

**Erzeugung und enzymatische Amplifikation
hochgradig funktionalisierter DNA-
Doppelstränge*****Stefan Jäger und Michael Famulok***Professor Julius Rebek, Jr. zum 60. Geburtstag gewidmet*

Die spezifische Basenpaarung in doppelsträngiger DNA (dsDNA) ist ein faszinierend logisches Prinzip zur einfachen Erzeugung von molekularen Anordnungen in Nanometergröße, das derzeit ein wachsendes Interesse an der Nutzung von Nucleinsäuren in Nanotechnologie, Materialwissenschaften, DNA-Computern und Biotechnologie nach sich zieht.^[1] Die Verwendung von natürlicher dsDNA hat hier bereits durch alleiniges Nutzen der Watson-Crick-Basenpaarung zu erheblichen Fortschritten im Aufbau einer eindrucksvollen Vielfalt zwei- und dreidimensionaler Strukturen, nanomechanischer Baueinheiten und supramolekularer Anordnungen geführt.^[2] Daneben weist DNA einzigartige Templateigenschaften auf, die sie durch DNA-Polymerasen enzymatisch replizierbar und amplifizierbar machen. Dies führte zur Erzeugung von Nucleinsäure-Sensoren, -Therapeutika und -Katalysatoren durch In-vitro-Evolution.^[3] Die Anwendungsmöglichkeiten von Nucleinsäuren in der Nanotechnologie könnten beträchtlich gesteigert werden, wenn nicht nur eine bessere Programmierbarkeit der molekularen Erkennung erreicht würde, sondern auch DNA-Moleküle mit zusätzlichen chemischen Funktionalitäten basenspezifisch adressierbar wären, die dann für weitere Funktionen und Inter-

[*] Dipl.-Chem. S. Jäger, Prof. Dr. M. Famulok
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Universität Bonn
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)
Fax: (+49) 228-735-388
E-mail: m.famulok@uni-bonn.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 624) und vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Wir danken A. Marx, G. Rasched, O. Thum und S. Brakmann für wertvolle Hinweise und Diskussionen.

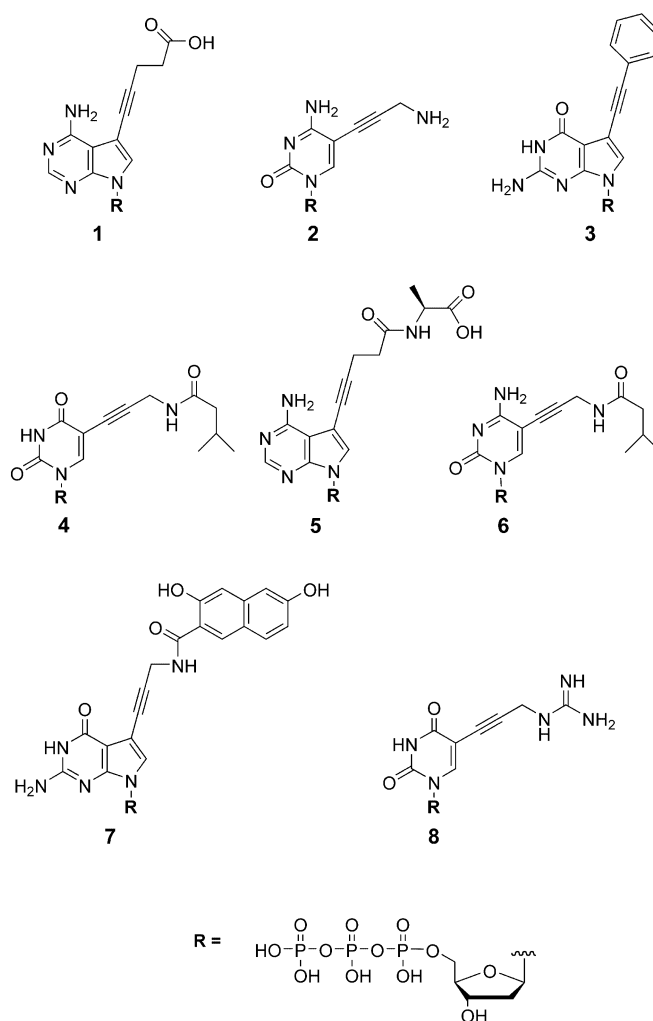


Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

aktionen zur Verfügung stünden. Für eine maximale Flexibilität müssten Strategien entwickelt werden, die es erlauben, so viele Basenpositionen wie möglich in einem gegebenen DNA-Strang zu modifizieren, ohne die Basenpaarung zu stören. Um die Replizierbarkeit und Amplifizierbarkeit solcher nanostrukturierter Systeme zu gewährleisten, müssten DNA-Polymerasen mit Toleranz für ein breiteres Substrat- und Templatespektrum durch In-vitro-Evolution erzeugt werden.^[4] Eine andere Möglichkeit ist, Reaktionsbedingungen zu finden, die es den Enzymen erlauben, nichtnatürliche Template und Monomere verwenden zu können, die sich normalerweise nicht enzymatisch vervielfältigen lassen. Dies würde auch den Weg zur Synthese langer DNA-Konstrukte (>100 bp) eröffnen, die auf synthetischem Weg nur sehr schwer oder gar nicht zugänglich sind. Somit könnten größere Sequenzräume funktionalisierter DNA-Moleküle schneller und einfacher zugänglich werden, bis hin zur Erzeugung amplifizierbarer Bibliotheken, die für In-vitro-Selektionsexperimente verwendet werden.

Eine Reihe chemisch modifizierter 2'-Desoxynucleosidtriphosphate wurde bereits synthetisiert, und bis zu zwei unterschiedlich modifizierte Nucleotide konnten mithilfe von Primerverlängerungsreaktionen oder der Polymerasekettenreaktion (PCR) enzymatisch an DNA-Template polymerisiert werden.^[5,6] Einzelsträngige, hoch funktionalisierte DNA (fdNA), in der jede Base mit einer zusätzlichen Funktionalität ausgestattet ist, konnte durch enzymatische Polymerisation von basenmodifizierten Nucleosidtriphosphaten (dNTPs) an natürlichen DNA-Template generiert werden.^[7,8] Ebenso wurde zwar gezeigt, dass fdNAs, welche die Reste **1–3** und **8** (Schema 1) enthielten, wiederum als Template in einer PCR mit natürlichen Nucleotiden dienen können,^[7] jedoch war die Verwendung hochgradig funktionalisierter fdNA-Template für die enzymatische Synthese des entsprechenden fdNA-Gegenstrangs bis heute erfolglos. Dabei müsste die verwendete Polymerase nicht nur den funktionalisierten DNA-Strang als Template erkennen, sondern auch in der Lage sein, gegenüber einer bestimmten modifizierten Base – entsprechend der Vorgabe des Templates – modifizierte Basen zu inkorporieren. Dies würde nicht nur die direkte Synthese und enzymatische Amplifikation von DNA-Doppelsträngen erlauben, sondern auch die spezifische Einführung zusätzlicher chemischer Diversität in den Gegenstrang ermöglichen. Somit könnten Strang und Gegenstrang mit unterschiedlichen chemischen Gruppen sequenzspezifisch dekoriert werden. Derart hochgradig modifizierte dsDNAs würden die Möglichkeit eröffnen, gezielt völlig neuartige auf DNA-Doppelsträngen basierende supramolekulare Strukturen aufzubauen, die mit natürlicher DNA nicht erhalten werden können.

Hier berichten wir über die erste enzymatisch hergestellte doppelsträngige fdNA, in der alle vier Nucleobasen in jedem Strang durch verschiedene Basenanaloga substituiert sind, was die templategesteuerte Einführung von bis zu acht verschiedenen Modifikationen in eine einzelne dsDNA erlaubt. Die verwendeten dNTP-Derivate (Schema 1) decken verschiedene Gruppen chemischer Funktionalitäten ab, z.B. aromatische (**3**, **7**), basische (**2**, **8**), saure (**1**, **5**) und lipophile Reste (**4**, **6**).^[9] Darüber hinaus führten wir ein



Scheme 1. Chemische Strukturen der verwendeten modifizierten 2'-Desoxynucleosid-5'-O-triphosphate.

Screening zur Identifizierung und Optimierung von Bedingungen, die die direkte Amplifikation von voll modifizierter fdNA durch die PCR erlauben, durch.

Wir synthetisierten enzymatisch ein voll funktionalisiertes fdNA-Template an dem 79 nt langen 5'-biotinylierten DNA-Template **M79** mit den Nucleotiden **1–4** unter ähnlichen Bedingungen wie zuvor beschrieben.^[7,10] Die dNTPs **1–4** erwiesen sich als gute Substrate für die Vent(exo-) und Pwo-DNA-Polymerase und ersetzen ihre natürlichen Gegenstücke sequenzspezifisch (Daten nicht gezeigt). Anschließend untersuchten wir, ob **fM79** als Template in einem Standard-Primerverlängerungsexperiment in Gegenwart der dNTPs **1–4** unter Verwendung von Pwo-DNA-Polymerase dienen kann.

Wie in Abbildung 1a gezeigt ist, konnte das Volllängenprodukt erhalten werden (Spur 5), wogegen die Auslassung einer der vier modifizierten dNTPs zu kürzeren Abbruchbanden der Gegenstrangsynthese führte (Spuren 1–4). Eine Primerverlängerung mit nicht funktionalisiertem **M79** in Gegenwart von natürlichen dNTPs diente als Größenmarker (Spur M). Abbildung 1b zeigt das entsprechende Experiment, aber diesmal wurde ein neuer Satz modifizierter dNTPs (**5–8**, Schema 1) verwendet, die sich von den im **fM79**-

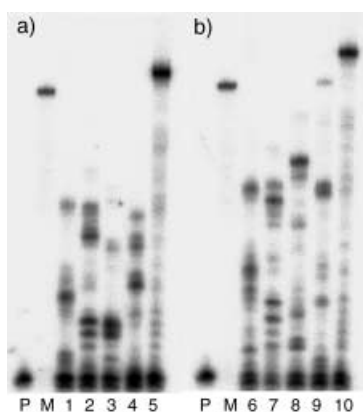


Abbildung 1. Primerverlängerungsexperiment mit ^{32}P -markiertem Primer **P5'** und Templat **fM79**, modifizierten dNTPs und Pwo-Polymerase, analysiert mit denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (8-proz. Polyacrylamid). a) P: Primer; M: Primerverlängerung mit vier natürlichen dNTPs und **M79** als Templat; 1: mit den modifizierten Nucleotiden 2–4; 2: 1, 3 und 4; 3: 1, 2 und 4; 4: 1–3; 5: 1–4. b) P: Primer; M: Primerverlängerung mit vier natürlichen dNTPs und **M79** als Templat; 6: 6–8; 7: 5, 7 und 8; 8: 5, 6 und 8; 9: 5–7; 10: 5–8.

Templat enthaltenen Modifikationen 1–4 unterscheiden. Wiederum konnte das Volllängenprodukt erhalten werden (Abbildung 1b, Spur 10). Dieses Produkt ist die erste hochgradig funktionalisierte dsDNA, in der jeder Strang einen unterschiedlichen Satz von Funktionalitäten enthält. Dies entspricht dem Einbau von acht verschiedenen Modifikationen in einem fDNA-Doppelstrang. Weiterhin zeigen diese Daten, dass die Pwo-DNA-Polymerase nicht nur eine hochgradig funktionalisierte DNA als Templat akzeptiert, sondern auch zum templatgesteuerten Einbau aller vier modifizierten Nucleotide gegenüber einer modifizierten Base befähigt ist.

Als Nächstes interessierte uns, ob die Bedingungen, unter denen eine erfolgreiche Primerverlängerung stattfindet, auch eine Amplifikation der resultierenden doppelsträngigen fDNA unter PCR-Bedingungen erlaubt. PCR-Amplifikation unter Standard-Puffer-Bedingungen mit dem Templat **fM79** und den modifizierten dNTPs 1–4 führten jedoch zu keiner Amplifikation des Produkts mit der gewünschten Länge (Abbildung 2b, Spur 1a). Daher untersuchten wir, wie sich verschiedene Konzentrationen unterschiedlicher PCR-Additive auf die Amplifizierbarkeit des Templates mit Pwo-DNA-Polymerase auswirken. Verwendet wurden hier Tetramethylammoniumchlorid (TMAC), Dimethylsulfoxid (DMSO), Formamid, Einzelstrang-DNA-bindendes Protein aus *E. coli* (SSB) und Betain, die bekanntermaßen einen positiven Effekt auf schwierige PCR-Reaktionen haben können. In Abbildung 2b (Spuren 1b–f) ist zu erkennen, dass keine signifikante Verbesserung erzielt wird, wenn eine dieser Komponenten allein zum PCR-Puffer hinzugefügt wurde.

Um zu überprüfen, ob verschiedene Kombinationen der Additive eine PCR-Amplifikation ermöglichen, führten wir ein kombinatorisches Screening von allen möglichen Zusammenstellungen der fünf Komponenten durch. Abbildung 2a zeigt die unterschiedlichen Additivkombinationen. Die quantifizierten Ergebnisse sind in Abbildung 2b und 2c dargestellt. Zur Kontrolle der Polymerase-Aktivität testeten wir

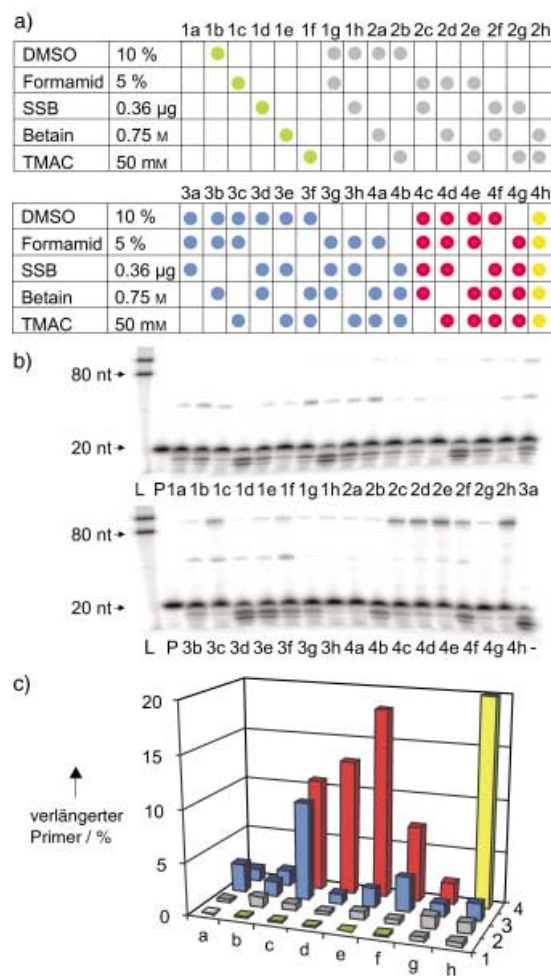


Abbildung 2. Kombinatorisches Screening von 32 verschiedenen PCR-Reaktionspuffern. PCR-Experimente wurden mit ^{32}P -markiertem Primer **P5'**, dNTPs 1–4 und Templat **fM79** durchgeführt. Nummern 1a–4h beziehen sich auf die verschiedenen Kombinationen der Additive. PCR-Produkte wurden mit denaturierender Polyacrylamid-Elektrophorese (10-proz. Polyacrylamid) analysiert. a) Reaktionspuffer-Zusammensetzungen. Punkte geben die Präsenz des entsprechenden Additivs im PCR-Reaktionspuffer an. b) Spur L: Längenmarker; P: Primer; 1a–4h: PCR-Reaktionen mit den angegebenen Reaktionspuffern (a); (–): Kontrollreaktion ohne Templat. c) Quantifizierung der PCR-Produkte durch Phosphor-Imaging in Prozent der Gesamtradioaktivität.

die gleichen Puffer-Bedingungen mit natürlichen Nucleotiden als Monomerquelle (siehe Hintergrundinformationen).

In der Tat konnten wir mit bestimmten Kombinationen von mindestens drei verschiedenen Additiven akzeptable Mengen hochgradig funktionalisierter dsDNA durch PCR erhalten, obgleich im „Drei-Komponenten-Satz“ (Abbildung 2, 3a–4b, blaue Punkte) nur Zusammensetzung 3c zu deutlicher Amplifikation führte. Kombinationen aus vier verschiedenen Komponenten konnten erheblich die Bildung des PCR-Produkts amplifizieren, mit Ausnahme von 4f und 4g (Abbildung 2), in denen DMSO bzw. Formamid fehlte. Die Zugabe von allen fünf Additiven (4h) zeigte keine signifikante Verbesserung gegenüber der Mischung 4e, die das beste Ergebnis im „Vier-Komponenten-Satz“ (4c–4g, rote Punkte) lieferte. Die erhaltene Produktmenge an hochgradig modifi-

zierter dsDNA entspricht bei gleicher Zyklenzahl ca. 30% der Menge, die in einem Kontrollexperiment mit ausschließlich natürlichen dNTPs erhalten wurde (siehe Hintergrundinformationen). Diese Ergebnisse erlauben es, Bedingungen zu definieren, welche die Amplifikation von hochgradig funktionalisierter, doppelsträngiger fDNA mit funktionalisierten dNTPs als einzige Monomerquelle ermöglichen.

Um Informationen über die Genauigkeit des Einbaus der modifizierten Nucleotide und der PCR-Amplifikation von fDNA unter den Bedingungen 4e (Abbildung 2) durch Pwo-DNA-Polymerase zu erhalten, generierten wir eine vollständig modifizierte doppelsträngige fDNA in 20 PCR-Zyklen anhand des DNA-Templats **M59** (Abbildung 3a) sowie der dNTPs **1–4** (Schema 1). Die Einzelstränge wurden getrennt (siehe Hintergrundinformationen) und mithilfe der Didesoxymethode nach Sanger unter Verwendung von T7-DNA-Polymerase sequenziert (Abbildung 3b, 2). Um auszuschließen, dass auftretende Stopppanden von Fehlinkorporation der modifizierten Nucleotide herrühren, amplifizierten wir das durch PCR erzeugte funktionalisierte Templat **fM59** mit natürlichen Nucleotiden und sequenzierten die erhaltene natürliche DNA (Abbildung 3b, 3). Als Kontrolle wurde das Originaltemplatt **M59** ebenfalls amplifiziert und sequenziert (Abbildung 3b, 1). Der Vergleich der erhaltenen Sequenzmuster zeigt, dass die Sequenzinformation während der PCR-Amplifikation mit **1–4** erhalten bleibt und somit der Einbau der modifizierten Nucleotide innerhalb der Messgenauigkeit einer Sequenzierungsreaktion sequenzgetreu verläuft. Interessanterweise ist neben der Pwo-Polymerase offensichtlich auch T7-DNA-Polymerase befähigt, modifizierte DNA-Stränge korrekt zu lesen.

Weiterhin untersuchten wir, ob die hochgradige Funktionalisierung einer dsDNA Veränderungen der Konformation gegenüber der entsprechenden natürlichen DNA nach sich zieht. In der Tat zeigte ein Vergleich der CD-Spektren beider Varianten, dass die natürliche dsDNA-Version von **M59** ein typisches CD-Spektrum einer B-DNA-Konformation aufweist (Abbildung 4, \blacktriangle), während die funktionalisierte, doppelsträngige DNA der gleichen Sequenz **fM59** (Abbildung 4, \square) unter gleichen Bedingungen eine Inversion des CD-Spektrums zeigt, wie man es erstmals bei Z-DNA beobachtet hatte.^[11] Eine ähnliche Umkehrung des CD-Spektrums wurde auch von Brakmann et al. beobachtet, nachdem alle Pyrimidinreste eines Strangs in einer dsDNA durch fluoreszenzmarkierte Analoga ersetzt worden waren.^[6] Allerdings sind die bei der fDNA **fM59** beobachteten Wellenlängen des CD-Spektrums gegenüber denen nicht-modifizierter Z-DNA-Motive signifikant verschoben, was auf

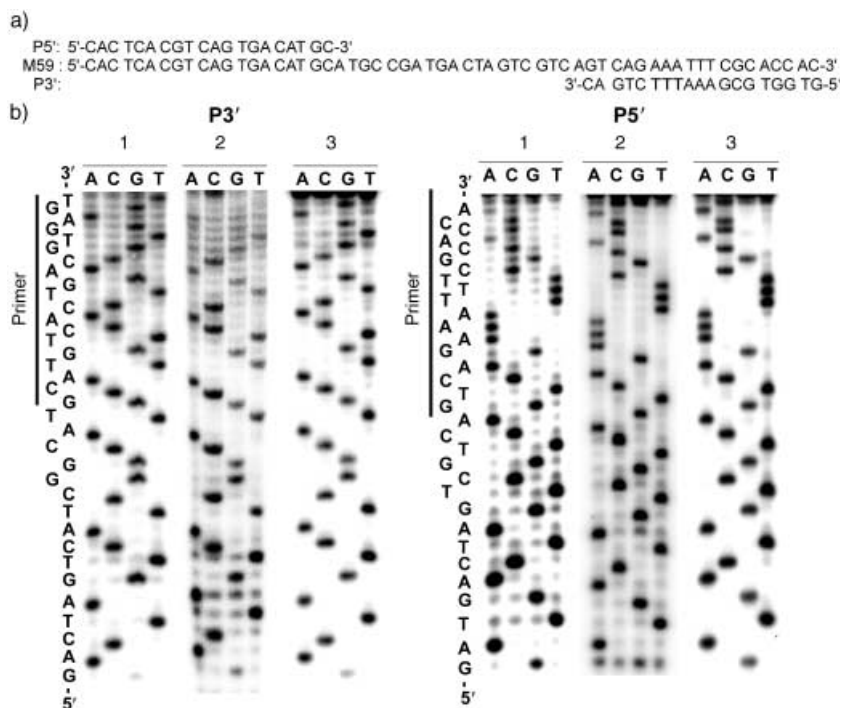


Abbildung 3. Autoradiogramme der Sanger-Didesoxysequenzierungen mit T7-DNA-Polymerase. a) Sequenzierungs-Primer **P3'**, **P5'** und Templat **M59**. b) 1. Sequenzierung des Originaltemplats **M59**. 2. Sequenzierung von funktionalisierter DNA **fM59**, die durch PCR mit den modifizierten dNTPs **1–4** generiert wurde. 3. Sequenzierung eines PCR-Produkts, das aus **fM59** als Templat und natürlichen Nucleotiden stammt. Sequenzen wurden in beide Richtungen mit Primern **P3'** und **P5'** gelesen. Sequenzierungsmuster des Originaltemplats (1), der direkten Sequenzierung von fDNA (2) und des natürlichen PCR-Produkts von funktionalisiertem Templat **fM59** (3) sind ununterscheidbar.

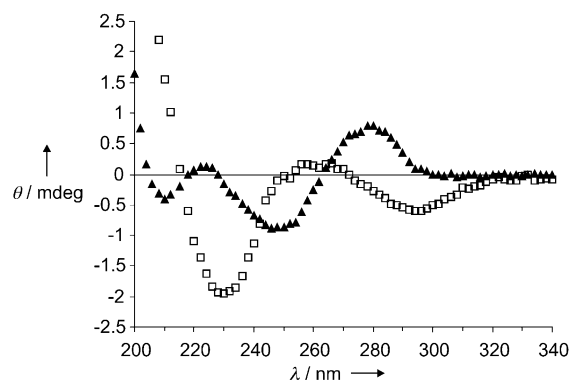


Abbildung 4. CD-Spektren von natürlicher, nichtmodifizierter dsDNA **M59** (\blacktriangle) und vollständig mit dNTPs **1–4** funktionalisierter dsDNA **fM59** (\square).

die unterschiedliche Polarisierbarkeit der Nucleobasen zurückzuführen sein könnte. Analoge Wellenlängen-Verschiebungen wurden bereits bei kurzen dsDNA-Duplexen beobachtet, die vereinzelte Alkynyl-modifizierte Purin- oder Pyrimidinbasen enthielten. Im Unterschied zum Spektrum der hier vermessenen hochmodifizierten Sequenz zeigten die CD-Spektren dieser Studie jedoch B-DNA-ähnlichen Charakter.^[12] Dies deutet darauf hin, dass sich die Konformation der vollständig funktionalisierten dsDNA durch den Einbau

der Modifikationen von einer rechtsgängigen B-Form in die Richtung einer linksgängigen Z-Form umlagert.

Interessanterweise war zur Visualisierung und Quantifizierung der doppelsträngigen fdNA (Abbildung 2b) die Verwendung von radioaktiv markierten Primern absolut notwendig, da die PCR-Produkte nur marginal mit Ethidiumbromid angefärbt werden konnten. Möglicherweise führt die Gegenwart der in 5-Position modifizierten Pyrimidine und der in 7-Position modifizierten Purine nicht nur zu einer konformativen Umlagerung des DNA-Duplex, sondern auch zu einer sterischen Hinderung der Intercalation.

In dieser Studie konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass hochgradig funktionalisierte DNA-Doppelstränge templatgesteuert enzymatisch generiert und unter bestimmten Bedingungen auch amplifiziert werden können. Bemerkenswerterweise gelingt es einer natürlichen DNA-Polymerase, ein an der Base chemisch modifiziertes Nucleotridtriphosphat gegenüber einer Modifikation im Templat korrekt auszuwählen und den Einbau in den wachsenden Gegenstrang zu katalysieren. Derart auf der Nanoskala aufgelöste, mit hoher Dichte in einen DNA-Doppelstrang eingebrachte chemische Funktionen eröffnen die Möglichkeit, DNA-Architekturen höherer Ordnung zu programmieren, die durch Basenpaarung und zusätzliche Wechselwirkungen der eingeführten Funktionalitäten aufgebaut sind. Dieser Ansatz bietet signifikantes Potenzial zur erweiterten Konstruktion von komplexen Nanoobjekten und Materialien auf DNA-Basis.

Eingegangen am 4. Februar 2004 [Z53926]
Online veröffentlicht am 26. Mai 2004

Stichwörter: DNA-Replikation · Nanostrukturen · Polymerasekettenreaktion · Polymerasen

- [1] N. C. Seeman, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3408–3428; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3220–3238.
- [2] a) N. C. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427–431; b) W. M. Shih, J. D. Quispe, G. F. Joyce, *Nature* **2004**, *427*, 618–621; c) N. C. Seeman, *Biochemistry* **2003**, *42*, 7259–7269; d) N. C. Seeman, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 1151–1159; e) N. C. Seeman, *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 437–443; f) L. H. Eckardt, K. Naumann, W. M. Pankau, M. Rein, M. Schweitzer, N. Windhab, G. von Kiedrowski, *Nature* **2002**, *420*, 286; g) A. Csaki, G. Maubach, D. Born, J. Reichert, W. Fritzsche, *Single Mol.* **2002**, *3*, 275–280; h) C. A. Mirkin, *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 2258–2272; i) C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4254–4387; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128–4158; j) C. M. Niemeyer, M. Adler, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3933–3937; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3779–3783.
- [3] a) T. Hermann, D. J. Patel, *Science* **2000**, *287*, 820–825; b) M. Famulok, M. Blind, G. Mayer, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 931–939; c) C. K. O'Sullivan, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *372*, 44–48; d) S. Verma, S. Jäger, O. Thum, M. Famulok, *Chem. Rec.* **2003**, *3*, 51–60; e) M. Famulok, A. Jenne, *Top. Curr. Chem.* **1999**, *202*, 101–131.
- [4] a) F. J. Ghadessy, J. L. Ong, P. Holliger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 4552–4557; b) J. L. Jestin, P. Kristensen, G. Winter, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1196–1200; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1124–1127; c) M. Fa, A. Radeghieri, A. A. Henry, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1748–1754.
- [5] a) K. Sakthivel, C. F. Barbas III, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2998–3001; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2872–2875; b) D. M. Perrin, T. Garestier, C. Hélène, *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 377–391; c) S. E. Lee, A. Sidorov, T. Goullain, N. Mignet, S. J. Thorpe, J. A. Brazier, M. J. Dickman, D. P. Hornby, J. A. Grasby, D. M. Williams, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1565–1573; d) T. Goullain, A. Sidorov, N. Mignet, S. J. Thorpe, S. E. Lee, J. A. Grasby, D. M. Williams, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1898–1905; e) H. A. Held, S. A. Benner, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 3857–3869; f) D. Summerer, A. Marx, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3806–3808; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3693–3695; g) M. M. Masud, A. Ozaki-Nakamura, M. Kuwahara, H. Ozaki, H. Sawai, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 584–588; h) J. C. Chaput, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9274–9275.
- [6] S. Brakmann, S. Löbermann, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1473–1476; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1427–1429.
- [7] O. Thum, S. Jäger, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4112–4115; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3990–3993.
- [8] M. A. Augustin, W. Ankenbauer, B. Angerer, *J. Biotechnol.* **2001**, *86*, 289–301.
- [9] Die Synthesen der Nucleotide **1–6** und **8** werden demnächst veröffentlicht. Nucleotid **7** wurde von Perkin-Elmer bezogen.
- [10] Weitere Informationen zu Primerverlängerungsreaktionen, PCR-Bedingungen, Screening und Sequenzierung finden sich in den Hintergrundinformationen.
- [11] F. M. Pohl, T. M. Jovin, *J. Mol. Biol.* **1972**, *67*, 375–396.
- [12] J. L. He, F. Seela, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 5485–5496.