer, der 5'-terminal eine Biotinmodifikation und eine der Anfangssequenz CCG folgende pn-Bindung enthielt sowie einen unmodifizierten Primer für die zweite Bindungsstelle.^[10] Mit diesen Primern wurde ein DNA-Pool, bei dem eine 72mere Randomsequenz von zwei konstanten Primerbindungsstellen flankiert wird (Abb. 2), durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Durch Immobilisierung des Doppelstrang-DNA-Pools an mit Streptavidin beschichteten paramagnetischen Partikeln (Promega) und nachfolgendes Entfernen des nichtbiotinylierten Stranges unter denaturierenden Bedingungen erhielt man einen Einzelstrang-DNA-Pool. Die In-vitro-Selektion wurde an der Festphase durchgeführt, indem man den Pool nach Immobilisierung mit dem Trimer **2** (im Überschuß, 5 mM) sowie dem hexameren Templat CCGCGG (im Überschuß, 5 mM) in einem Magnesium-haltigen Puffer mit hoher Salzkonzentration inkubierte. Vor Beginn der eigentlichen Selektion erwärmte man das Gemisch 5 min auf 50 °C, um eine kurze Auf- und Rückfaltung der Einzelstränge unter Einschluß von Trimer und Templat zu ermöglichen.

[*] Prof. Dr. G. von Kiedrowski, Dipl.-Chem. J. Burmeister
Lehrstuhl für Organische Chemie I der Universität
Universitätsstraße 150, D-44801 Bochum
Telefax: Int + 234/700-3218
E-mail: kiedro@ernie.orch.ruhr-uni-bochum.de

Prof. Dr. A. D. Ellington
Department of Chemistry
Indiana University
Bloomington, IN 47405 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der NATO gefördert. Wir danken D. Bartel für die Überlassung des N72-Pools.

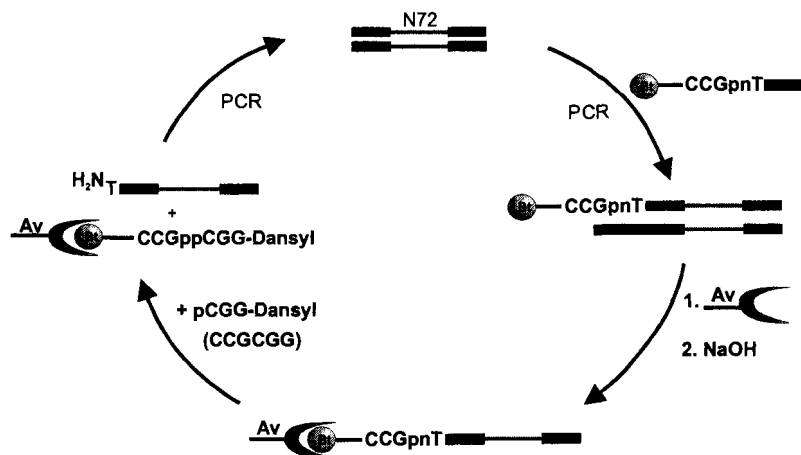
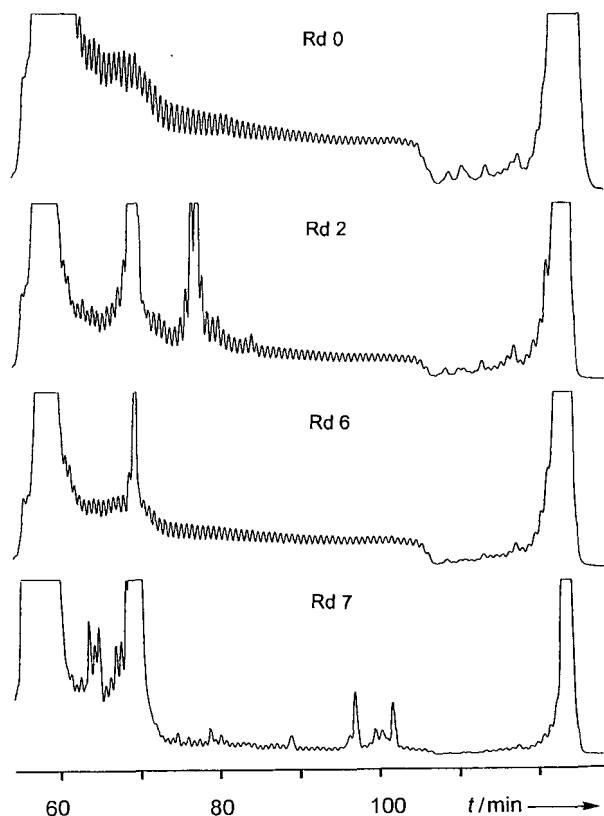


Abb. 2. Der Selektionszyklus. Der N72-Pool hatte die folgende Sequenz: 5'-GGAACAC-TATCCGACTGGCACC-N72-CCTTGGTCATTAGGATCCCG-3'. Primer für die PCR-Amplifikation: 5'-Bt-CCGpnTGGATCCTAATGACCAAGG-3' (Primer A) und 5'-AACAC-TATCCGACTGGCACC-3' (Primer B). Die PCR wurde in 30 Reaktionen unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 80 pmol Primer A, 80 pmol Primer B, 300 nmol $MgCl_2$, 40 nmol dNTPs, 100 ng Templat, 20 μL ($10 \times$) PCR-Puffer (Promega), 0,05 $U \mu L^{-1}$ Taq-DNA-Polymerase in 200 μL Gesamtvolumen. Temperaturgradient: 45 s bei $T = 94^\circ C$, 1 min bei $T = 52^\circ C$, 2 min bei $T = 72^\circ C$ und 5 min bei $T = 72^\circ C$ nach sechs Cycles. Zur Immobilisierung wurde der lyophilisierte Pool 20 min in Phosphate buffered saline (PBS; pH = 8, 0,690 M NaCl, 0,010 M KCl, 0,045 M Na_2HPO_4 , 0,008 M KH_2PO_4) über ca. 2 mg mit Streptavidin beschichteten paramagnetischen Partikeln (Promega) inkubiert. Die Denaturierung erfolgte durch Inkubation der Festphase (15 min) in 0,2 M NaOH. Zur Durchführung der Selektion inkubierte man die paramagnetischen Partikel in 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)-Puffer (0,1 M MES, Natriumsalz (pH = 6,1), 0,05 M $MgCl_2$, 0,50 M NaCl, 0,50 M KCl) in Gegenwart von pCGG-Dansyl (5 μM) und CCGCGG (5 μM) bei $T = 23^\circ C$ nach anfänglichem Erwärmen auf $T = 50^\circ C$ (5 min). Man fällt die freigesetzten Amino-oligomere mit Ethanol und amplifiziert durch PCR mit Primer B und 5'-CGGGATCCTAATGACCAAGG-3' (Primer C) unter den beschriebenen Bedingungen (n Cycles).

In den Runden 1–6 wurde die Selektion jeweils 30 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Die während dieser Zeitspanne abgespaltenen 5'-Amino-oligomere wurden durch PCR amplifi-



ziert und bildeten den Ausgangspool für die nächste Selektionsrunde. Ab der siebten Runde erhöhten wir die Stringenz der Selektion durch sukzessive Verkürzung der Inkubationszeit; in der zehnten Runde betrug diese noch 1 h. Gleichzeitig führten wir einen Negativselektionsschritt ein, so daß die DNA-Sequenzen entfernt werden konnten, die sich durch Hydrolyse der pn-Bindung ohne Trimer 2 und Templat von der Festphase abgelöst hatten.^[11] Der Verlauf der In-vitro-Selektion wurde durch Restriktionsverdau^[3a] und Summensequenzierung^[12] verfolgt. Im Restriktionsmuster der zweiten Selektionsrunde sind erste Veränderungen im Sequenzraum erkennbar, die Negativselektion führte zu einer weiteren drastischen Verminderung der Pooldiversität (Abb. 3). Nach unseren Erfahrungen ist ein automatisierter DNA-Sequencer bei Summensequenzierungen und Restriktionsanalysen sehr hilfreich, da er die schnelle Analyse des Selektionsverlaufes ermöglicht und darüber hinaus zur Quantifizierung der Pooldiversität geeignet sein kann.^[13] Die nach den letzten Selektionsrunden erhaltenen PCR-Produkte wurden kloniert und individuelle Klone sequenziert. In zehn von elf sequenzierten Klonen fand man eine Sequenz,^[14] deren Sekundärstruktur mit dem Computerprogramm DNA *mfold* von Zuker et al.^[15] berechnet wurde (Abb. 4). Man erkennt, daß eine Faltung der eingangs randomisierten Region um die konstant gehaltenen Primersequenzen erfolgt. Zur Aufklärung der Wirkungsweise der selektierten Pools wurden sowohl an der Festphase, als auch in Lösung Funktionsanalysen auf der Basis von Radioassays durchgeführt. Für den Festphasenassay führte man das isoto- penmarkierte Nucleotid d- α - ^{32}P -ATP während der PCR-Amplifikation selektierter Pools ein. Die Isotopenmarkierung

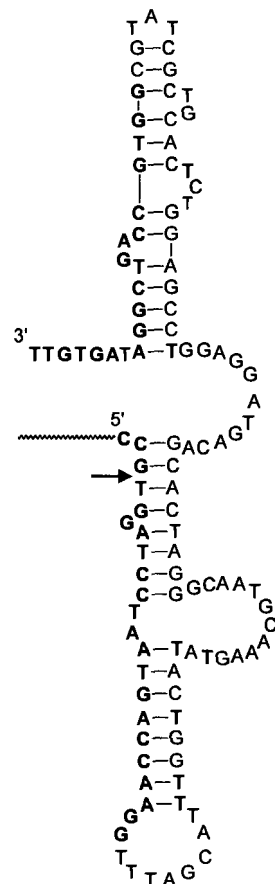


Abb. 4. Vorschlag zur Sekundärstruktur des dominierenden Klon, berechnet mit DNA *mfold*^[15] für $T = 23^\circ C$. Die Primersequenzen sind fett dargestellt, der Pfeil markiert die Position der pn-Bindung. Die Klonierung erfolgte mit dem TA-Cloning-Kit (Invitrogen), die Sequenzierungsreaktionen wurden auf einem ALFexpress-Sequencer (Pharmacia) analysiert.

Abb. 3. Analyse der Pooldiversität. DNA jeder Selektionsrunde wurde durch PCR mit dem CY5-modifizierten Primer 5'-CY5-CGGGATCCTAATGACCAAGG-3' (Primer D, Synthese durch die Firma Pharmacia) sowie dem nichtmodifizierten Primer B amplifiziert (siehe Legende zu Abb. 2). Die PCR-Produkte (je 4 μg) wurden mit einer Kombination der Restriktionsendonucleasen AluI, TaqI und Tru9I (je 10 U Enzym in 10 mM Tris-HCl (pH = 7,9), 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl und 1 mM 1,4-Dimercapto-2,3-butandiol, DTT) verdaut. Die Fragmentalanalyse erfolgte auf dem automatisierten Sequenzer ALFexpress (Pharmacia). Der Peak bei 130 min ist auf das Poolfragment mit voller Länge zurückzuführen, der Primer wird bei 58 min detektiert. Der dominierende Klon enthält keine Restriktionsstelle, der Peak bei 70 min kommt wahrscheinlich durch Schnitt an der Tru9I-Stelle im zweiten isolierten Klon zustande, Rd = Runde.

ermöglichte die empfindliche Detektion aller Säuleneluat durch Gelelektrophorese und Autoradiographie (Tabelle 1).

Die Analysen ergaben, daß 1) bei der Inkubation selektierter Pools in Gegenwart des Trimers **2** 5'-Aminooligomere eluiert

Tabelle 1. Ergebnisse des Festphasenassays. Man amplifizierte die selektierten Pools durch PCR mit 8 pmol Primer A, 8 pmol Primer B, 16 nmol MgCl_2 , 0.4 nmol dNTPs, 25 μCi d- $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP, 10 ng Templat, 0.05 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$ Taq-DNA-Polymerase, 2 μL (10 \times) PCR-Puffer (Promega) in 20 μL Gesamtvolumen. Immobilisierung, Denaturierung und Selektion wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie für die In-vitro-Selektion beschrieben (siehe Legende zur Abb. 2). Die erhaltenen Säuleneluat wurden vereinigt und durch Gelelektrophorese auf 10% Polyacrylamid-7 M Harnstoff-Gelen analysiert.

Runde	Mg^{2+} (50 mM)	Cofaktoren (5 μM)	Aktivität [a]
0/1	+	pCGG und CCGCGG	–
8	+	pCGG und CCGCGG	++
8	–	pCGG und CCGCGG	+
8	+	pCGG	++
8	+	CCGCGG	–
0/8	+	–	–
8	+	pCGT	–
8	+	pATT	–
8	+	HOCGG	–
0/8	+	1 mM Phosphat (pH = 6)	–

[a] Bezogen auf die nach einer 16stündigen Inkubation erhaltene Eluatmenge bezüglich der Gesamtmenge an denaturiertem Gegenstrang: ++: etwa 50% Eluat; +: etwa 20% Eluat; –: <5% Eluat.

werden, die bei der Inkubation des Ausgangspools unter den gleichen Bedingungen nicht detektierbar sind, 2) der Elutionsprozeß unabhängig vom Hexadesoxynucleotid CCGCGG verläuft, aber von der Sequenz des Trimers abhängt, 3) die 5'-Phosphatgruppe im Trimer essentiell ist, 4) mit Phosphat allein keine Spaltung erfolgt und 5) die Spaltung ohne Magnesium deutlich langsamer verläuft.

Zur Klärung der Frage, ob die Abspaltung von der Festphase auf einer Hydrolyse der pn-Bindung oder auf einem Phosphoryltransfer beruht, entwickelten wir einen Flüssigphasenassay. Um das Produkt der Hydrolyse von dem des Phosphoryltransfers durch Elektrophorese eindeutig unterscheiden zu können, war eine Verlängerung der Bibliothek an der 5'-Seite erforderlich. Hierzu synthetisierten wir einen modifizierten Primer mit der Anfangssequenz ATGCTGCCGpnT statt CCGpnT. Gemäß der Sekundärstruktur des dominierenden Klon (Abb. 3) sollte die Verlängerung um sechs Basen zu keiner signifikanten Störung des Systems führen. Die selektierten Pools wurden mit dem modifizierten Primer sowie einem zweiten Primer, der eine 5'-terminale Lengthener-terminator-Sequenz enthielt,^[16] durch PCR amplifiziert. Die einzelsträngige DNA wurde gelelektrophoretisch gereinigt und anschließend unter Verwendung von T4-Polynucleotidkinase mit γ - ^{32}P -ATP radioaktiv markiert. Bei Inkubation der selektierten Pools in Gegenwart von **2** konnte sowohl mit als auch ohne Hexamer die Bildung eines kurzen Oligonucleotides nachgewiesen werden, dessen Länge mit der des erwarteten Hydrolyseprodukts übereinstimmte. Das durch Ligation entstehende dodekamere Produkt war hingegen nicht nachweisbar.

Aus diesen Ergebnissen folgern wir, daß die In-vitro-Selektion ein neuartiges Oligodesoxynucleotid lieferte, das die Hydrolyse einer internen 3'-5'-Phosphoamidatbindung in Gegenwart des Nucleotid-Cofaktors pCGG-Dansyl **2** katalysiert. Die Cofaktor-abhängige Hydrolyse ist um mindestens drei Größenordnungen schneller als die nichtkatalysierte Hydrolyse, wenn man die grob abschätzbare Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung mit der der Modellverbindung **1** vergleicht.^[17]

Unsere bisherigen Ergebnisse unterstreichen das katalytische Potential der DNA und geben gleichzeitig das erste Beispiel für ein Cofaktor-abhängiges Desoxyribozym.

Eingegangen am 12. Dezember 1996 [Z9896]

Stichworte: DNA-Spaltung · Kombinatorische Chemie · Ribozyme

- [1] a) C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505–510; b) A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 812–822; c) A. A. Beaudry, G. F. Joyce, *Science* **1992**, *257*, 635–641.
- [2] Übersichtsartikel: a) R. C. Conrad, L. Giver, Y. Tian, A. D. Ellington, *Methods Enzymol.* **1996**, *267*, 336–367; b) J. R. Lorsch, J. W. Szostak, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 103–110; c) M. Famulok, J. W. Szostak, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1001–1011; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 979–988.
- [3] a) D. P. Bartel, J. W. Szostak, *Science* **1993**, *261*, 1411–1418; Übersichtsartikel: b) P. Burgstaller, M. Famulok, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1303–1307; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1189–1193.
- [4] a) R. R. Breaker, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 223–229; b) B. Cuenod, J. W. Szostak, *Nature* **1995**, *375*, 611–614; c) R. R. Breaker, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 665–660; d) Y. Li, D. Sen, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 743–747; e) D. Faulhammer, M. Famulok, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2984–2988; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2837–2841; f) N. Carmi, L. A. Shultz, R. R. Breaker, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 1039–1046.
- [5] B. G. Bag, G. von Kiedrowski, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 2145–2152.
- [6] G. von Kiedrowski, B. Wlotzka, J. Helbing, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 1259–1261; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 1235–1237.
- [7] J. D. Watson, N. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steitz, A. M. Weiner, *Molecular Biology of the Gene*, 4. Aufl., Benjamin/Cummings, New York, **1987**.
- [8] N3-CCGpnT **1** und pCGG-Dansyl **2** wurden nach dem Phosphotriesterverfahren in flüssiger Phase synthetisiert.
- [9] Die Reaktionen ($T = 23^\circ\text{C}$, 1 mM N3-CCGpnT **1**, 50 mM Magnesiumchlorid) wurden in einer 0.1 M Lösung der folgenden Puffer verfolgt: Natriumcitrat (pH = 3, 4 und 5), 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure, Natriumsalz (pH = 6), *N*-(2-Hydroxyethyl)piperazinyl-*N'*-2-ethansulfonsäure, Natriumsalz (pH = 7).
- [10] a) Die Synthese des modifizierten Primers B erfolgte an einem Applied-Biosystems-391-DNA-Synthesizer mit dem Phosphoamidit Biotin TEG (Glen Research) sowie dem Phosphoamidit von 5'-*N*-(4-Monomethoxytrityl)amino-2',5'-dideoxythymidin; b) M. Mag, J. W. Engels, *Nucl. Acids Res.* **1989**, *17*, 5973–5977.
- [11] Die Negativselektion erfolgte durch Inkubation des Pools aus immobilisierter einzelsträngiger DNA im Selektionspuffer, 2.5 h in Runde 7 und jeweils 1 h in den Runden 8–10. Nach Ablauf der Inkubationszeit spülte man die Festphase mehrmals mit bidestilliertem Wasser, um abgespaltene Aminooligomere zu entfernen und führte die Positivselektion wie beschrieben durch (siehe Legende zu Abb. 2).
- [12] T. Fitzwater, B. Polisky, *Methods Enzymol.* **1996**, *267*, 275–301.
- [13] Die Pooldiversität D ergibt sich als statistisches Schätzmaß aus dem Produkt der Positionsdiversitäten d_i für N Positionen gemäß $D = \prod_{i=1}^N d_i$. Die Positionsdiversität d_i läßt sich aus dem Verhältnis der Fragment-Peakintegrale $a_i:c_i:t_i:g_i$ in den normalisierten Spuren abschätzen, indem man die einzelnen Integrale x_{ij} ($j = 1-4$) durch das größte der vier einzelnen Integrale $x_{i\max}$ dividiert und die Quotienten aufsummiert: $d_i = \sum_{j=1}^4 x_{ij}/x_{i\max}$. Beträgt das Verhältnis $a_i:c_i:t_i:g_i$ z. B. 100:0:0:0, so ist $x_{i\max} = 100$ und $d_i = 1$. Für $a_i:c_i:t_i:g_i = 50:50:0:0$ gilt $x_{i\max} = 50$ und $d_i = 2$. Allgemein ist die Positionsdiversität d_i eine rationale Zahl zwischen 1 und 4 und die durch das Verfahren errechnete Pooldiversität D eine rationale Zahl zwischen 1 und 4^N .
- [14] Der zweite Klon hat die folgende Sequenz:
5'-CCGpnTGGATCCTAATGACCAAGGCATAGCCTTT-
TAATGGATCCTCAGAAGGGGCTTGGTCCCGCTGCGTCTAAA-
CAACACGCTACGGCTATTTCGGTGCCAGTCGGATAGTGT-3'
- [15] Das Programm wurde über das World Wide Web aufgerufen unter:
<http://www.ibt.wustl.edu/~zucker/dna/form1.cgi>.
- [16] K. P. Williams, D. P. Bartel, *Nucl. Acids Res.* **1995**, *23*, 4420–4421.
- [17] Bei pH = 6 beträgt die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung für die Hydrolyse der Modellverbindung **1** $k = 2 \times 10^{-5} \text{ h}^{-1}$. Bei Inkubation selektierter Pools in Gegenwart von **2** und Templat wurde nach 16 h über 50% Hydrolyseprodukt nachgewiesen. Unter der Annahme, daß die Gesamtmenge des Pools hydrolysierbar ist, schließen wir, daß die katalysierte Reaktion um drei Größenordnungen schneller verläuft als die nichtkatalysierte Hydrolyse.