

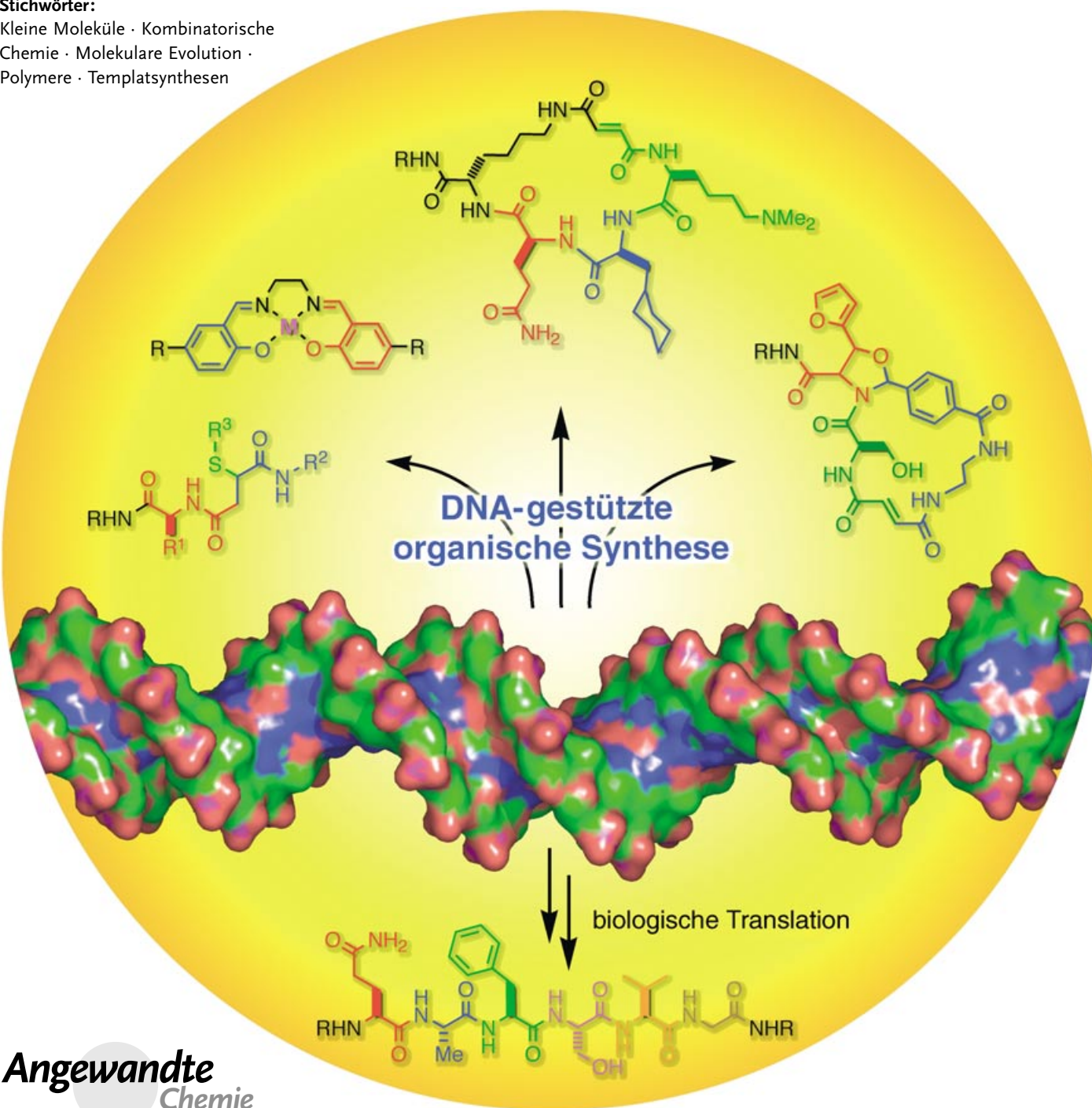
Synthesemethoden

DNA-gestützte organische Synthese: die Strategie der Natur zur Steuerung chemischer Reaktivität übertragen auf synthetische Moleküle**

Xiaoyu Li und David R. Liu*

Stichwörter:

Kleine Moleküle · Kombinatorische Chemie · Molekulare Evolution · Polymere · Templatsynthesen



Angewandte
Chemie

Anders als im Allgemeinen in der Synthesechemie üblich wird in der Natur die chemische Reaktivität durch die Modulation der effektiven Molarität hoch verdünnter Reaktanten durch Makromolekül-gestützte Synthesen gesteuert. Dabei kann die Reaktion komplexer Mischungen in einer einzigen Lösung mit Effizienzen und Selektivitäten verlaufen, die in herkömmlichen Laborsynthesen nicht erreichbar sind. Die DNA-gestützte organische Synthese (DTS) bietet einen erstaunlich universellen Weg zur Steuerung der Reaktivität synthetischer Moleküle mithilfe des in der Natur verwirklichten, auf der effektiven Molarität basierenden Ansatzes. Neueste Entwicklungen haben den Anwendungsbereich und die Möglichkeiten der DTS von ihren Ursprüngen als Modell für präbiotische Nucleinsäurereplikation zu ihrer heutigen Fähigkeit, DNA-Sequenzen in komplexe kleine Moleküle und polymere Produkte mehrstufiger organischer Synthesen zu übersetzen, erweitert. Das Verständnis der fundamentalen Prinzipien der DTS spielte eine wichtige Rolle bei diesen Entwicklungen. Zu den ersten Anwendungen der DTS zählen die Nucleinsäuredetektion, die Entwicklung synthetischer niedermolekularer Verbindungen und die Entdeckung von Reaktionen mithilfe von Translations-, Selektions- und Amplifikationsmethoden, die zuvor nur für biologische Substanzen verfügbar waren.

Aus dem Inhalt

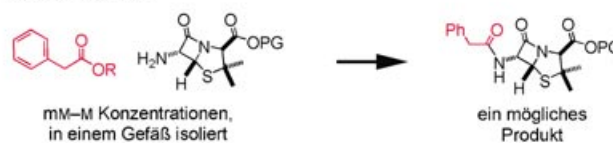
1. Einleitung	4957
2. Der Anwendungsbereich der DNA-gestützten Synthese	4958
3. Erweiterung der Möglichkeiten der DNA-gestützten Synthese	4962
4. DNA-gestützte Polymerisation	4968
5. Zum physikalisch-organischen Verständnis der DNA-gestützten Synthese	4970
6. Anwendungen der DNA-gestützten Synthese	4972
7. Zusammenfassung und Ausblick	4976
8. Abkürzungen	4977

1. Einleitung

Die Steuerung chemischer Reaktivität ist eine zentrale und allgegenwärtige Herausforderung in den Naturwissenschaften. Chemiker gehen diese Aufgabe üblicherweise durch die Kombination eines spezifischen Satzes von Reaktanten in einer Lösung in hohen Konzentrationen (typischerweise mM bis M) an. Ganz anders ist der Ansatz der Natur (Abbildung 1), bei dem sich Tausende von Reaktanten in der gleichen Lösung befinden, deren Konzentrationen jedoch zu gering sind (typischerweise nM bis μ M), um zufällige intermolekulare Reaktionen zu ermöglichen. Die Reaktivitäten der Moleküle in Richtung der erwünschten Produkte steuern Makromoleküle als Matrizen (Template) über die Modulation der effektiven Molarität der reaktiven Gruppen und die Bereitstellung katalytischer Funktionalität (Abbildung 2 zeigt einige Beispiele). Die Verwendung der effektiven Molarität in der Natur zur Steuerung der chemischen Reaktivität ermöglicht das effiziente Ablaufen biologischer Reaktionen selbst bei absoluten Konzentrationen, die erheblich geringer sind als die für effiziente Laborsynthesen notwendigen, und mit Spezifitäten, die mit konventionellen Synthesemethoden nicht erreichbar sind.

Unter den natürlichen, auf effektiven Molaritäten beruhenden Ansätzen zur Steuerung der chemischen Reaktivität spielt die Nucleinsäure-gestützte Synthese eine zentrale Rolle in fundamentalen biologischen Prozessen wie der Replikation genetischer Information, der Transkription von DNA in RNA und der Translation von RNA in Proteine. Bei der ribosoma-

Der Ansatz der Chemiker:



Der Ansatz der Natur:

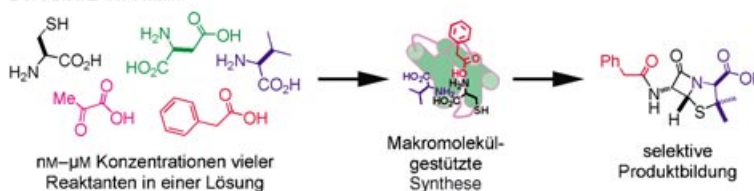


Abbildung 1. Zwei Ansätze zur Steuerung der chemischen Reaktivität.

len Proteinbiosynthese entsteht durch die Nucleinsäure-gestützte Translation eines replizierbaren Informationsträgers eine Struktur, deren funktionelle Eigenschaften über die des Informationsträgers hinausgehen. Diese Translation ermöglicht die Kombination des erweiterten funktionellen Potenzials von Proteinen mit den leistungsfähigen und einzigartigen Eigenschaften von Nucleinsäuren wie der Amplifizierbarkeit, der Vererbbarkeit und der Fähigkeit zur Diversifi-

[*] Dr. X. Li, Prof. D. R. Liu
Harvard University
12 Oxford Street
Cambridge, Ma 02138 (USA)
Fax: (+1) 617-496-5688
E-mail: drliu@fas.harvard.edu

[**] Abschnitt 8 dieses Beitrags enthält eine Abkürzungsliste.

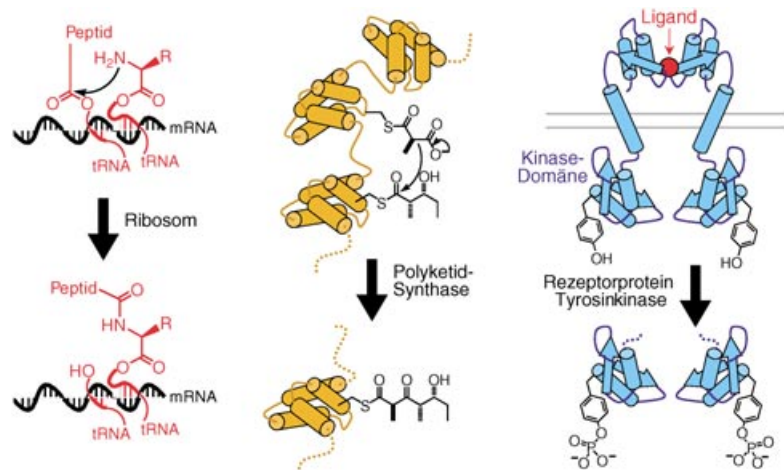


Abbildung 2. Beispiele für die effektive, molaritätsgestützte Steuerung der Bindungs- und -spaltung in biologischen Systemen.

zierung. Über das Ausmaß, in dem primitive Versionen dieses Prozesses in einer präbiotischen Ära vorhanden gewesen sein könnten, wird ausgiebig debattiert,^[1–12] dennoch enthalten die meisten Modelle der präzellulären Welt irgendeine Form von Templat-gestützter Synthese.^[1,2,13–26]

Doch die Nucleinsäure-gestützte Synthese spielt nicht nur eine prominente Rolle in der Biologie, sondern sie hat auch die Vorstellungswelt der Chemiker erobert. In den ersten Versuchen, sie auf nichtbiologische Reaktanten anzuwenden, wurde die DNA- oder RNA-Hybridisierung zur Beschleunigung der Bildung von Phosphodiesterbindungen oder anderen Strukturanaloga des Nucleinsäurerückgrats eingesetzt.^[1,14,24–41] In den letzten Jahren haben Forscher die Fähigkeit der DTS entdeckt, die Synthese von Strukturen zu steuern, die dem Nucleinsäurerückgrat nicht verwandt sind.^[42–48] Ein wachsendes Verständnis der einfachen, aber wirkungsvollen Prinzipien, die der DTS zugrunde liegen, hat deren Eignung für diverse Synthesen rasch erweitert und zu chemischen und biologischen Anwendungen geführt wie der Nucleinsäuredetektion,^[27–30,49–60] der sequenzspezifischen DNA-Modifikation^[61–80] und der Erzeugung und Evaluierung von Bibliotheken aus synthetischen Molekülen.^[44,47,81,82]

In dieser Übersicht beschreiben wir repräsentative frühe Beispiele der Nucleinsäure-gestützten Synthese und neuere

Entwicklungen, dank derer es möglich wurde, DNA-Templates in zunehmend anspruchsvollere und unterschiedliche synthetische Moleküle zu übersetzen. Danach analysieren wir unser gegenwärtiges Verständnis der Schlüsselaspekte der DTS, beschreiben Anwendungen, die aus diesem Verständnis heraus entstanden sind, und beleuchten noch verbliebene Herausforderungen beim Einsatz der DTS, um die Strategie der Natur zur Steuerung der chemischen Reaktivität bei Molekülen nachzuahmen, die nur durch Laborsynthesen zugänglich sind.

2. Der Anwendungsbereich der DNA-gestützten Synthese

Ein Reaktant für die DTS besteht aus drei Komponenten (Abbildung 3 a): 1) einem DNA-Oligonucleotid, das die effektive Molarität der Reaktanten moduliert, aber ansonsten unbeteiligt bleibt, 2) einer reaktiven Gruppe, die an der DNA-gestützten chemischen Reaktion teilnimmt, und 3) einem Linker, der die ersten

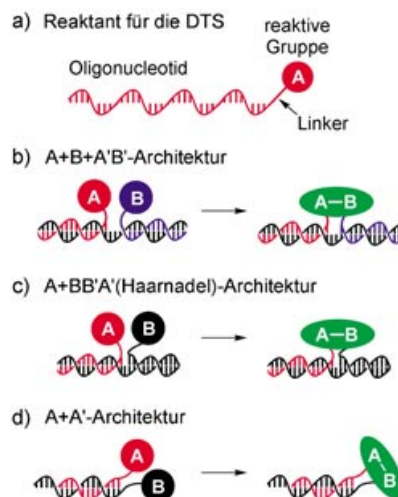


Abbildung 3. a) Die drei Komponenten eines Reaktanten für die DTS. b)–d) Templataarchitekturen für die DTS. A/B und A'/B' stehen für Reaktanten, die komplementäre Oligonucleotide enthalten, die +-Symbole für separate Moleküle.



David R. Liu wurde in 1973 in Riverside, Kalifornien, geboren. Er erhielt seinen BA 1994 von der Harvard University, an der er unter der Anleitung von Professor E. J. Corey forschte. 1999 beendete er seine Dissertation an der University of California Berkeley im Arbeitskreis von Professor P. G. Schultz. Er kehrte im gleichen Jahr als Assistant Professor für Chemie und Biochemie nach Harvard zurück und begann dort mit seinem aktuellen Forschungsprogramm im Bereich der Organischen Chemie und chemischen Biologie der molekularen Evolution. Derzeit ist er John L. Loeb Associate Professor für Naturwissenschaften in der Fakultät für Chemie und Biochemie der Harvard University.



Xiaoyu Li wurde 1975 in Xining, China, geboren. Er erwarb den BSc in Chemie an der Universität von Peking und beendete 2002 seine Dissertation an der University of Chicago bei Professor D. G. Lynn. Zurzeit arbeitet er als Postdoktorand im Arbeitskreis von Professor D. R. Liu.

beiden Komponenten verbindet. Wenn zwei DTS-Reaktanten, die komplementäre Oligonucleotide enthalten, eine DNA-Hybridisierung eingehen, befinden sich ihre reaktiven Gruppen im selben räumlichen Bereich, was ihre effektive Konzentration erhöht.

Das Ausmaß, in dem die effektive Molarität der DNA-gebundenen reaktiven Gruppen bei der DNA-Hybridisierung steigt, kann prinzipiell von mehreren Faktoren abhängen. Erstens sind die absoluten Konzentrationen der Reaktanten wesentlich. Um eine DNA-gestützte Reaktion mit einem hohen Verhältnis von Templat- zu nicht-Templat-gestützter Produktbildung ablaufen zu lassen, müssen die Reaktanten einerseits ausreichend verdünnt sein (typischerweise nm bis μM), um intermolekulare Reaktionen in signifikantem Umfang zu unterbinden, und andererseits ausreichend konzentriert sein, um eine effiziente Hybridisierung komplementärer Oligonucleotide zu ermöglichen. Zweitens kann die Präzision, mit der die reaktiven Gruppen in einer DNA-ähnlichen Konformation ausgerichtet werden, die Zunahme der effektiven Molarität bei der Hybridisierung beeinflussen. Es ist beispielsweise denkbar, dass nur solche Reaktionen für die DTS geeignet sind, deren Übergangszustand mit der Konformation von doppelsträngiger DNA konsistent ist. Neuere Studien haben die Bedeutung jedes dieser Faktoren untersucht und dabei den Anwendungsbereich der DNA-gestützten organischen Synthese aufgezeigt. Zusätzliche Faktoren, die die effektive Molarität reaktiver Gruppen in der DTS beeinflussen, werden in Abschnitt 3 analysiert.

2.1. Nucleinsäure-gestützte Synthesen von Nucleinsäuren und Nucleinsäureanaloga

In der Nucleinsäure-gestützten Synthese wurden vor etwa dem Jahr 2000 vorwiegend DNA- oder RNA-Templates für

Ligationsreaktionen verwendet, die DNA- und RNA-Oligomere oder Strukturana-loga von Nucleinsäuren generierten (Abbildung 4).^[1,14,24–41,70,83,84] Da bereits mehrere ausgezeichnete Veröffentlichungen über die DTS von Nucleinsäuren und deren Analoga existieren,^[1,31,37,42,61] führen wir im Folgenden nur wenige Schlüsselbeispiele auf. In diesen Fällen waren die reaktiven Gruppen üblicherweise Funktionalitäten, die bereits in den Oligonucleotiden oder Oligonucleotidanaloga vorhanden waren, die Linker fehlten oft und als Templatarchitektur wurde eine verwendet, bei der die Reaktion meist im Zentrum eines Einzelstrangbruchs (Nicks) im DNA-Doppelstrang stattfand (Abbildung 3b). Die reaktiven Gruppen in diesen Beispielen imitieren die Struktur des DNA-Rückgrats während der Produktbildung.

Der erste Bericht über eine Nucleinsäure-gestützte Nucleotidligation stammt von Naylor und Gilham aus dem Jahr 1966;^[13] sie beschrieben, dass ein Poly(A)-Templat die Bildung einer nativen Phosphodiesterbindung zwischen der Carbodiimid-aktivierten 5'-Phosphateinheit von (pT)₆ und der 3'-Hydroxygruppe eines zweiten (pT)₆-Moleküls in 5 % Ausbeute bewirkte. Eine Reihe weiterer DNA- oder RNA-gestützter Oligonucleotidsynthesen wurde seither beschrieben (Abbildung 4), z. B. Orgels Pionierarbeiten zur Nucleinsäure-gestützten Phosphodiesterbildung zwischen 2-Methylimidazol-aktivierten Nucleinsäuremonomeren und -oligomeren (Abbildung 4a),^[1,85–87] Nielsons und Orgels RNA-gestützte Amidbildung zwischen PNA-Oligomeren (Abbildung 4f),^[24] Joyces DNA-gestützte Peptid-DNA-Konjugation (Abbildung 4d),^[84] von Kiedrowskis Carbodiimid-aktivierte DNA-Kupplung^[88] und Amplifikation von Phosphoramidat enthaltender DNA (Abbildung 4e),^[14] Lynns DNA-gestützte reduktive Aminierung und Amidbildung zwischen modifizierten DNA-Oligomeren (Abbildung 4b),^[31–39,83,84] Eschenmosers Nucleinsäure-gestützte Ligation von TNAs^[89–91] sowie Letsingers und Kools DNA- und

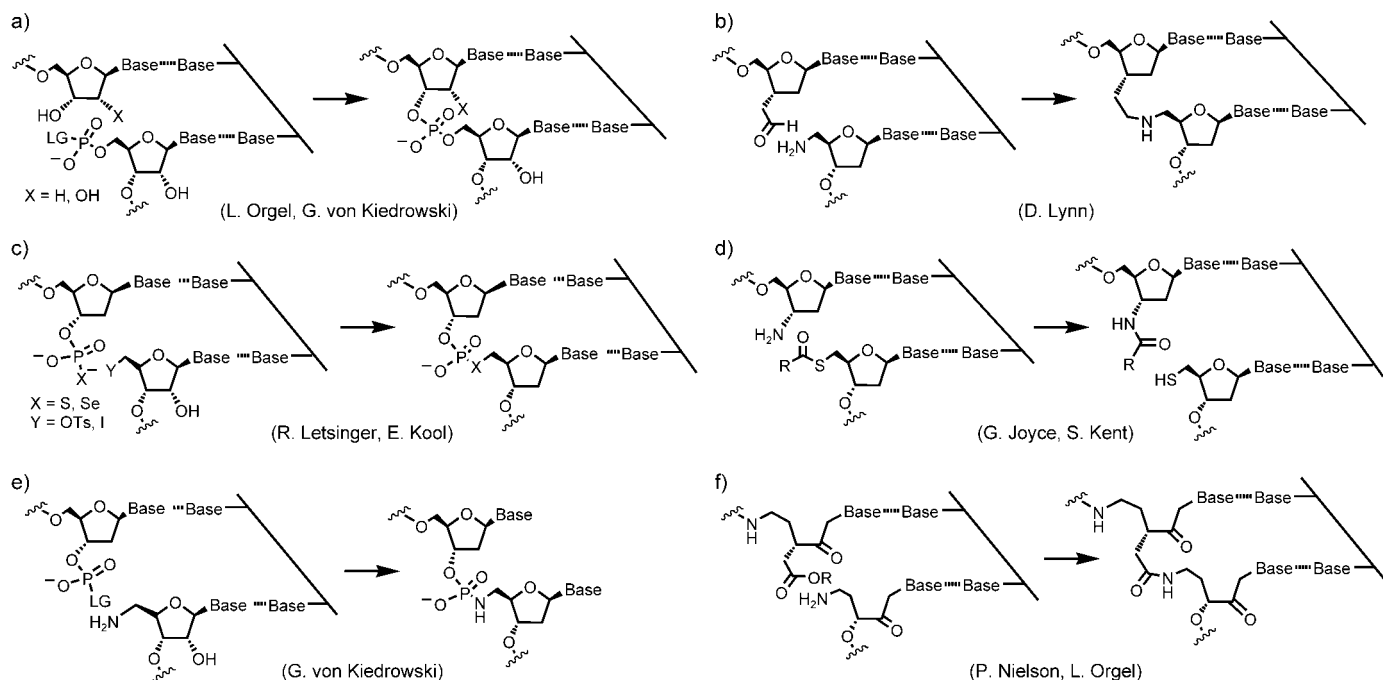


Abbildung 4. Repräsentative DNA-gestützte Synthesen von Oligonucleotidanaloga.^[1,14,24–41] LG: Abgangsgruppe.

RNA-gestützte Phosphothioester- und Phosphoselenoesterbildung (Abbildung 4c).^[26–30,40,41] Oligonucleotidanaloga werden auch als Template für Nucleotidligationen eingesetzt. Orgel et al. verwendeten HNA, eine nichtnatürliche Nucleinsäure, die eine Hexose als Zuckereinheit enthält (siehe Abbildung 16), als Template für die Ligation von RNA-Monomeren durch Kupplung aktivierter Phosphate,^[92] während Eschenmoser et al. zeigten, dass nichtnatürliche Pyranosyl-RNA als Template für die Kupplung komplementärer Pyranosyl-RNA-Tetramere durch Phosphoesterung mit 2',3'-cyclichen Phosphaten eingesetzt werden kann.^[93]

Zusätzlich zu den Analoga des Phosphoriboserückgrats sind auch Produkte, die die Struktur von gestapelten aromatischen Nucleobasen imitieren, mithilfe der DTS hergestellt worden (Abbildung 5). Die photoinduzierte [2+2]-Cycload-

2.2. DNA-gestützte Synthese von dem DNA-Rückgrat strukturell nicht verwandten Produkten

Während die strukturelle Ähnlichkeit zum DNA-Rückgrat die effektive Konzentration der Template-organisierten Reaktanten maximieren dürfte, schränkt sie die Vielfalt der Strukturen und potenziellen Eigenschaften der Produkte Nucleinsäure-gestützter Reaktionen erheblich ein. Die Verwendung der DTS für die Synthese von Strukturen, die nicht unbedingt Nucleinsäuren gleichen, ist daher von besonderem Interesse, und sie ist seit 2001 zu einem zentralen Thema der Forschung im Bereich der Template-gestützten Synthese geworden.

Unsere Gruppe testete die strukturellen Anforderungen der DTS anhand DNA-gestützter Reaktionen, die Produkte erzeugen, die dem DNA-Rückgrat nicht gleichen.^[44] Für eine Reihe konjugierter Additions- und Substitutionsreaktionen zwischen einer Vielzahl an nucleophilen und elektrophilen Gruppen (Abbildung 6) fanden wir einen effizienten Reaktionsverlauf bei absoluten Reaktantenkonzentrationen von 60 nM.^[44] Dagegen wurden keine Produkte gebildet, wenn die Sequenzen der Oligonucleotid-Reaktanten nicht zueinander passten (Nichtkomplementarität). Aus diesen Ergebnissen ließ sich folgern, dass die effektive Molarität von zwei an eine DNA-Doppelhelix gebundenen reaktiven Gruppen ausreichend hoch sein kann, um nützliche Reaktionsgeschwindigkeiten zu erhalten, auch wenn sie nicht in einer DNA-ähnlichen Konformation vorliegen.^[44] Diese Schlussfolgerung ist in Einklang mit einem einfachen geometrischen Modell der effektiven Molarität. So kann die Platzierung zweier reaktiver Gruppen in einem Abstand von $< 10 \text{ \AA}$ – erreichbar durch ihre Anbindung an die 5'- und 3'-Enden hybridisierter Oligonucleotide – zu einer effektiven Molarität von $> 1 \text{ M}$ führen.

Wir verglichen auch die Eignung zweier DNA-Template-architekturen für die DTS: Eine Haarnadel-Template-architektur ($A+BB'A'$, eine geschlossene Form der $A+B+A'B'$ -Architektur, die eine kovalente Bindung des Produkts an das Template erlaubt, siehe Abbildung 3 c) und eine lineare $A+A'$ -Template-architektur (Abbildung 3 d) waren in der Lage, eine effiziente Produktbildung zu vermitteln.^[44] Die $A+A'$ -Architektur ist besonders attraktiv, da hier die Reaktanten am einfachsten herzustellen sind. Zudem ist ein Einfluss des Oligonucleotidteils der $A+A'$ -Architektur auf den Ausgang der DTS über eine einfache Modulation der effektiven Molarität hinaus weniger wahrscheinlich als bei einer Haarnadelstruktur oder einer $A+B+A'B'$ -Anordnung, bei der der Reaktionsbereich auf beiden Seiten von DNA flankiert wird (siehe Abschnitt 5.3).

Nach der Entdeckung, dass DNA-Ähnlichkeit keine Voraussetzung für eine effiziente DTS ist, erweiterte unsere Gruppe den Anwendungsbereich der DTS um eine Vielzahl an Reaktionen, von denen die meisten bis dahin nicht für

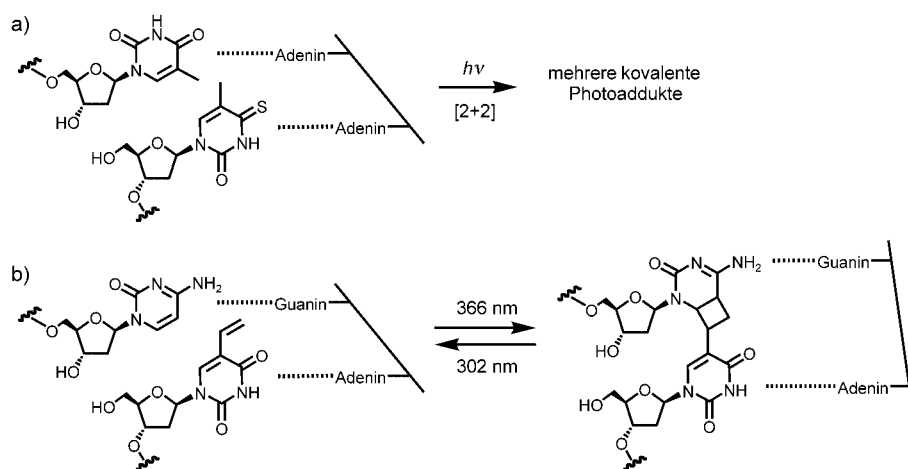


Abbildung 5. DNA-gestützte photoinduzierte [2+2]-Cycloadditionen.^[94–101]

dition, meist an der C5-C6-Doppelbindung von Pyrimidinen, war die häufigste Reaktion bei der DTS von Basenanaloga. Eines der ersten Beispiele war die von Lewis und Hanawalt beschriebene DNA-gestützte Bildung eines Thymindimers durch Bestrahlung bei $> 290 \text{ nm}$.^[94] Über die DNA-gestützte Photoligation zwischen Thymidin und 4-Thiothymidin wurde ebenfalls berichtet (Abbildung 5 a).^[95] Weitere photoreaktive Gruppen, die in DNA-gestützten [2+2]-Cycloadditionen Verwendung fanden, waren Cumarin,^[96] Psoralen^[97] und Stilben.^[98–100] Kürzlich beschrieben Fujimoto, Saito et al. eine reversible DNA-gestützte Photoligation/Photospaltung durch [2+2]-Cycloaddition zwischen benachbarten Pyrimidinbasen, von denen eine mit einer 5-Vinylgruppe modifiziert war (Abbildung 5 b).^[101]

Die Produkte der oben beschriebenen Nucleotidligationen sind dem Nucleinsäurerückgrat strukturell verwandt und bewahren üblicherweise den Abstand von sechs Bindungen zwischen den Nucleotideinheiten oder die relative Anordnung benachbarter aromatischer Basen. Eine implizite Annahme dieser Untersuchungen ist, dass die DNA-gestützte Reaktion dann effizient verläuft, wenn die DNA-gebundenen reaktiven Gruppen benachbart sind und der Übergangszustand der Reaktion strukturell der nativen DNA ähnelt.

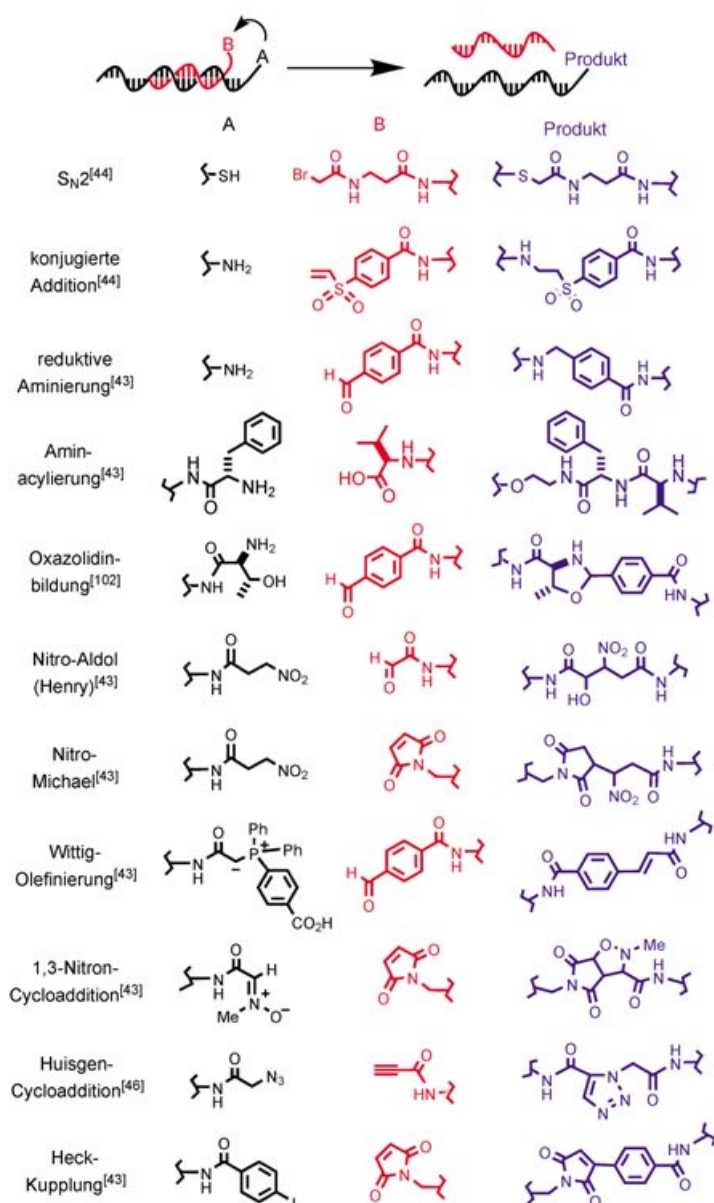


Abbildung 6. DNA-gestützte Reaktionen, die Produkte liefern, die nicht Nucleotiden ähneln.^[43, 44, 46, 102]

Nucleinsäure-gestützte Formate beschrieben waren.^[43, 44] Konjugierte Additionen von Thiolen und Aminen an Maleimide und Vinylsulfone, S_N2 -Reaktionen, Aminacylierungen, reduktive Aminierungen,^[43, 44] Cu^I -vermittelte Huisgen-Cycloadditionen^[46] und die Oxazolidinbildung^[102] verliefen mit einem DTS-Format, das die A+A'-Templatarchitektur nutzte, effizient und sequenzspezifisch (Abbildung 6).^[43] Ferner wurden zahlreiche nützliche C-C-Verknüpfungsreaktionen erfolgreich in das DTS-Format übertragen, darunter die Nitro-Aldol-Addition (Henry-Reaktion), die Nitro-Michael-Addition, die Wittig-Olefinierung, die Heck-Kupplung und die 1,3-dipolare Nitron-Cycloaddition (Abbildung 6).^[43, 44] Zu diesen Umsetzungen gehörten die ersten Nucleinsäure-gestützten C-C-Kupplungen, die nicht auf einer photoinduzierten Cycloaddition beruhten. Die Pd-vermittelte

Heck-Kupplung war das erste Beispiel einer DNA-gestützten Organometallreaktion. Czapinski und Sheppard beschrieben die DTS von Metallsalenen (Abbildung 7).^[45] Zwei an Salicylaldehyd gebundene DNA-Stränge wurden durch ein komplementäres DNA-Templat in der A+B+A'-Architektur zusam-

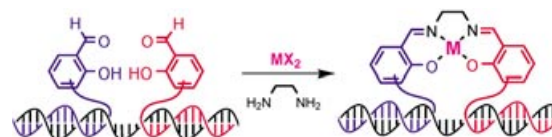


Abbildung 7. DNA-gestützte Bildung von Metallsalen-DNA-Konjugaten ($M = Ni^{2+}$ oder Mn^{2+}).

mengebracht. Das Metallsalen bildete sich in Gegenwart von Ethylendiamin und Ni^{2+} oder Mn^{2+} . Gothelf, Brown et al. nutzten kürzlich diese Reaktion zum DNA-gestützten Aufbau von linearen und verzweigten Konjugatstrukturen (siehe Abschnitt 3.3).^[103]

Insgesamt haben diese Untersuchungen schlüssig gezeigt, dass eine DTS mit sequenzspezifischer Steuerung der effektiven Molarität auch möglich ist, wenn die Strukturen der Reaktanten und Produkte der von Nucleinsäuren nicht gleicht. Das Feld der Reaktionen, deren Kompatibilität mit der DTS inzwischen bekannt ist, ist verglichen mit dem Kompendium an konventionellen Synthesemethoden, die in den vergangenen zwei Jahrhunderten entwickelt wurden, zwar nur mäßig groß, aber es ist ausreichend vielfältig, um die durch einen DNA-Strang gesteuerte Synthese komplexer und diverser synthetischer Strukturen zu ermöglichen (siehe Abschnitte 3.2 und 3.3).

2.3. DNA-gestützte Transformationen funktioneller Gruppen

In den bisher beschriebenen Umsetzungen wurde die DNA-Hybridisierung zur Kupplung zweier DNA-gebundener reaktiver Gruppen verwendet. Doch nicht nur Kupplungsreaktionen sind wegen ihrer Bedeutung für das Erzeugen von Komplexität in synthetischen Molekülen wichtig, sondern auch Transformationen funktioneller Gruppen sind wichtige Bestandteile der organischen Synthese. Einige DNA-gestützte Transformationen funktioneller Gruppen wurden in letzter Zeit bekannt.

Ma und Taylor katalysierten mit einem DNA-Oligonucleotid mit einer 5'-Imidazolgruppe die DNA-gestützte Hydrolyse eines 3'-*p*-Nitrophenylester-Oligonucleotids unter Verwendung der A+B+A'-Architektur (Abbildung 8a).^[49] Das Primärprodukt der Reaktion, ein Imidazolyamid, das an beiden Enden an DNA gebunden ist, hydrolysiert rasch zur freien Carbonsäure. Das Endresultat dieser Reaktion ist die DNA-gestützte Transformation eines *p*-Nitrophenylesters in eine Carbonsäure. Ma und Taylor zeigten, dass das Templat nach der Esterhydrolyse vom produktgebundenen DNA-Strang dissoziieren und an weiteren Katalysezyklen mit

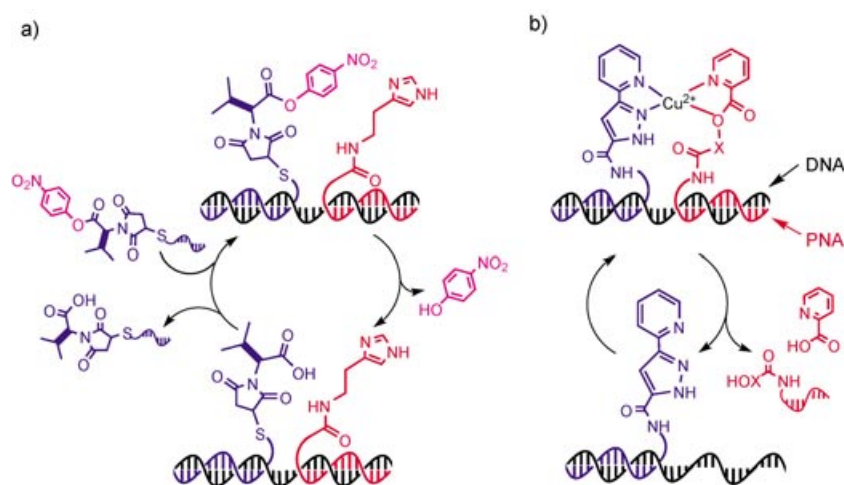


Abbildung 8. DNA-gestützte Transformationen funktioneller Gruppen.^[49,104] X in (b): OCH_2CH_2 .

anderen Ester-Oligonucleotiden teilnehmen kann. Brunner, Krämer et al. entwickelten kürzlich eine konzeptionell verwandte DNA-gestützte Transformation funktioneller Gruppen, die DNA-Template zur Vermittlung einer Cu^{2+} -katalysierten Arylesterspaltung einsetzt (Abbildung 8b).^[104] In diesem ersten Beispiel einer Templat-gestützten Katalyse unter Beteiligung eines DNA-gebundenen Metallkomplexes werden DNA-Arylester in Alkohole überführt.

3. Erweiterung der Möglichkeiten der DNA-gestützten Synthese

Gemeinsam mit den oben erwähnten Bemühungen, mehr Reaktionen für die Nucleinsäure-gestützte Synthese zu adaptieren, haben neuere Erkenntnisse und Entwicklungen die Möglichkeiten der DTS signifikant erweitert. Dazu gehören 1) die DTS zwischen weit voneinander entfernten reaktiven Gruppen, 2) die mehrstufige DTS, bei der das Produkt einer DNA-gestützten Reaktion so verändert wird, dass es als Ausgangsmaterial für einen weiteren DNA-gestützten Schritt dient, 3) das Design neuer Templatarchitekturen, die die Zahl an Reaktionen, die im DNA-gestützten Format durchgeführt werden können, vergrößern, 4) die durch doppelsträngige DNA gestützte Synthese und 5) neue Modi einer Reaktivitätssteuerung durch die DTS, die nicht mit konventionellen Synthesemethoden erreicht werden können.

3.1. Abstandsunabhängige DNA-gestützte Synthese

Die Fähigkeit der DNA-Hybridisierung, die Synthese von Molekülen zu unterstützen, die dem DNA-Rückgrat nicht strukturverwandt sind, weist darauf hin, dass die räumliche Nähe funktioneller Gruppen möglicherweise für eine effiziente DTS nicht notwendig ist. Unsere Gruppe untersuchte die Effizienz einfacher DNA-gestützter konjugierter Additionen und nucleophiler Substitutionen als Funktion der Zahl der zwischen den hybridisierten reaktiven Gruppen eingefügten

Einzelstrang-Templatbasen (Abbildung 9).^[44] Überraschenderweise änderte sich bei beiden Reaktionen die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung nicht wesentlich, wenn die Abstände zwischen den hybridisierten reaktiven Gruppen zwischen einer und dreißig Basen variierten (Abbildung 9). Reaktionen, die dieses Verhalten zeigen, wurden „abstandsunabhängig“ genannt. Der Austausch der eingefügten Einzelstrang-DNA-Basen gegen DNA-Analoga oder Doppelstrang-DNA zeigte, dass eine effiziente DTS über große Abstände eine flexible eingefügte Region benötigt, aber nicht die spezifische Struktur des DNA-Rückgrats. Ein signifikanter Teil der DNA-gestützten Reaktionen, die wir bislang untersucht haben, zeigt zumindest eine gewisse Abstandsabhängigkeit.^[43,44]

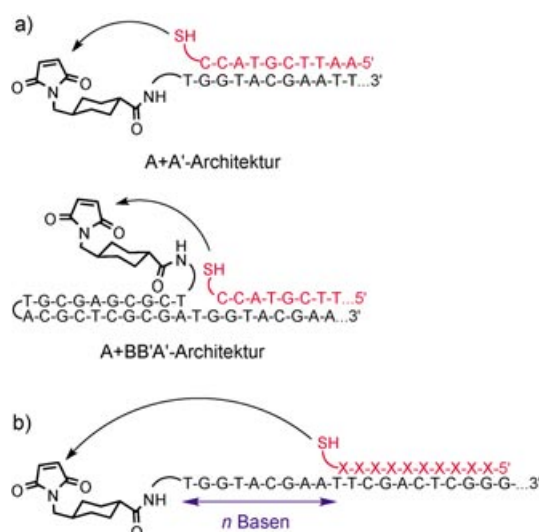


Abbildung 9. Abstandsunabhängige DNA-gestützte Synthese. a) Zwei Architekturen, die die abstandsunabhängige DTS unterstützen können. b) Eine DTS-Reaktion ist abstandsunabhängig, wenn eine ganze Reihe von n -Werten die Produktbildungsgeschwindigkeit kaum beeinflusst.^[43,44]

Die abstandsunabhängige DTS gibt angesichts der erwarteten Verringerung der effektiven Molarität als Funktion des Abstands sowie der altbekannten Schwierigkeiten bei der Makrocyclensynthese zunächst Rätsel auf,^[105,106] kann aber teilweise mit der Fähigkeit der DNA-Hybridisierung erklärt werden, die effektive Molarität bis zu dem Punkt zu erhöhen, an dem die Bindungsbildung für einige Reaktionen nicht mehr geschwindigkeitsbestimmend ist. In der Tat haben anschließende Studien gezeigt, dass die DNA-Hybridisierung und nicht die Bildung kovalenter Bindungen zwischen den reaktiven Gruppen in der abstandsunabhängigen DTS geschwindigkeitsbestimmend ist.^[44] Weitere Faktoren, die zur effizienten DTS über große Entfernungen beitragen, werden in Abschnitt 5.1 diskutiert.

3.2. Mehrstufige DNA-gestützte Synthese

Synthetische Moleküle mit nützlicher Komplexität werden üblicherweise in mehrstufigen Synthesen erhalten. Die Entdeckung der abstandsunabhängigen DTS war ein wichtiger Beitrag zur DNA-gestützten Synthese komplexer synthetischer Strukturen, da sie die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass ein einziges DNA-Templat zur Steuerung mehrerer chemischer Reaktionen an schrittweise komplexeren Produkten eingesetzt werden kann.

Unsere Gruppe erreichte dieses Ziel durch die Entwicklung einer Reihe von Linker-Molekülen und Reinigungsstrategien, die es ermöglichen, das Produkt einer DNA-gestützten Reaktion in weiteren DNA-gestützten Schritten einzusetzen. Die größten Herausforderungen waren dabei die Entwicklung einer generell anwendbaren Methode für die Trennung des DNA-Teils des DTS-Reagens vom Produkt der Reaktion nach Beendigung der DNA-gestützten Kupplung (Abbildung 10) und die Entwicklung von geeigneten Methoden für die wässrige Synthese im pmol-Maßstab, die eine spätere Reinigung des Produkts der DNA-gestützten Reaktion von unumgesetzten Templatmolekülen und Reagentien erlauben.

Wir nutzten unsere Ergebnisse, indem wir DNA-Templates mit drei Zehn-Basen-Codierungsregionen für drei Folge-

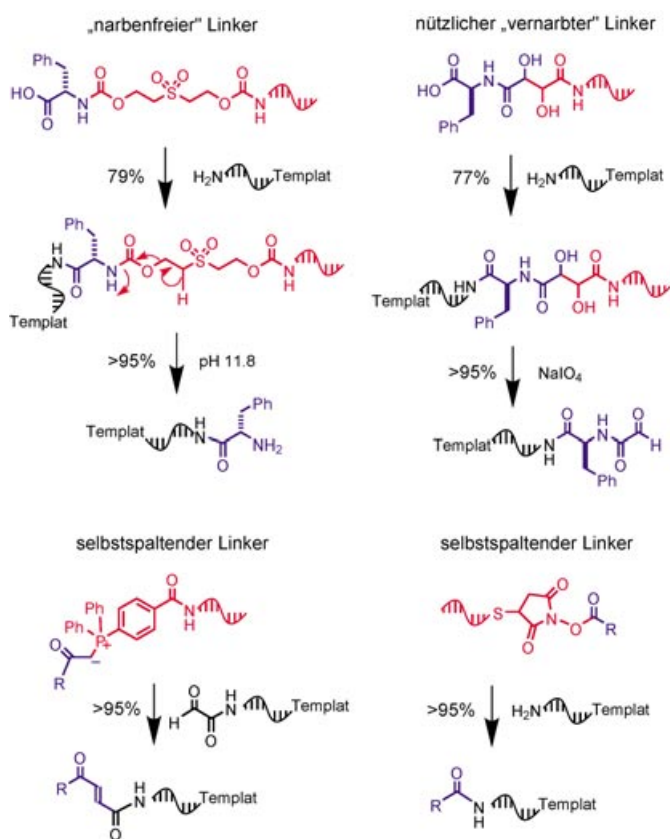


Abbildung 10. Drei Linker-Strategien für die DTS.^[47] Die Spaltung eines „nützlichen vernarbten Linkers“ erzeugt eine funktionelle Gruppe, die in Folgeumsetzungen als Substrat dient. Ein „narbenfreier Linker“ wird ohne die Einführung unerwünschter Funktionalität gespalten. Die Spaltung eines „selbstspaltenden Linkers“ ist eine natürliche Folge der Reaktion.

schritte zweier mehrstufiger DNA-gestützter Synthesen einsetzen (Abbildung 11).^[47] Auf diese Weise wurden ein nicht-natürliches Tripeptid in drei aufeinander folgenden DNA-gestützten Aminacylierungsreaktionen (Abbildung 11a) sowie ein verzweigter Thioether in einer DNA-gestützten Reaktionsserie aus Aminacylierung, Wittig-Olefinierung und konjugierte Addition (Abbildung 11b) erzeugt. Diese Studien repräsentieren die ersten Beispiele einer mehrstufigen Translation von DNA in synthetische niedermolekulare Produkte.

Nach diesen Synthesen hat die Entwicklung weiterer DNA-gestützter Reaktionen, Linker-Strategien und Templatarchitekturen (siehe Abschnitt 3.3) zur mehrstufigen DTS von zunehmend anspruchsvolleren Strukturen geführt. So nutzten wir die kürzlich beschriebene DNA-gestützte Oxazolidinbildung, einen neuen Thioester-Linker und die Templatarchitektur der zweiten Generation, die in Abschnitt 3.3 vorgestellt wird, zur Translation von DNA-Templates in mono- und makrobicyclische *N*-Acyloxazolidine (siehe Abbildung 13).^[102] Auch wenn die ersten Produkte der mehrstufigen DTS gegenüber denen konventioneller organischer Synthesen eine eher mäßige Komplexität aufweisen, deuten diese Beispiele doch schon darauf hin, dass hinreichend komplexe und strukturell verschiedenartige Verbindungen mit interessanten biologischen oder chemischen Eigenschaften mithilfe der DNA-gestützten Synthese erzeugt werden können.

3.3. Neue Templatarchitekturen für die DNA-gestützte Synthese

Die bisher beschriebenen DNA-gestützten Reaktionen verwendeten eine von drei Templatarchitekturen (siehe Abbildung 3): A+A', A+B+A'B' oder die Haarnadelform der letzteren (A+BB'A'). Die Vorhersagbarkeit von DNA-Sekundärstrukturen legt jedoch das rationale Design weiterer Templatarchitekturen nahe, die die Möglichkeiten der DTS ausweiten.

Die Abstandsabhängigkeit einiger DNA-gestützter Reaktionen (z. B. dipolarer Nitron-Olefin-Cycloadditionen oder reduktiver Aminierungen) begrenzt ihre Anwendung in der mehrstufigen DTS, da die drei aufgelisteten Templatarchitekturen maximal Raum für eine abstandsabhängige Reaktion bieten (unter Verwendung der Templatbasen, die den reaktiven Gruppen unmittelbar benachbart sind). Unsere Gruppe entwickelte eine neue Templatarchitektur, mit der eigentlich abstandsabhängige Reaktionen effizient verlaufen, selbst wenn sie durch Templatregionen codiert werden, die weit entfernt von den aktiven Gruppen des Templats liegen. Wir überwinden die Abstandsabhängigkeit durch die Verwendung von drei bis fünf konstanten Basen am reaktiven Ende des Templats, die zu einer kleinen Zahl konstanter Basen am reaktiven Ende des DNA-gebundenen Reagens komplementär sind (Abbildung 12).^[46] Diese Anordnung, die Omega(Ω)-Architektur, ermöglichte erfolgreiche abstandsabhängige Reaktionen, auch wenn sich die codierenden Basen weit entfernt vom reaktiven Ende des Templats befanden. Wichtig ist dabei, dass die Sequenzspezifität in der Ω -Architektur trotz des Vorliegens invarianter komple-

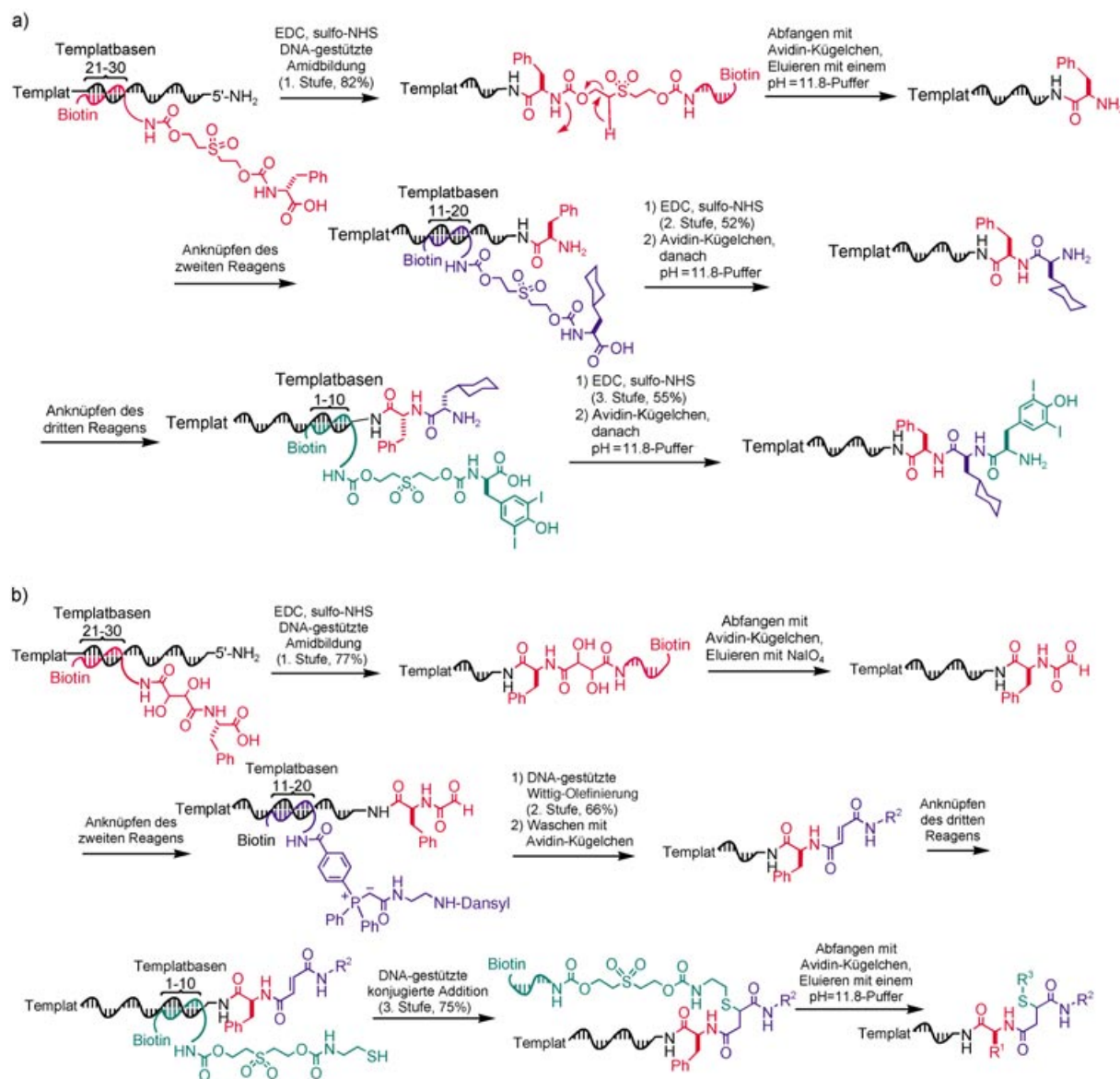


Abbildung 11. Mehrstufige DNA-gestützte Synthese von a) einem synthetischen Tripeptid und b) einem verzweigten Thioether. Nur eines der möglichen Regioisomere der Thioladdition ist in (b) gezeigt. $R^1 = \text{CH}_2\text{Ph}$; $R^2 = (\text{CH}_2)_2\text{NH-dansyl}$; $R^3 = (\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$; dansyl = 5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonyl.^[47]

mentärer Basen in der Nähe der reaktiven Gruppen erhalten bleibt, da der Energiegewinn aus der Hybridisierung der konstanten Basen kaum den Entropieverlust ausgleicht, der aus dem Ordnen der zwischen den reaktiven Gruppen eingefügten Basen resultiert (Abbildung 12a).^[46] Prinzipiell erlaubt die Ω -Architektur die Codierung jeder DNA-gestützten Reaktion an beliebiger Stelle auf einem Templat mit ähnlicher Länge wie die beschriebenen (bis etwa 40 Basen).

Eine zweite von uns entwickelte Templataarchitektur ermöglicht die DNA-gestützte Reaktion dreier reaktiver Gruppen in einem einzigen Schritt.^[46] Die effiziente Reaktion von drei Gruppen, die an einer Stelle des DNA-Templats lokalisiert sind, ist bei den $A+A'$ -, $A+B+A'B'$ - oder $A+BB'A'$ -Templataarchitekturen schwierig, da eine DTS zwischen reaktiven Gruppen, die durch doppelsträngige Templat-Reagens-Komplexe getrennt sind, durch die Starrheit

doppelsträngiger DNA inhibiert wird (Abbildung 12b).^[44] Die Verlegung der reaktiven Gruppe auf dem Templat von dessen Ende zur Nicht-Watson-Crick-Seite eines Nucleotids in der Mitte ermöglicht zwei DNA-gestützte Reaktionen zwischen drei reaktiven Gruppen in einem einzigen DTS-Schritt (Abbildung 12a und c). Diese „T“-Architektur wurde genutzt, um ein Zimtsäureamid in einem Schritt in einer DNA-gestützten Substitutionsreaktion und Wittig-Olefinierung aus DNA-gebundenen Phosphan-, α -Iodamid- und Aldehydeinheiten herzustellen und um mithilfe einer Aminacylierung und Cu^I -katalysierten Huisgen-Cycloaddition ein Triazolylalanin aus DNA-gebundenen Amin-, Alkin- und Azideinheiten aufzubauen (Abbildung 12c).^[46] Da einige DNA-Polymerasen, die in der PCR verwendet werden, gegenüber Templat-Anhängen auf der Nicht-Watson-Crick-Seite von Nucleotiden tolerant sind,^[107] kann die gesamte

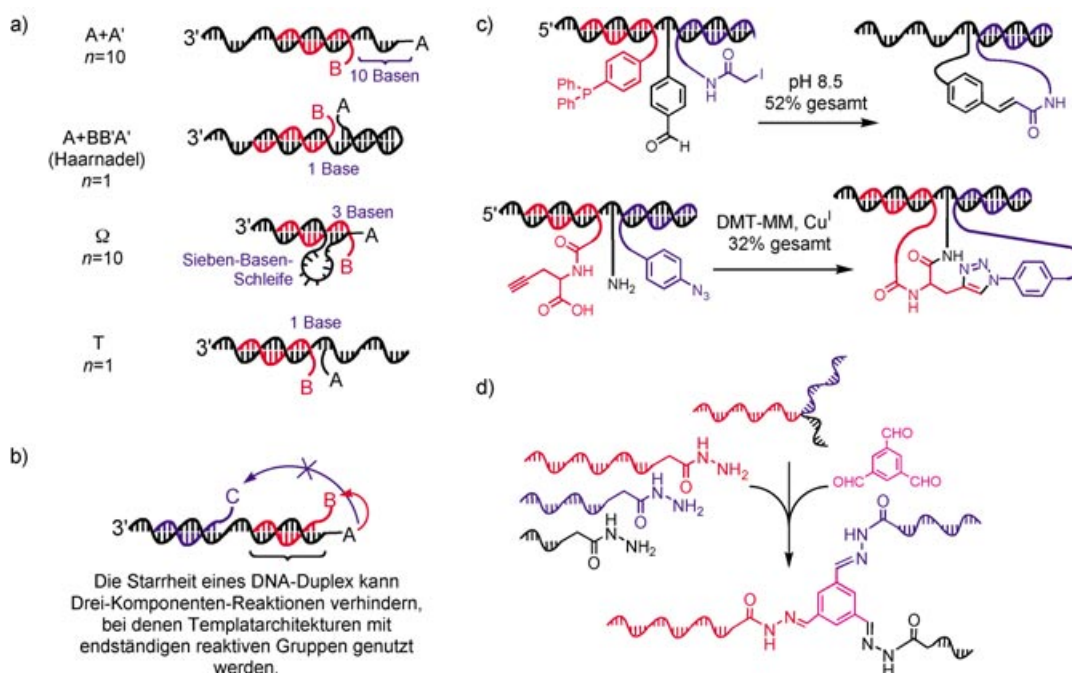


Abbildung 12. Architekturen für die DNA-gestützte Synthese. a) Repräsentative Beispiele für die $A+A'$ -, $A+BB'A'$ (Haarnadel)-, Ω - und T -Architektur. b) Doppelsträngige Templatregionen können multiple DNA-gestützte Reaktionen auf einem einzelnen Templat in einem Schritt verhindern. c) Zwei DNA-gestützte Reaktionen auf einem einzelnen Templat in einer Lösung, vermittelt durch die T -Architektur.^[46] d) Ein Y -förmiges Templat vermittelt die dreifache Hydrazonbildung.^[108]

Information eines T -Architekturtemplats mittels PCR amplifiziert werden.

Diese beiden Templatarchitekturen der zweiten Generation waren essenzielle Komponenten der kürzlich beschriebenen mehrstufigen DNA-gestützten Synthese von monocyclischen und bicyclischen N -Acyloxazolidinen (Abbildung 13).^[102] Ausgehend von einem eine Amineinheit tragenden T -Templat nutzten wir die Ω -Architektur für eine DNA-gestützte Aminacylierung über große Entfernung zur Herstellung T -gebundener Aminoalkohole. Im zweiten Schritt erfolgte die DNA-gestützte Oxazolidinbildung durch die Anlagerung DNA-gebundener Aldehyde an den $3'$ -Arm des den Aminoalkohol tragenden T -Templats. Die Instabilität der gebildeten Oxazolidine machte es erforderlich, dass die Oxazolidin- N -Acylierung im gleichen Schritt wie die Oxazolidinbildung erfolgte. Die DNA-gestützte N -Acylierung des Oxazolidins wurde daher über den $5'$ -Arm des T -Templats gesteuert. Die Linker- und Reinigungsstrategien, darunter die Verwendung von Sulfon- und Thioesterspaltung sowie eine auf Biotin basierende Affinitätsbindung und -freisetzung, ergab das DNA-gebundene N -Acyloxazolidin in Abbildung 13a.^[102] Eine modifizierte Version dieser Synthese auf der Basis von Sulfon-, Phosphan- und Diol-Linkern, die mit einer Wittig-Makrocyclisierung endet, ergab das in Abbildung 13b gezeigte bicyclische N -Acyloxazolidin.^[102]

Eckardt, von Kiedrowski et al. kombinierten kürzlich ein verzweigtes, Y -förmiges DNA-Templat mit drei komplementären, Hydrazideinheiten tragenden Oligonucleotiden und freiem Trimesaldehyd zur simultanen DNA-gestützten Synthese von drei Hydrazoneinheiten (Abbildung 12d).^[108] Die verzweigte Form des Templats wurde in das Y -förmige

Produkt kopiert, was die Nucleinsäure-gestützte Replikation einer nichtlinearen Konnektivität demonstrierte. Die vollständige Sequenzinformation und Konnektivität eines verzweigten Templats kann jedoch nicht einfach mittels Polymerase-gestützter Reaktionen wie der PCR kopiert werden, weshalb solche Template besser für die Replikation von verzweigten Strukturen geeignet sein mögen als für Anwendungen, die die Decodierung der vollständigen Templatinformation verlangen (siehe Abschnitt 6). Die Y -Templatarchitektur wurde auch von Gothelf, Brown et al. genutzt, um verzweigte, durch Metallosalen-Einheiten verknüpfte konjugierte Polyene aufzubauen.^[103]

Die sechs beschriebenen Templatarchitekturen ($A+A'$, $A+B+A'B'$, $A+BB'A'$ (Haarnadel), Ω , T und Y) sind wichtige Entwicklungen in der DTS, weil sie eine größere Vielfalt an Anordnungen von Templatsequenzen und reaktiven Gruppen verfügbar machen, die zu effizienter DNA-gestützter Produktbildung führen. In einigen Fällen^[102] ist die Synthese des Produkts nur unter Verwendung einer spezifischen Templatarchitektur möglich. Die Möglichkeit, neue DNA-Architekturen in vorhersagbarer Weise zu erzeugen,^[109–118] lässt darauf schließen, dass zunehmend ausgefeiltere Templatarchitekturen die Möglichkeiten der DTS immer mehr erweitern werden.

3.4. Durch doppelsträngige DNA gestützte Synthese

In allen bisher angeführten Beispielen wurden einzelsträngige Template durch Watson-Crick-Paarung mit komplementären Oligonucleotiden hybridisiert, an die die reaktiven

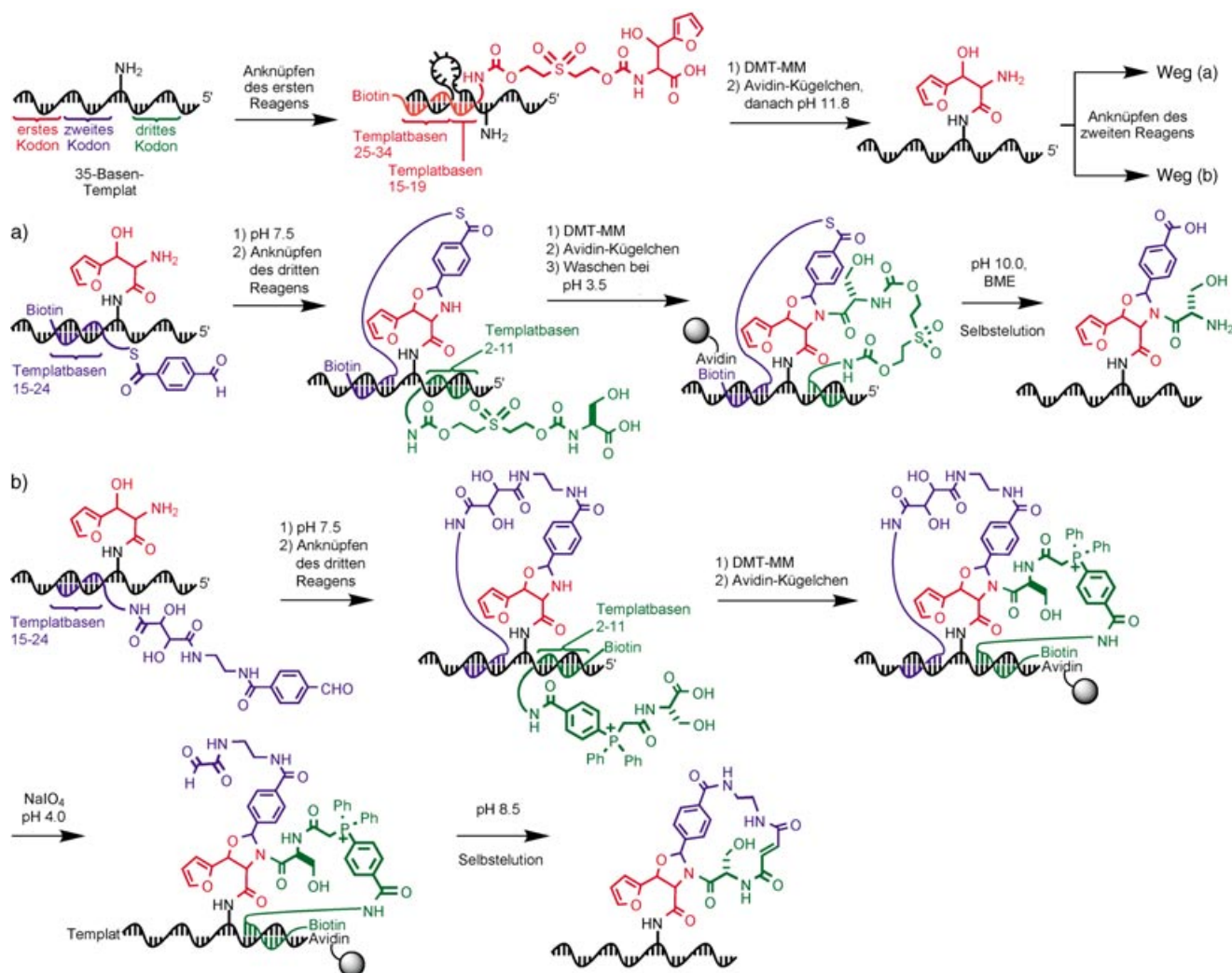


Abbildung 13. Translation von DNA in *N*-Acyloxazolidine. Weg (a): mehrstufige DNA-gestützte Synthese eines monocyclischen *N*-acylierten Oxazolidins; Weg (b): mehrstufige DNA-gestützte Synthese eines bicyclischen *N*-acylierten Oxazolidins.^[102]

tiven Gruppen gebunden sind. Doppelsträngige DNA kann ebenfalls als Templat für die DTS dienen, indem entweder die große oder die kleine Furche zum Binden der Reaktanten genutzt wird.^[119,120] Luebke und Dervan beschrieben die durch doppelsträngige DNA gestützte 3',5'-Phosphodiesterbildung zwischen zwei DNA-Oligomeren, deren Design die benachbarte Bindung in der großen Furche eines doppelsträngigen Templates durch Hoogsteen-Basenpaarung erlaubt.^[119] Die entstehende Triplex-DNA unterscheidet sich von den Produkten der DNA-gestützten Nucleinsäuresynthese aus Abschnitt 2.1 insofern, als die Sequenz des dritten Stranges weder identisch mit noch komplementär (in Sinne einer Watson-Crick-Paarung) zu der des Templates ist.

Li und Nicolaou entwickelten ein selbstreplizierendes System, das sowohl doppel- als auch einzelsträngige DNA für die Bildung von Phosphodiestern nutzt (Abbildung 14a).^[15] Eine A+A'-Doppelhelix als Templat ermöglichte die Synthese eines dritten Stranges durch Triplex-Bildung. Da A eine palindrome Sequenz hatte, war der erhaltene dritte Strang mit A identisch. Das neu synthetisierte A dissoziierte vom

A+A'-Duplex und steuerte anschließend die Bildung des Komplementärstranges A' aus zwei kleineren Oligonucleotiden, um als A+A'-Duplex der zweiten Generation für eine neue Replikationsrunde zur Verfügung zu stehen.^[15] Für diesen Zyklus ist es erforderlich, dass die zu replizierende Sequenz palindrom ist, damit der dritte Strang mit einem der beiden Doppelstränge identisch ist. Wie bei allen Triplex-gestützten Systemen sind auch hier nur Homopurin:Homopyrimidin-Templates einsetzbar.

Eine durch die Bindung an die kleine anstelle der großen Furche vermittelte Doppelstrang-DNA-gestützte Synthese wurde kürzlich von Poulin-Kerstien und Dervan beschrieben.^[120] Haarnadel-Polyamide, die *N*-Methylpyrrol- und *N*-Methylimidazoleinheiten enthalten, sind bekannt für ihre sequenzspezifische Bindung an die kleine Furche doppelsträngiger DNA.^[121] Benachbarte Haarnadel-Polyamide mit einer Azid- bzw. Alkin-Funktionalität bilden in einer Doppelstrang-DNA-gestützten Huisgen-Cycloaddition^[122-126] ein verzweigtes Polyamid, das beide Bindungsstellen der kleinen Furche verbindet und eine höhere Affinität aufweist als jeder

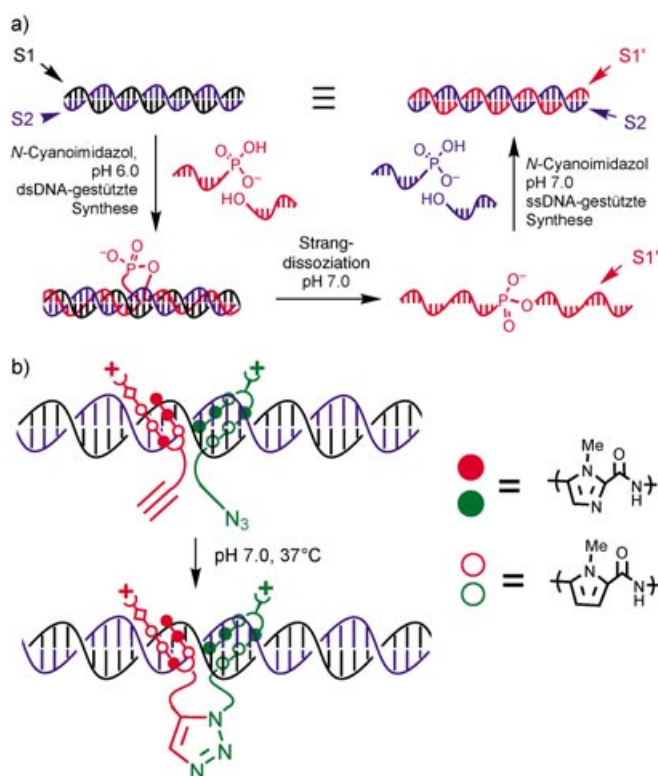


Abbildung 14. DNA-gestützte Synthese mit doppelsträngiger DNA.
a) Replikation einer palindromen doppelsträngigen DNA mithilfe von Einzel- und Doppelstrang-DNA-gestützter Phosphodiesterbildung.^[15]
b) Doppelstrang-DNA-gestützte Dimerisierung von Polyamiden durch sequenzspezifische Bindung an die kleine Furche einer Doppelhelix.^[120]

der Polyamid-Reaktanten (Abbildung 14b). Die Reaktion ist stark abstandsabhängig, was mit der Starrheit des doppelsträngigen Templates – im Gegensatz zur Flexibilität einzelsträngiger DNA, die eine abstandsunabhängige DTS erlaubt – in Einklang ist.^[44] Diese Abstandsabhängigkeit kann bei der Selbstorganisation kleiner Moleküle, die sequenzspezifisch an doppelsträngige DNA binden, hilfreich sein, da sowohl der Abstand zwischen den Bindungsstellen als auch deren Sequenzen optimal für eine effiziente Kupplung sein müssen.

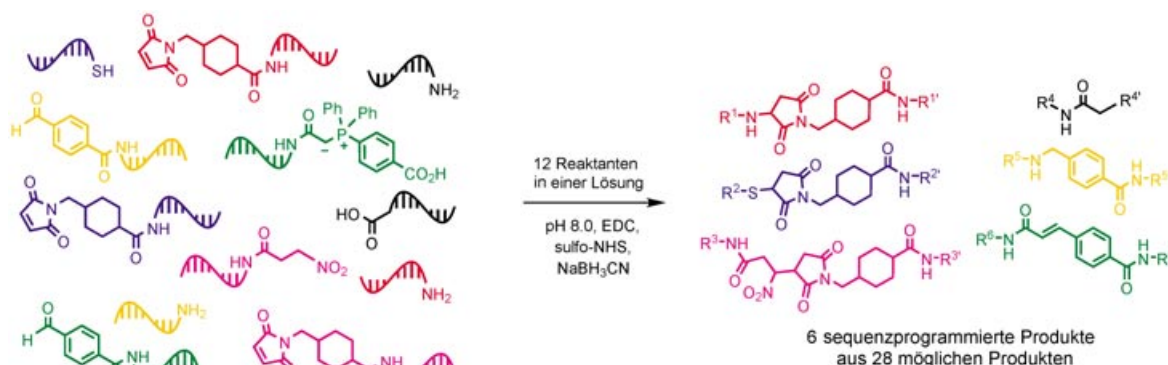


Abbildung 15. Die DTS kann mehrere, in einer einzigen Lösung normalerweise inkompatible Reaktionen steuern. Rⁿ, R^m: Linker oder DNA-Oligonucleotid.^[126]

3.5. Neue Modi zur Steuerung der Reaktivität durch DNA-gestützte Synthese

In lebenden Systemen ermöglicht die Verwendung der effektiven Molarität eine Steuerung chemischer Reaktionen, wie sie in der konventionellen Laborsynthese nicht möglich ist. So werden primäre Aminogruppen während der Peptidbiosynthese acyliert, bilden im Verlauf biosynthetischer Aldolreaktionen Imine und fungieren in Ammonium-Lyase-katalysierten Eliminierungen als Abgangsgruppe – alles in derselben Lösung und in einer substratspezifischen Weise. Im Gegensatz dazu können unter konventionellen Synthesebedingungen Aminacylierung, Iminbildung und Amineliminierung ohne eine räumliche Trennung der jeweiligen Reaktanten nicht simultan und in kontrollierter Weise durchgeführt werden.

Mithilfe der DTS sind auch mehrere, sonst inkompatible Reaktionen synthetischer Moleküle mit funktionellen Gruppen ähnlicher Reaktivität in derselben Lösung möglich. Wir zeigten diese Art der Reaktivitätssteuerung anhand dreier (in einer Lösung durchgeführten) Reaktionen mit Maleimiden (Aminaddition, Thioladdition und Nitro-Michael-Addition), die ausschließlich drei sequenzprogrammierte Produkte aus einer Serie von neun möglichen Produkten lieferten.^[126] Analog wurden zwei Aldehyd-Kupplungsreaktionen (reduktive Aminierung und Wittig-Olefinierung) sowie drei Aminreaktionen (Aminacylierung, reduktive Aminierung und Maleimid-Addition) jeweils in einer Lösung durchgeführt, die ausschließlich die erwünschten DNA-gestützten Produkte lieferten.^[126] Schließlich wurden alle sechs Reaktionen simultan in einer einzigen Lösung durch die Kombination von 12 DNA-gebundenen reaktiven Gruppen durchgeführt (Abbildung 15). Während die Kombination dieser Reaktanten in einem konventionellen Syntheseformat mindestens 28 mögliche Produkte geliefert hätte, generierten die DNA-gestützten Reaktionen ausschließlich die 6 in Abbildung 15 gezeigten sequenzprogrammierten Produkte.^[126]

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die DTS auch die Diversifizierung synthetischer Bibliotheken aus niedermolekularen Verbindungen unter Verwendung verschiedener Reaktionstypen in einer einzigen Lösung ermöglichen könnte und dabei den Aufwand und die Einschränkungen vermeiden würde, die mit der räumlichen Trennung einhergehen. Diese

Strategie kann prinzipiell einige der Ziele der neuen diversitätsorientierten Bibliothekssynthesen (darunter sind besonders die Arbeiten der Gruppe um Schreiber zur Erweiterung der Gerüstdiversität in Bibliotheken aus niedermolekularen Verbindungen zu nennen^[127]) erreichen, ohne dass die Gerüstinformation bereits in den Substratgruppen vorhanden sein muss. Wie in jeder DTS-Strategie müssen jedoch auch hier die Reaktionen mit den mild elektrophilen und nucleophilen Gruppen in der DNA kompatibel sein, und alle nicht DNA-gebundenen Reaktanten müssen gegenseitig kompatibel sein.

Schließlich wurde kürzlich gezeigt (siehe die *Anmerkung bei der Korrektur* am Ende des Beitrags), dass mithilfe der DTS Heterokupplungen zwischen Substraten möglich sind, die unter üblichen Synthesebedingungen bevorzugt Homokupplungen eingehen. Die ausschließliche Heterokupplung ist in einem DNA-gestützten Format möglich, weil die effektive Molarität der Heterokupplungspartner weit größer ist als die absolute Konzentration jedes einzelnen zur Homokupplung neigenden Substrats.

4. DNA-gestützte Polymerisation

DNA- und RNA-gestützte Phosphodiesterbildung und Aminacylierung werden in der Natur zur Biosynthese funktioneller Makromoleküle wiederholt. Die effiziente Laborsynthese sequenzdefinierter synthetischer Heteropolymere etwa gleicher Länge wie funktionelle Proteine und Nucleinsäuren bleibt eine enorme Herausforderung. DNA-Polymerasen,^[128–133] RNA-Polymerasen^[134–137] und Ribosomen^[138–142] sind bekannt für ihre Toleranz gegenüber modifizierten Polymerbausteinen, was den Einbau modifizierter Nucleobasen und Aminosäuren in Nucleinsäure- bzw. Peptidpolymere ermöglicht. Natürlich vorkommende Enzyme, die am Aufbau von Biopolymeren beteiligt sind, akzeptieren gewöhnlich jedoch keine Monomere mit nichtnatürlichem Rückgrat, auch wenn Chaput und Szostak kürzlich als bemerkenswerte Ausnahme die Fähigkeit von Deep-Vent(exo-)-DNA-Polymerase beschrieben haben, einen DNA-Primer um drei α -L-TNA-Nucleotide zu verlängern.^[143] Die Nucleinsäure-gestützte Polymerisation hat daher das Interesse der Organiker geweckt, da sie den Zugang zu sequenzdefinierten synthetischen Heteropolymeren ohne die Einschränkungen durch die Substratazeptanz von Polymerasen oder Ribosomen eröffnen könnte.

4.1. DNA-gestützte Polymerisation von DNA und RNA

Polymerisationen sind eine besondere Herausforderung für die DTS, da viele Reaktionen nacheinander effizient und sequenzspezifisch ohne intermediäre Reinigungsschritte ablaufen müssen. Eine hypothetische DNA-gestützte Kupplungsreaktion von Monomeren, die mit 80 % Ausbeute und 80 % Sequenzspezifität verläuft, ergibt das 10mer mit korrekter Sequenz in einer Gesamtausbeute von lediglich 1 %. Das einfachste (im Rückblick trügerisch einfache) Ziel einer Makromolekül-gestützten Polymerisation ist die Polymerisa-

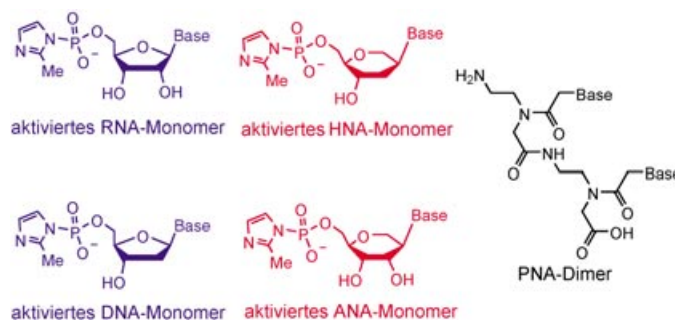


Abbildung 16. Einige für die Oligonucleotid-gestützte Polymerisation geeignete DNA- und RNA-Monomere.^[24, 148–150]

tion aktivierter DNA- oder RNA-Monomere (Abbildung 16). Diese Studien, angeführt von den Pionierarbeiten von Orgel et al.,^[1, 85, 92, 144–150] zeigten, dass mit Monomeren mit aktivierten Phosphaten eine geringe Zahl an DNA-, RNA-, PNA-, HNA- oder ANA-gestützten Phosphoveresterungen zwischen Mono-, Di-, Tri- oder Oligonucleotiden gelang, wobei oligomere DNA- oder RNA-Produkte mit mäßiger Effizienz (üblicherweise < 50 % Ausbeute pro Monomerkupplung) erhalten wurden.

Acevedo und Orgel gelang die DNA-gestützte Synthese eines RNA-14mers unter Verwendung eines DNA-Templats und von G- und C-5'-Phospho-2-methylimidazolid-Monomeren.^[147] Das vollständige Polymer nach 13 DNA-gestützten Kupplungsreaktionen wurde mit ≤ 2 % Gesamtausbeute erhalten. Die Sequenzspezifitäten dieser Oligomerisierung und anderer früher DNA-gestützter Polymerisationen^[1, 85, 92, 144, 146, 147, 149, 150] wurden jedoch nicht im Detail untersucht, und die Template bestanden üblicherweise aus Poly(G), Poly(C) oder G- und C-Basen gemischt. Spätere Studien von Stutz und Richert legen nahe, dass die Fehlerwahrscheinlichkeit bei den verwandten DNA-gestützten Phosphoimidazolmononucleotid-Kupplungen etwa 30 % für die Bildung von G:C-Paaren und > 50 % für die Bildung von A:T-Paaren beträgt,^[151] sodass diese Systeme möglicherweise keine ausreichende Sequenzspezifität haben, um eine verlässliche Translation der Template in sequenzdefinierte synthetische Polymere zu gewährleisten.

4.2. Erzeugung nichtnatürlicher Polymere durch DNA-gestützte Polymerisation

Auch die DNA-gestützte Oligomerisierung von Nicht-DNA- oder -RNA-Monomeren wurde erfolgreich durchgeführt, z. B. von Peptidnucleinsäuren (PNAs)^[24, 149] und Altritolnucleinsäuren (ANAs, den hydroxylierten Analoga der HNAs; Abbildung 16).^[150] Bohler, Nielsen und Orgel verwendeten die DNA-gestützte Aminacylierung für die Oligomerisierung von fünf PNA-Dimeren gg auf einem dC₁₀-Templat.^[24] Diese Studie von 1995 war der erste Bericht über die Nucleinsäure-gestützte Synthese eines Oligomers mit einem nichtnatürlichen Rückgrat. Die Ausbeuten an PNAs mit maximaler Länge in dieser und folgenden Studien^[148] waren jedoch mäßig (üblicherweise < 25 % bezogen auf das limitierende Templat), und die Sequenzspezifität dieser

DNA-gestützten PNA-Oligomerisierungen ist ungeklärt, da auch einige oligomere Produkte erhalten wurden, wenn PNA-Dimere, die zu Bereichen des Templat komplementär sind, oder das Templat selber ausgeschlossen wurden.^[24,148] Im Fall der Nucleinsäure-gestützten Oligomerisierung von ANA erhielten Kozlov, Orgel et al. bei Phosphoimidazolomesterungen mit ANA- oder RNA-C₁₀-Templaten lediglich isomere Mischungen von sehr kurzen Oligomeren aus maximal vier ANA-Nucleotiden.^[150] Die Beobachtung von Chaput und Szostak, dass Polymerasen die DNA-gestützte Oligomerisierung von TNA-Nucleotiden katalysieren können^[143], eröffnet die Aussicht, dass natürliche oder im Labor entwickelte Polymerasen künftig für DNA-gestützte Polymerisationen eingesetzt werden könnten.

Auch andere Reaktionen als die Phosphodiesterbildung und die Aminacylierung wurden bereits in der DNA-gestützten Oligomerisierung und Polymerisation eingesetzt, in einigen Fällen mit bemerkenswertem Erfolg. Fujimoto, Saito et al. beschrieben im Jahr 2000 eine effiziente und reversible DNA-gestützte photochemische [2+2]-Cycloaddition (Abbildung 5b), mit der sie fünf DNA-Hexamere, die jeweils eine 5'-exocyclische Vinylgruppe und eine 3'-Pyrimidineinheit enthielten, auf einem komplementären 30meren DNA-Templat oligomerisierten. Das vollständige 30mere Produkt mit vier Cyclobutanverknüpfungen wurde in hoher Ausbeute durch Bestrahlung bei 366 nm erzeugt und fragmentierte quantitativ in die Monomere durch Bestrahlung bei 302 nm.^[101]

Die Gruppe um Li und Lynn konnte 2002 die Makromolekül-gestützte Polymerisation erheblich voranbringen, indem sie die zuvor von ihr beschriebene DNA-gestützte Kupplung von 5'-Amino- und 3'-Formyl-DNA-Analoga an das Format der DNA-gestützten Polymerisation anpasste.^[31–35,38,39] Im Gegensatz zu den oben beschriebenen DNA-gestützten Oligomerisierungen von DNAs, RNAs, PNAs und

ANAs (Abbildung 16), die normalerweise mit geringen Ausbeuten und mäßiger Kettenlängen- und Sequenzspezifität verlaufen, fand die Gruppe von Li und Lynn eine effiziente Kupplung von acht 5'-Amino-3'-formyl-dT-Mononucleotiden an einem dA₈-Templat zum octameren Produkt (> 80 % Ausbeute, Abbildung 17). Wichtig war dabei, dass keine Produkte mit mehr als acht Nucleotiden erhalten wurden, dass die Oligomerisierung nicht ohne das Templat verlief und dass in Gegenwart von Templaten mit A- und T-Basen keine Oligomerisierung erfolgte, wenn Templat und Monomer keine Basenpaarungen eingehen konnten.^[34] Diese Ergebnisse demonstrierten die Fähigkeit der DTS, synthetische Polymere effizient und sequenz- und längenspezifisch zu bilden.

Unsere Gruppe untersuchte die Effizienz, Regioselektivität und Sequenzspezifität von PNA- oder Formyl-PNA-Polymerisationen mittels Aminacylierung oder reduktiver Aminierung an 5'-aminierten Haarnadel-DNA-Oligonucleotiden.^[152] In Einklang mit den früheren Beobachtungen^[43,126] zur Abstandsunabhängigkeit der DNA-gestützten Aminacylierung waren Regioselektivität und Ausbeute an Oligomeren mit der vollen Länge gering, wenn die Polymerisation durch eine Aminacylierung vermittelt wurde. Im Gegensatz dazu verlief die Polymerisation mittels der stark abstandsabhängigen^[43,46] reduktiven Aminierung sehr effizient (> 90 % Ausbeute an Oligomer mit der vollen Länge) und mit ausgezeichneter Sequenzspezifität und Regioselektivität (Abbildung 18),^[152] was in Einklang mit den Ergebnissen von Lynn et al. ist.

Wir untersuchten systematisch die Sequenzspezifität von DNA-gestützten Formyl-PNA-Polymerisationen mit Templaten, die alle vier Basen enthielten,^[152] und fanden, dass tetramere Formyl-PNAs der Sequenz gvvv (v = g, a oder c) selbst in Gegenwart von Mischungen aller neun möglichen gvvv-Formyl-PNAs mit ausgezeichneter Sequenzspezifität polymerisiert wurden. In allen Fällen brach die Polymerisa-

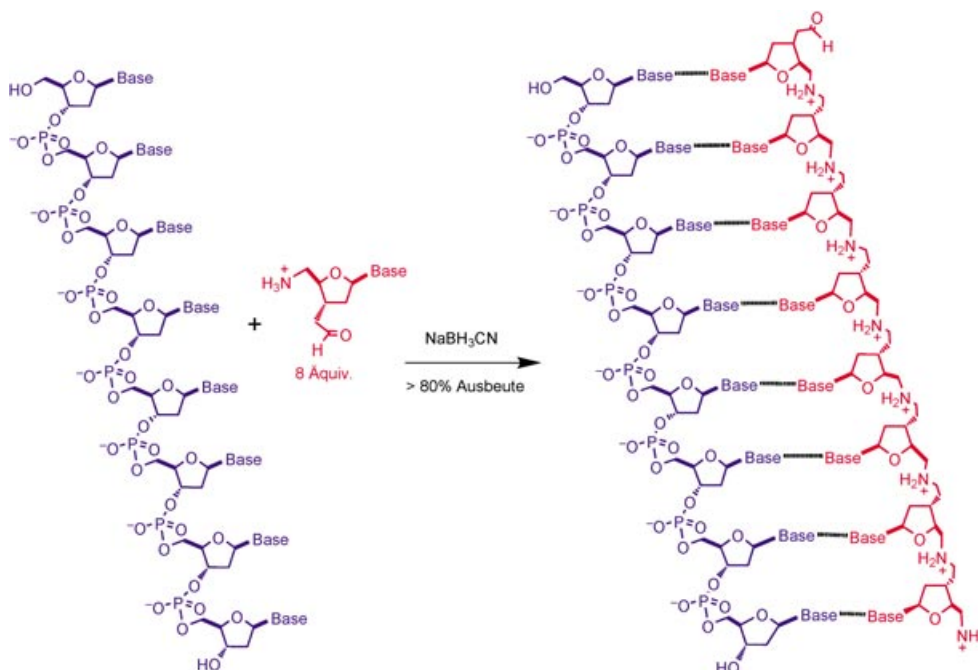


Abbildung 17. DNA-gestützte Polymerisation von 5'-Amino-3'-formyl-modifizierten dT-Monomeren.^[34]

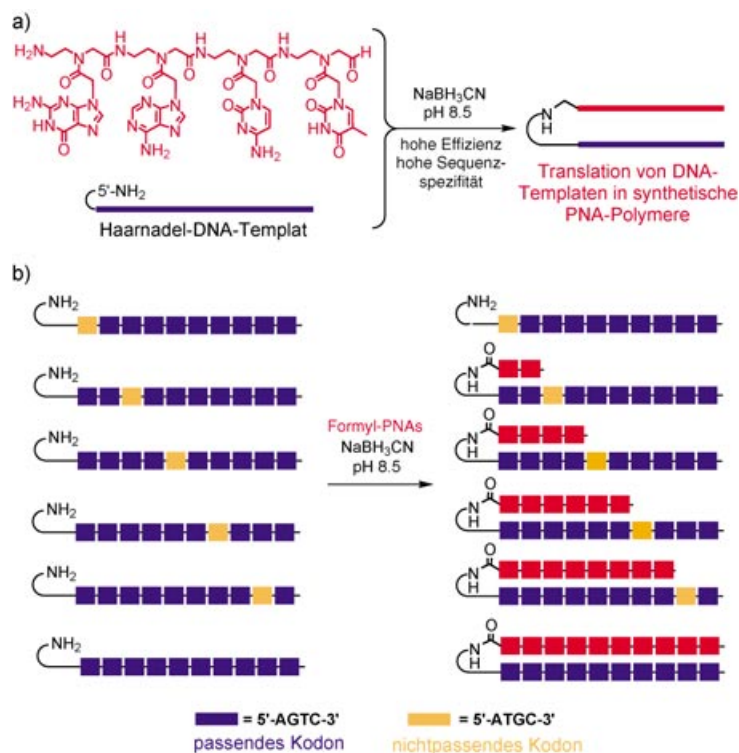


Abbildung 18. DNA-gestützte Formyl-PNA-Polymerisation. a) Ein DNA-Template mit 5'-terminalem Amin (blau) steuert die effiziente Oligomerisierung von modifizierten Formyl-PNAs (rot) mit hoher Sequenzspezifität; b) nichtpassende Kodons (orange) in den Templates stoppen die Polymerisation der Formyl-PNAs, und es entstehen vorwiegend verkürzte Produkte, was die Regioselektivität belegt.^[152]

tion ab, sobald das erste Kodon des Templates erreicht wurde, das zu keiner Formyl-PNA in der Lösung komplementär war. Aufbauend auf diesen Resultaten wurde die DNA-gestützte reduktive Aminierung verwendet, um neun verschiedene DNA-Template mit codierenden Regionen aus 40 Basen und näherungsweise gleichen prozentualen Anteilen an A, C, G und T (zehn konsekutive Vier-Basen-Kodons) in die korrespondierenden sequenzdefinierten synthetischen PNA-Heteropolymere zu übersetzen (Abbildung 18).^[152] Heteropolymere mit der vollen Länge wurden nur dann in guter Ausbeute erhalten, wenn zu allen Template-Kodons komplementäre Formyl-PNAs vorhanden waren. Diese Untersuchungen bewiesen, dass synthetische Polymere mit einer Länge ähnlich der natürlicher Biopolymere und mit Binde- oder Katalyseeigenschaften^[153] mittels der Nucleinsäure-gestützten Synthese effizient und sequenzspezifisch hergestellt werden können.

5. Zum physikalisch-organischen Verständnis der DNA-gestützten Synthese

Das Verständnis der Schlüsselaspekte der DNA-gestützten Synthese ist nicht nur für die weitere Entwicklung der DTS wichtig, sondern es enthält auch Prinzipien, die zu einem tieferen Verständnis analoger biologischer und chemischer Systeme beitragen. In diesem Abschnitt diskutieren wir

drei zentrale Eigenschaften der DTS, für die sich ein Verständnis der zugrunde liegenden Prinzipien entwickelt.

5.1. Das Verständnis der abstandsunabhängigen DNA-gestützten Synthese

Eine der überraschendsten Eigenschaften der DTS ist ihre Fähigkeit, effiziente Reaktionen selbst dann zu ermöglichen, wenn die hybridisierten reaktiven Gruppen durch zahlreiche eingeschobene Template-nucleotide getrennt sind (siehe Abbildung 9).^[44] Aus dieser Eigenschaft ergeben sich zwei Fragen: 1) Warum ist die Geschwindigkeit der Produktbildung für einige, aber nicht für alle DTS-Reaktionen unabhängig vom Abstand zwischen den reaktiven Gruppen und 2) warum ist eine DTS über große Entfernung überhaupt effizient, wo doch bekanntlich die Synthese von Makrocyclen (welche eine ähnliche Struktur haben wie die Produkte einer DTS über große Entfernung) große Schwierigkeiten bereitet?^[105, 106]

Unsere Gruppe wandte sich der ersten Frage mit der Untersuchung der Rolle des DNA-Rückgrats bei der Vermittlung effizienter DTS über große Entfernung zu.^[43, 44] Dazu wurden die zwischen den reaktiven Gruppen eingeschobenen Nucleotide systematisch durch Strukturanaloga ähnlicher Länge ersetzt, denen jedoch die aromatische Nucleobase, der gesamte Ribosering, die Ribose- und Phosphatgruppe oder nahezu alle Heteroatome fehlten (Abbildung 19a). In allen Fällen war die DTS über große Entfernung weiterhin effizient.^[44] Die Effizienz der DTS über große Entfernung wurde jedoch signifikant reduziert, wenn die eingeschobene Region durch Hybridisierung mit komple-

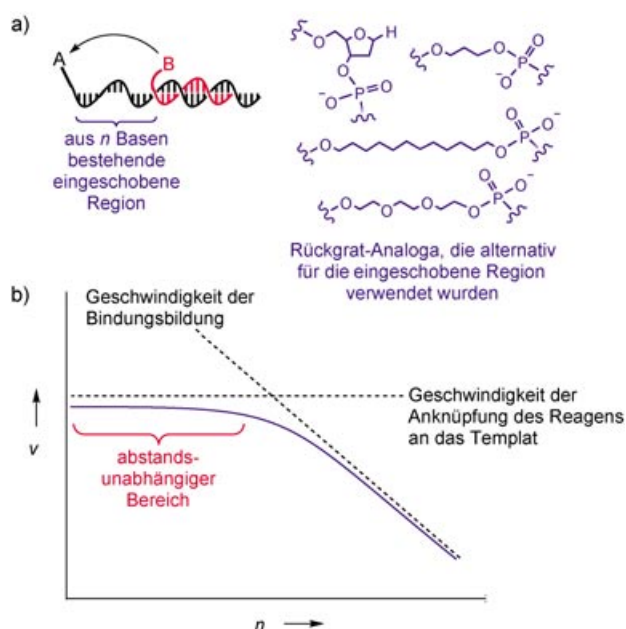


Abbildung 19. Zum Verständnis der abstandsunabhängigen DTS. a) In die eingeschobene Region in einem A+A'-Template für eine DTS über große Entfernung wurden Analoga des DNA-Rückgrats eingeführt. b) Modell der abstandsunabhängigen DTS.^[44, 47]

mentären DNA-Oligonucleotiden versteift wurde. Diese Ergebnisse zeigten, dass keine Strukturelemente, die für das DNA-Rückgrat spezifisch sind, für die Abstandsabhängigkeit erforderlich sind, wohl aber die Flexibilität der eingeschobenen Region.

Folgeuntersuchungen unserer Gruppe ergaben, dass die Produktbildung bei abstandsunabhängigen DNA-gestützten Reaktionen einer Kinetik zweiter Ordnung folgt (für jeden der beiden DNA-gebundenen Reaktanten erster Ordnung).^[43] Dieses einfache Ergebnis trug zur Klärung des Rätsels der abstandsunabhängigen DTS bei, da es besagt, dass bei diesen Reaktionen die Bindungsbildung zwischen den reaktiven Gruppen im hybridisierten Komplex (ein Prozess pseudo-erster Ordnung) nicht geschwindigkeitsbestimmend sein kann. Stattdessen legten die Ergebnisse nahe, dass die Hybridisierung der beiden DNA-gebundenen Reaktanten (ein bimolekularer Prozess) geschwindigkeitsbestimmend ist. Die Abstandsabhängigkeit tritt daher auf, wenn die effektive Molarität der hybridisierten reaktiven Gruppen ausreichend hoch ist, damit die Bindungsbildung schneller erfolgt als die DNA-Hybridisierung. Eine Zunahme der Zahl eingeschobener Nucleotide zwischen den hybridisierten reaktiven Gruppen senkt die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit in dieser Situation so lange nicht, bis sich die Geschwindigkeit der Bindungsbildung der Hybridisierungsgeschwindigkeit nähert oder darunter fällt (Abbildung 19b).

Dieses einfache kinetische Modell der abstandsunabhängigen DTS erklärt Unterschiede im Verhalten verschiedener DNA-gestützter Reaktionen wie den zunehmenden Verlust an Abstandsabhängigkeit in der folgenden Reaktionsreihe: Cu^I-vermittelte Huisgen-Cycloaddition (schnellste Bindungsbildung), Aminacylierung, Wittig-Olefinierung und 1,3-dipolare Nitron-Cycloaddition (langsamste Bindungsbildung).^[46] Eine besonders wichtige DNA-gestützte Reaktion (siehe Abschnitt 4.2) passt jedoch nicht zu diesem Modell: Die reduktive Aminierung^[34,35,43] ist stark abstandsabhängig,^[126] dennoch ist die Produktbildung schneller als nach dem Modell in Abbildung 19b zu erwarten. Die Ursachen für diese Diskrepanz sind bisher nicht verstanden, mögliche Erklärungen könnten jedoch sein, dass die Geschwindigkeit der Iminhydrolyse durch eingeschobene einzelsträngige Templatbasen erhöht wird oder dass die Iminreduktion durch eingeschobene Templatnucleotide inhibiert wird.

5.2. Die Rolle der hohen Verdünnung und des wässrigen Solvens

Wie kann die DTS über große Entfernung effizienter sein als die äquivalente nicht-DNA-gestützte (intermolekulare) Reaktion, wenn man bedenkt, dass Makrocyclisierungen generell als anspruchsvolle Synthesereaktionen gelten? Dafür gibt es zumindest zwei Erklärungen. Die erste ist die Ungleichheit der Ausgangsbedingungen bei der DTS und der konventionellen organischen Synthese. Die meisten der beschriebenen DNA-gestützten Synthesen niedermolekularer Verbindungen wurden mit Reaktantenkonzentrationen im mittleren nM-Bereich durchgeführt. Bei diesen Konzentrationen sind fast alle intermolekularen Reaktionen einschließlich der Reaktionen zwischen an fehlgepaarte DNAs gebundenen

Reaktanten vernachlässigbar. Zu diesen intermolekularen Reaktionswegen gehören auch die Dimerisierung und Oligomerisierung von Reaktanten und Produkten – bekannte Quellen unerwünschter Nebenprodukte in traditionellen Makrocyclisierungen selbst unter „verdünnten“ (typischerweise μM – mM) Bedingungen. Indem die extrem starke Verdünnung bei DTS-Reaktionen die Möglichkeit zu signifikanter Dimerisierung oder Oligomerisierung ausschließt, ohne die Bildung des erwünschten Produkts zu beeinträchtigen, trägt sie zur Realisierbarkeit der DTS selbst über große Entfernungen (pseudo-makrocyclisch) bei.

Ein weiterer entscheidender Faktor für die Effizienz der DTS über große Entfernungen ist die Verwendung wässriger Lösungsmittel, während in konventionellen Makrocyclisierungen vorwiegend nichtwässrige Lösungsmittel eingesetzt werden. Wässrige Lösungsmittel können die DTS über große Entfernungen auf mehrere Arten unterstützen. Wasser ist für viele der beschriebenen Reaktionen ein besseres Lösungsmittel, weil deren geschwindigkeitsbestimmende Übergangszustände (wie bei den allermeisten Reaktionen) meist polarer sind als die Ausgangsmaterialien. Zudem ist Wasser bekannt dafür, dass es das Volumen organischer Reaktanten minimiert, was eine Folge des Entropieverlusts ist, der von geordneten Wassermolekülen an der wässrig-organischen Phasengrenze herrührt. Diese Tendenz spiegelt sich in der ungewöhnlich hohen kohäsiven Energiedichte von Wasser wieder.^[154] Die Tendenz wässriger Lösungsmittel zur Kontraktion der Reaktantenvolumina macht Wasser besonders für Makrocyclisierungen einschließlich der DTS über große Entfernung geeignet. In Einklang mit dieser Analyse bestätigen frühere Vergleiche der Makrocyclisierungseffizienzen in Wasser und in organischen Lösungsmitteln^[105,106,154–158] die Vorteile wässriger Medien.

Beide vorgeschlagenen Einflüsse wässriger Solventien legen nahe, dass die DTS in organischen Lösungsmitteln weniger effizient und stärker abstandsabhängig sein sollte. Erste unveröffentlichte Ergebnisse unserer Gruppe bestätigen diese Annahme (C. Calderone und D. Liu). Mithilfe langkettiger Tetraalkylammoniumsalze können DNA-gebundene Reaktanten in organischen Solventien wie Dichlormethan, DMF und Methanol gelöst werden.^[159,160] Bemerkenswerterweise kann die DTS auch in organischen Lösungsmitteln sequenzspezifisch verlaufen, es scheint also irgendeine Form von Basenpaarung möglich zu sein. Doch DNA-gestützte Aminacylierungen beispielsweise, die in wässrigen Lösungsmitteln üblicherweise effizient und abstandsunabhängig sind, können in organischen Solventien weniger effizient und stärker abstandsabhängig verlaufen.

Auch wenn in mancher Hinsicht wässrige Solventien eine Einschränkung bedeuten, weil sie beispielsweise die Verwendung von stark basischen oder aziden Reaktanten verhindern, zeigt die obige Analyse, dass Wasser eine Schlüsselrolle bei der DTS spielt. In der konventionellen organischen Synthese kann Wasser oft nicht als Lösungsmittel verwendet werden, weil die organischen Reaktanten in ihm nicht löslich sind. Dagegen unterliegen die DNA-gebundenen Reaktanten der DTS wegen ihrer Bindung an Oligonucleotide und ihrer Konzentration im nM-Bereich keinen Einschränkungen durch die Löslichkeit in Wasser.

5.3. Die Erforschung Templat-induzierter Effekte anhand der Stereoselektivität bei DNA-gestützten Synthesen

Die DTS ist am universellsten einsetzbar, wenn die Oligonucleotide die effektiven Molaritäten modulieren, den Reaktionsausgang aber nicht stören. Eine DNA-induzierte Stereoselektivität bei der DTS ist daher ein empfindlicher Test für Templat-induzierte Effekte jenseits der Steigerung effektiver Molaritäten. Zudem dient die stereoselektive DTS als Modell dafür, inwieweit die Chiralität eines Informationsträgers zusätzlich zu seiner Sequenz auf das Produkt übertragen werden kann. Die stereoselektive DTS könnte theoretisch auch zur Beeinflussung der Verteilung stereoisomerer Produkte zugunsten erwünschter Stereoisomere verwendet werden, auch wenn die Vorhersage und die Bestimmung von Drehsinn und Größe der Stereoinduktion auf der winzigen molekularbiologischen Skala der DTS-Reaktionen eine enorme Herausforderung ist.

Die ersten Studien zur Stereoselektivität in Nucleinsäure-gestützten Synthesen wurden mit Systemen durchgeführt, die Nucleinsäureanaloge erzeugten. Joyce, Orgel et al. zeigten 1984, dass die Poly(C_n)-gestützte Oligomerisierung von D-Guanosin-5'-phospho-2-methylimidazol (D-2-MeImpG) zur Herstellung von Oligo(G) sehr stark durch das enantiomere Monomer L-2-MeImpG inhibiert wird.^[161] Interessanterweise wird L-2-MeImpG in der Poly(C_n)-gestützten Synthese effizient gekuppelt, aber am resultierenden Produkt ist eine weitere Kettenverlängerung nicht möglich. Diese Befunde zeigten, dass für Modelle der präbiotischen Translation die Minimierung der Inhibition durch enantiomere Monomere von zentraler Bedeutung ist. Enantiomere Kreuzinhibition wurde auch bei der PNA-gestützten RNA-Oligomerisierung beobachtet.^[162]

Bolli, Micura und Eschenmoser belegten mit der Synthese nichtnatürlicher Nucleinsäureanaloge, dass Stereoselektivität in Nucleinsäure-gestützten Synthesen nicht auf RNA-Synthesen beschränkt ist.^[25] So verläuft die D-Pyranosyl-RNA-gestützte Oligomerisierung komplementärer Pyranosyl-RNA-Tetramere diastereoselektiv, wobei die Kupplung von D-Tetrameren gegenüber der von Tetrameren mit gemischter Pyranosechiralität vorherrscht.^[25] Kozlov, Orgel und Nielsen zeigten in einer eleganten stereoselektiven DTS, dass die Erweiterung eines achiralen PNA-Templats um lediglich zwei D-DNA-Nucleotide zur bevorzugten enantioselectiven Templat-gestützten Kupplung von D-DNA-Dinucleotiden in der A+B+A'B'-Architektur führt (Abbildung 20).^[146] Diese Enantioselectivität ist umso erstaunlicher, als die Bindungsbildung weit entfernt von den induzierenden chiralen Gruppen und auf einem anderen Molekül erfolgt.

Wir untersuchten kürzlich die Stereoselektivität in der DTS von Produkten, die nicht mit dem DNA-Rückgrat verwandt sind, und stellten dabei fest, dass die Chiralität des DNA-Templats in DNA-gestützten Thiolsubstitutionen eine mäßige Stereoselektivität induziert (Abbildung 21 a).^[48] Die beobachtete Stereoselektivität war überraschend wenig von der Templatarchitektur abhängig; das (S)-Substrat reagierte sowohl in Haarnadel(A+BB'A')- wie in A+A'-Architekturen mit weit entfernten reaktiven Gruppen bevorzugt. Sobald jedoch flexible achirale Linker (drei oder mehr CH_2 - oder O-

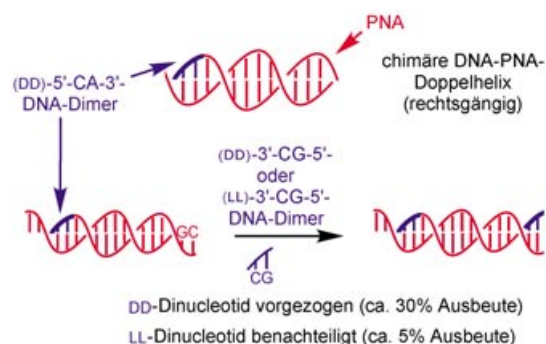


Abbildung 20. Die Chiralität eines terminal eingebauten DNA-Dinucleotids (blau) in einem PNA-Templat beeinflusst die Stereoselektivität einer entfernt stattfindenden PNA-gestützten PNA-DNA-Kupplung. Dabei ist das (DD)-3'-CG-5'-DNA-Dinucleotid das gegenüber dem (LL)-3'-CG-5'-Dimer bevorzugte Substrat.^[146]

Gruppen) zwischen die reaktiven Gruppen und die DNA-Oligonucleotide eingefügt wurden, ging die Stereoselektivität verloren (Abbildung 21 b).^[48] Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass selbst kurze flexible Linker einen über die Modulation der effektiven Molarität von Reaktanten hinausgehenden Einfluss des Templats verhindern können, was die Verwendung solcher Linker nahelegt, wenn die DTS in ihrer allgemeinsten Form durchgeführt werden soll.

Die in Substitutionsreaktionen mit niedermolekularen Verbindungen beobachtete Stereoselektivität wurde auf die makromolekulare helicale Konformation des einzel- oder doppelsträngigen Templats zurückgeführt und nicht auf die Chiralität irgendeiner bestimmten Nucleotidgruppe.^[48] Die Beobachtung, dass die Stereoselektivität invertiert wird, wenn die Konformation der Templat-Haarnadel-DNA von einer rechtsgängigen B-DNA zur linksgängigen Z-DNA verändert wird, stützt diese Hypothese (Abbildung 21 c). Damit wird auch verständlich, dass die Chiralität des Informationsträgers auf nicht mit der Templatstruktur verwandte Produkte übertragen werden kann.

6. Anwendungen der DNA-gestützten Synthese

Die DTS verbindet drei sehr wichtige Komponenten chemischer und biologischer Systeme: Nucleinsäuresequenzen, synthetische Produkte und Reaktionen. Diese Verknüpfung ermöglicht es im Prinzip, jede Mischung aus einer der drei Komponenten nach einer erwünschten Lösung zu durchsuchen, während die anderen beiden Komponenten definiert bleiben. Dieser konzeptionelle Rahmen legt drei Typen von entdeckungsorientierten Anwendungen für die DTS nahe: 1) Detektion von Nucleinsäuresequenzen für die DTS eines bestimmten Produkts, 2) Identifizierung von DNA-gestützten synthetischen Produkten mit erwünschten Eigenschaften, die mithilfe der DTS erhalten werden, und 3) Entdeckung DNA-gestützter chemischer Reaktionsschemata, mit denen Templatsequenzen in Produkte überführt werden können. Erste Studien haben dazu beigetragen, das Potenzial von DTS-basierten Ansätzen für diese sich abzeichnenden Anwendungen zu erkennen, und werden in den folgenden Abschnitten

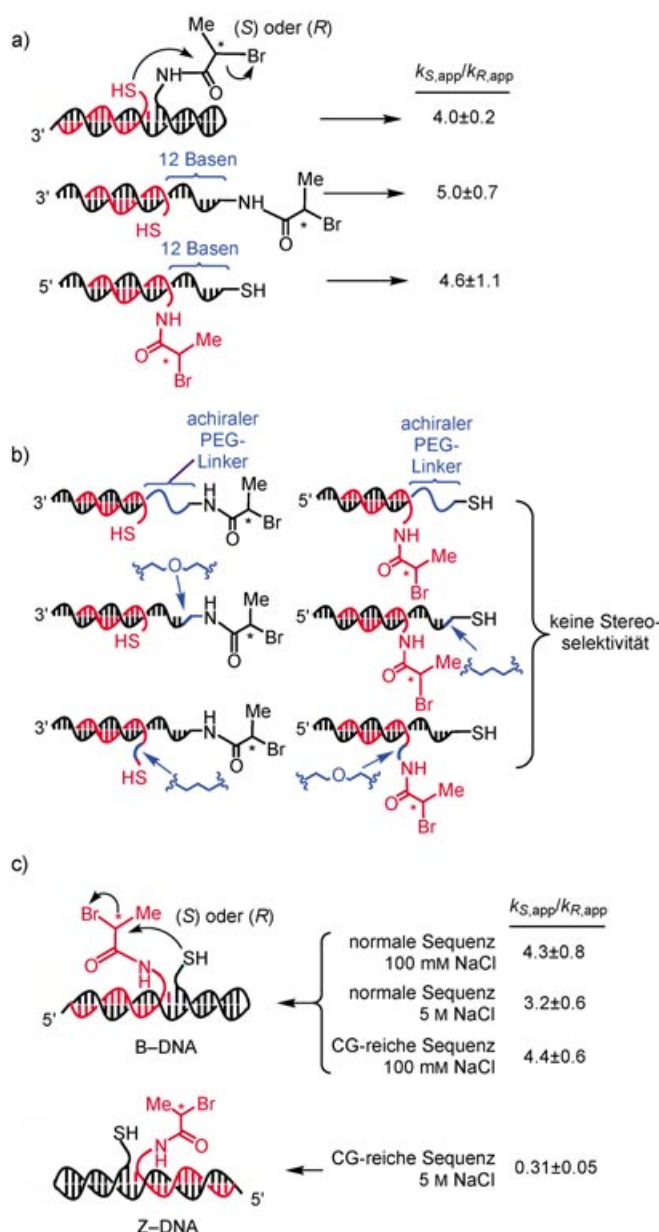


Abbildung 21. a) Stereoselektive DNA-gestützte Substitutionsreaktionen. b) Flexible achirale Linker verhindern Stereoselektivität bei DNA-gestützten Substitutionsreaktionen. c) Stereoselektivitäten werden invertiert, wenn die DNA von der B-Form (rechtsgängig) in die Z-Form (linksgängig) übergeht.^[48] k_{app} : scheinbare Reaktionsgeschwindigkeitskonstante.

vorgestellt (die Anmerkung bei der Korrektur befasst sich mit der Anwendung der DTS auf die Entdeckung von Reaktionen).

6.1. Nucleinsäuredetektion

Die Sequenzspezifität der DTS führt dazu, dass sich die Produkte ausschließlich in Gegenwart der komplementären Template bilden. Wenn die DNA-gestützten Reaktionen und die Produktstrukturen so gewählt werden, dass sie den Nachweis von DTS-Ereignissen erleichtern, können die re-

sultierenden Systeme für die Detektion spezifischer Nucleinsäuresequenzen verwendet werden.

Ma und Taylor beschrieben eine der ersten Anwendungen der DTS zur Detektion von Nucleinsäuren (siehe Abbildung 8a).^[49] DNA-Template brachten DNA-gebundene Imidazole und DNA-gebundene *p*-Nitrophenylester zusammen und induzierten die Imidazol-katalysierte Esterspaltung. Eine einfache Michaelis-Menten-Kinetik mit einem k_{kat} von 0.018 min^{-1} wurde beobachtet, wenn die estergebundenen Oligonucleotide ausreichend kurz waren, um die Dissoziation vom Templat nach der Hydrolyse zu ermöglichen. Die Autoren propagierten, dass dieses System zur sequenzspezifischen Freisetzung von niedermolekularen Pharmazeutika genutzt werden könnte, auch wenn die gezielte Lokalisierung DNA-gebundener Reagentien in einem lebenden Organismus eine große Herausforderung ist. Auch die Adaption dieser Strategie zur Freisetzung leicht detektierbarer Chromophore oder Fluorophore zur Detektion von DNA- oder RNA-Analyten ist vorstellbar.

Mattes und Seitz verwendeten die DNA-gestützte Aminacylierung zur Ligation zweier octamerer PNA-Reagentien für die DNA-Detektion.^[50] Die Bildung gekuppelter PNA-Produkte, und damit die Anwesenheit komplementärer Templatesequenzen, wurde durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie belegt. Durch Verwendung von PNA-Reagens-Sequenzen und -Längen, die zu unterscheidbaren Produktmassen führten, konnten drei Templatesequenzen simultan und unabhängig detektiert werden. Eine Steigerung der Sensitivität und der Zahl der simultan detektierbaren Template könnte letztlich die effiziente Detektion von DNA-Einzelnucleotidpolymorphismen (SNPs) mittels dieses Ansatzes ermöglichen.

Kool et al. verwendeten DNA-gestützte Substitutionsreaktionen zwischen 3'-Phosphorothioaten und 5'-elektrophilen Gruppen in zwei verschiedenen Ansätzen zur Nucleinsäuredetektion.^[27–30] Im ersten Ansatz^[28,29] binden DNA- oder RNA-gestützte S_N2 -Reaktionen Donor- und Acceptorfluorophore für resonanten Fluoreszenzenergietransfer (FRET) kovalent an dasselbe Oligonucleotidprodukt (Abbildung 22a). Die resultierende räumliche Nähe von FRET-Donor- und Acceptorfluorophoren hat ein deutliches Signal zur Folge. Dieses Verfahren wurde zur sequenzspezifischen

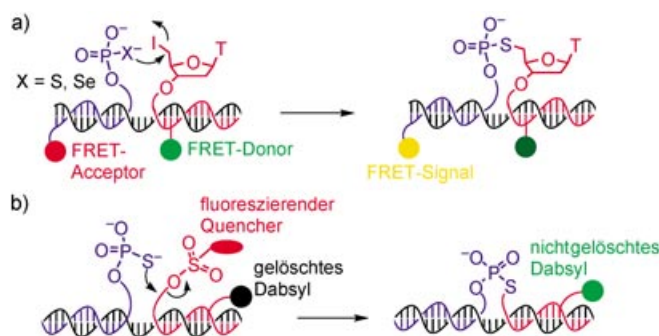


Abbildung 22. Nucleinsäuredetektion mittels DTS. a) Eine DNA- oder RNA-gestützte Substitutionsreaktion erzwingt die räumliche Nähe zweier Fluorophore, was zu einem detektierbaren FRET-Signal führt. b) RNA-gestützte Ligationsreaktionen können die Fluoreszenz einer gebundenen Dabsyl-Gruppe ermöglichen.^[27–30]

Unterscheidung von Mischungen komplementärer (passender) und nichtpassender RNA- und DNA-Template verwendet. Im zweiten Verfahren^[30] verwendeten Sando und Kool die DTS zur Induktion des Verlusts eines Fluoreszenzquenchers von einer Fluorescein-gebundenen Oligonucleotidsonde mit einer Dabsyl-Abgangsgruppe (Abbildung 22b). Mit Hilfe dieser Reagentien wurde die Anwesenheit komplementärer rRNA in fixierten Zellen anhand des Auftretens von Fluoreszenz detektiert.^[30]

DTS-gestützte Strategien für die Nucleinsäuredetektion sind gegenüber den bekannten Enzym-gestützten Verfahren attraktiv,^[51–60] da das Detektionssignal durch die vom Forscher gewählte Chemie festgelegt wird und nicht durch den engen Rahmen enzymvermittelter Ligations- und Polymerisationsreaktionen. Tatsächlich haben bereits die in den wenigen frühen, oben beschriebenen Beispielen erzeugten Strukturen die Vielfalt der Signale, die aus der Nucleinsäuredetektion entstehen, signifikant erweitert. Bevor jedoch die DTS-gestützte Nucleinsäuredetektion allgemein verwendet werden wird, sind Fortschritte bei der Empfindlichkeit oder den Umsatzzahlen sowie die ausgiebigere Verwendung der DTS-immanenten Eignung zur Parallelisierung notwendig.

6.2. Synthetische Evolution von nieder- und hochmolekularen Verbindungen

Die Entdeckung synthetischer nieder- und hochmolekularer Verbindungen mit erwünschten Eigenschaften ist eine fortwährende und weit verbreitete Herausforderung in der Chemie. Chemiker begegnen dieser Herausforderung gewöhnlich mit der Synthese von Kandidatenstrukturen oder ihrer Isolierung aus natürlichen Quellen und der anschließenden Evaluierung (dem Screening) der Kandidaten nach den „richtigen“ Verbindungen (Abbildung 23). Die Natur dagegen nutzt zur Entdeckung funktioneller biologischer Moleküle^[163–169] 1) die Translation von Nucleinsäuren in Proteine unter Beibehaltung der Assoziation, 2) die Selektion

von Proteinen (und den an sie assoziierten codierenden Nucleinsäuren) mit vorteilhaften Eigenschaften und 3) die Amplifikation und gelegentlich Diversifizierung der Nucleinsäuren, die für funktionelle, aus der Selektion hervorgegangene Proteine codieren (Abbildung 23). Gegenüber dem Ansatz der Chemiker liegen die Vorteile des evolutionären Verfahrens der Natur in der Empfindlichkeit, der Effizienz und dem Durchsatz, die ohne die aufwändigen infrastrukturellen Voraussetzungen erreichbar sind, die mit der konventionellen Synthese von Bibliotheken, der räumlichen Trennung und dem Screening verbunden sind.^[82, 153, 170–172]

Der evolutionsbasierte Entdeckungsansatz der Natur kann nur auf Moleküle angewendet werden, die von amplifizierbaren Informationsträgern translatiert werden können. Ribosomen und Polymerasen erfüllen diese Bedingung für Proteine, Nucleinsäuren und deren enge Analoga, aber sie können keine allgemeinen synthetischen Strukturen erzeugen. Basierend auf den oben beschriebenen Eigenschaften der DTS stellten wir die Hypothese auf, dass die DTS für die sequenzspezifische Translation von Bibliotheken von DNA-Template in die korrespondierenden Bibliotheken synthetischer nieder- und hochmolekularer Verbindungen genutzt werden könnte,^[44] womit die größte Herausforderung in der Evolution synthetischer Moleküle angegangen würde.

DTS-Produkte bleiben kovalent mit dem codierenden Template verbunden, wenn Architekturen wie A+A' oder A+BB'A' (Haarnadel) verwendet werden, was der für die Proteinevolution benötigten Assoziation zwischen Nucleinsäuren und ihren codierten Proteinen entspricht. Die DTS ist jedoch nicht wie die natürliche Translation auf Strukturen begrenzt, die zur biologischen Maschinerie kompatibel sind. Ein Schema für die Evolution synthetischer niedermolekularer Verbindungen, das unsere Gruppe 2001 vorstellte,^[44] ist in Abbildung 24 gezeigt. Wir schlugen eine mehrstufige DTS als Mittel zur Translation einer Bibliothek von DNA-Template in die korrespondierenden komplexen synthetischen niedermolekularen Verbindungen vor. Die resultierende Template-gebundene Bibliothek könnte danach in einer In-vitro-Selektion

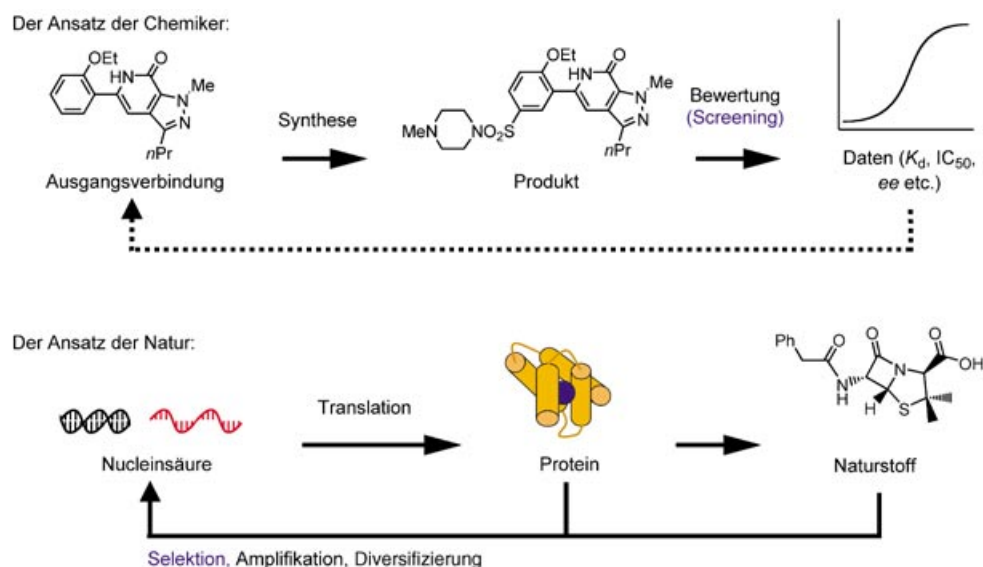


Abbildung 23. Zwei Ansätze zur Entdeckung funktioneller Moleküle.

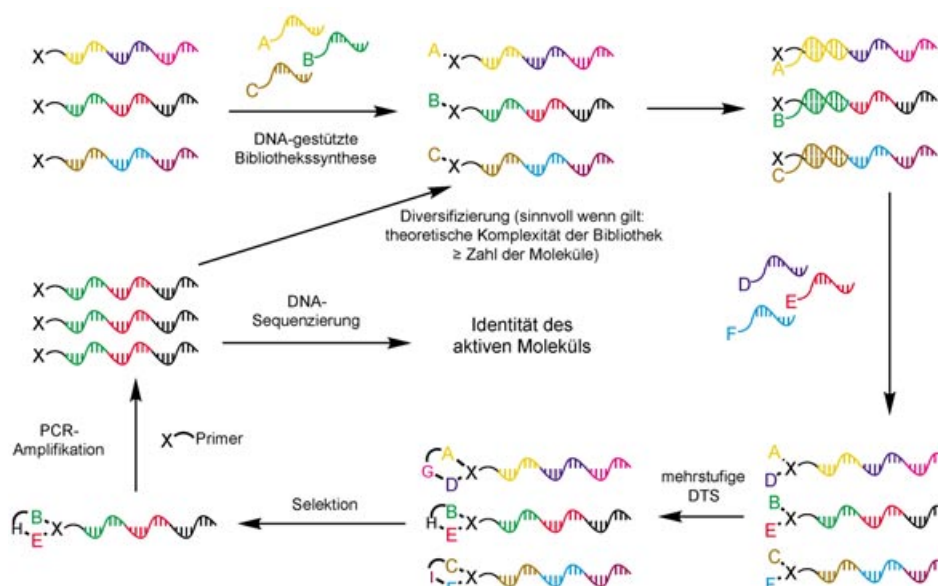


Abbildung 24. Allgemeines Schema für den Aufbau und die Evolution von Bibliotheken synthetischer Moleküle mittels DNA-gestützter Bibliothekssynthese, In-vitro-Selektion, PCR-Amplifikation und DNA-Sequenzdiversifizierung.^[44]

tion auf erwünschte Eigenschaften untersucht werden. Die Template, die an selektierte Verbindungen der Bibliothek gebunden sind und für diese codieren, könnten mittels PCR amplifiziert und entweder zur Identifikation der erwünschten Verbindung sequenziert oder diversifiziert und weiteren Zyklen der DTS (Translation), Selektion und Amplifikation unterzogen werden.

Das Schema in Abbildung 24 setzt voraus, dass die DTS bei Verwendung im Bibliotheksformat ihre Effizienz und Sequenzspezifität aus dem Einzeltemplat-Format beibehält. Um die Sequenzspezifität der DTS im Bibliotheksformat zu untersuchen, kombinierten wir eine Bibliothek von 1025 Maleimid-gebundenen DNA-Templaten mit 1025 komplementären Thiol-gebundenen Reagentien in einer einzigen Lösung (Abbildung 25).^[44] Die Template, die mit einem der 1025 Thiolreagentien reagierten (dem einzigen biotinylierten Thiolreagens), wurden durch In-vitro-Selektion isoliert, per PCR amplifiziert und durch Restriktionsverdau und DNA-Sequenzierung charakterisiert. Das hauptsächlich nachgewiesene Templat war das zu dem biotinylierten Thiolreagens komplementäre.^[44] Diese Ergebnisse deuten an, dass die DTS im Bibliotheksformat ausreichend sequenzspezifisch sein kann, um die Reaktion der Template mit sequenzprogrammierten Reagentien auch in Gegenwart eines großen molaren Überschusses an nichtpassenden, nichtkomplementären Reagentien zu ermöglichen.

Der Ansatz in Abbildung 24 verlangt auch die Selektion von DNA-gebundenen synthetischen Molekülen mit erwünschten Eigenschaften. Unsere Gruppe entwickelte hochempfindliche und effektive In-vitro-Selektionen für DNA-gebundene synthetische Moleküle mit Protein-Bindungsaffinitäten oder -spezifitäten.^[82] Bereits 10^{-20} mol DNA-gebundener Protein bindender niedermolekularer Verbindungen konnten durch Affinitätsselektion gegen sechs verschiedene Proteine angereichert und identifiziert werden. Durch Wiederholung dieser Selektionen konnten kleinste Mengen eines

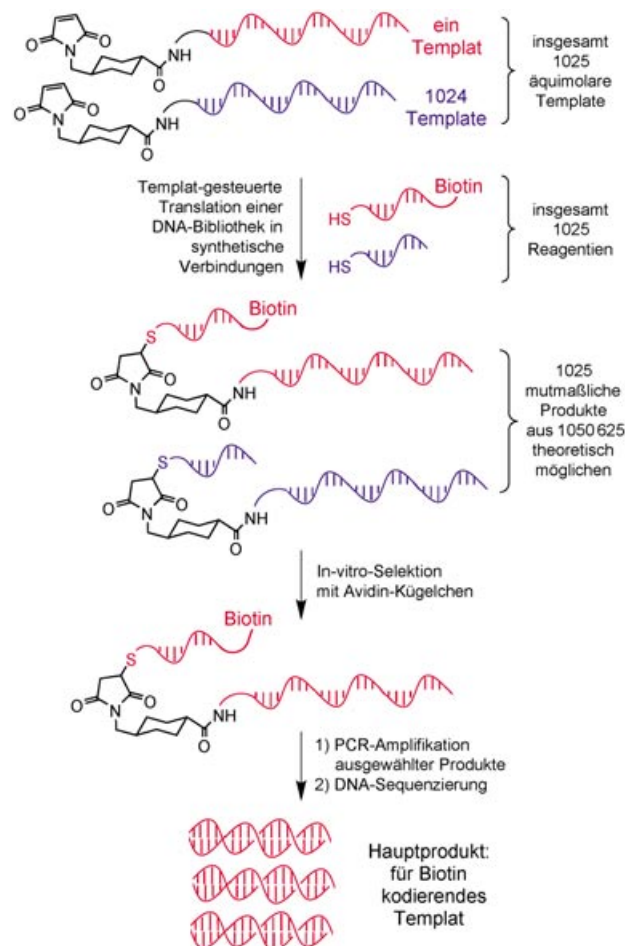


Abbildung 25. Eine DNA-gestützte Synthese im Bibliotheksformat, die Selektion der Bibliothek auf Proteinbindung und die PCR-Amplifikation.^[44]

DNA-gebundenen Proteinliganden aus einer Mischung mit einem 10^6 -fachen Überschuss an DNA-gebundenen nichtbindenden Kontrollmolekülen angereichert werden.^[82]

Unsere Gruppe führte kürzlich die Generalität der DTS, ihre Sequenzspezifität, Abstandsunabhängigkeit und Eignung für mehrstufige Synthesen in der Translation einer Bibliothek von DNA-Templaten in eine Bibliothek von korrespondierenden komplexen synthetischen niedermolekularen Verbindungen zusammen.^[81] Drei aufeinander folgende DNA-gestützte Reaktionen, die jeweils von einer zwölf Basen umfassenden Region auf dem DNA-Templat codiert wurden, und eine nachfolgende effiziente wässrige Wittig-Makrocyclisierung wurden genutzt, um makrocyclische, an ihre codierenden DNA-Templates gebundene Fumaramide zu erzeugen. Eine Pilotbibliothek aus 65 makrocyclischen Fumaramiden wurde auf diese Weise sequenzspezifisch aus einer einzigen Lösung von 65 DNA-Templaten erhalten. Die Möglichkeit, DNA-gestützte Bibliotheken synthetischer niedermolekularer Verbindungen nach Eigenschaften wie der Protein-Bindungsaffinität zu selektieren, wurde anhand einer In-vitro-Selektion dieser Pilotbibliothek aus 65 makrocyclischen Fumaramiden etabliert. Zwei Selektionsrunden für Carboanhydrase-Affinität^[82] (ohne Rücktranslation zwischen den Runden) reicherten ein einziges der 65 Elemente der Bibliothek an. Die Charakterisierung der Sequenz des PCR-amplifizierten Templats aus dieser Selektion ergab, dass das selektierte makrocyclische Fumaramid als einziges eine Phenylsulfonamid-Gruppe enthielt, die bekanntermaßen eine Affinität zur Carboanhydrase verleiht (Abbildung 26).^[81] Insgesamt belegen die hier vorgestellten Resultate, dass die DTS im Bibliotheksformat zusammen mit der In-vitro-Selektion die Translation, Selektion und Amplifikation von DNA-Sequenzen ermöglicht, die nicht für biologische Makromoleküle, sondern für synthetische kleine Moleküle codieren.

In ähnlicher Weise lassen jüngste Erfolge bei der sequenzspezifischen Translation von DNA-Templaten in synthetische Polymere selbst bei Anwesenheit zahlreicher Monomere anderer Sequenz (siehe Abbildung 18, Ab-

schnitt 4)^[152] darauf schließen, dass es möglich werden könnte, sequenzdefinierte synthetische Heteropolymere in einem analogen Prozess zu erhalten. Verglichen mit den beschriebenen Methoden zur Entdeckung von niedermolekularen Verbindungen hat die DTS-getriebene Entdeckung synthetischer Polymere zusätzlich den Reiz, dass die theoretische Komplexität von Heteropolymeren selbst relativ moderater Länge leicht die Gesamtzahl aller Moleküle in einer typischen Bibliothek im pmol-Maßstab (10^{12} Moleküle) übersteigt. Dieser enorme Sequenzraum lässt sich prinzipiell in effizienter Weise durch den echten evolutionären Prozess erforschen, dem iterative Zyklen aus DTS-basierten Translationen, Selektionen der erwünschten Binde- oder Katalyseeigenschaften, Templat-Amplifikationen mittels PCR und Templat-Diversifizierungen durch Mutagenese oder Rekombination entsprechen. Auf diese Weise sind jedoch nur synthetische Heteropolymere zugänglich, die aus Monomeren bestehen, die entweder sequenzspezifisch an das DNA-Templat hybridisieren oder die sich von Adapter-Molekülen, die an die DNA hybridisieren (analog zu natürlichen tRNAs), abspalten lassen.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Die DNA-gestützte Synthese hat sich in den vergangenen 40 Jahren enorm entwickelt. Sie wurde zunächst als Modellsystem für präbiotische Selbstreplikation durch Phosphodiesterbildung untersucht. Die kürzlich entdeckte Eignung der DTS, Produkte sequenzspezifisch zu erzeugen, die nicht mit dem Phosphoriboserückgrat verwandt sind,^[43–48] und sequenzprogrammierte Synthesen zwischen Gruppen zu vermitteln, die auf DNA-Templaten weit von einander getrennt sind,^[47,102] hat die DTS als eine allgemeine Methode für die Steuerung der Reaktivität synthetischer Moleküle durch modulierte effektive Molaritäten etabliert. Diese Entdeckungen haben auch zu neuen Entwicklungen geführt, die die Möglichkeiten der DTS schnell erweiterten: z.B. die mehr-

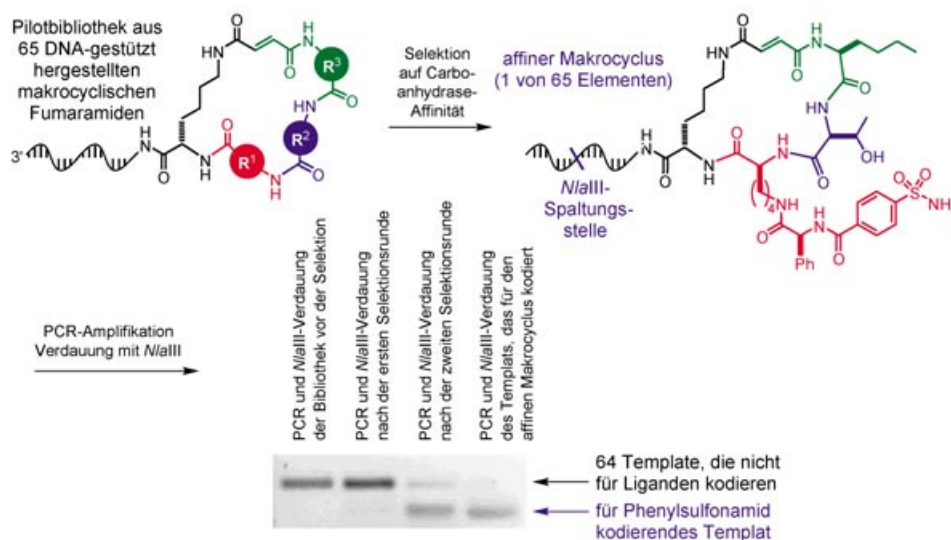


Abbildung 26. In-vitro-Selektion eines Carboanhydrase-Liganden aus einer mithilfe der DTS synthetisierten Bibliothek aus 65 makrocyclischen Fumaramiden.^[81]

stufige DNA-gestützte Synthese niedermolekularer Verbindungen, neue Templataarchitekturen, Synthesesteuerung durch doppelsträngige DNA, effiziente und sequenzspezifische DNA-gestützte Polymerisation und DNA-gestützte Synthese von Bibliotheken.

Die Steuerung von Reaktivität mithilfe der DNA-programmierten effektiven Molarität anstelle konventioneller intermolekularer Reaktionen ermöglicht die Manipulation synthetischer Moleküle in einer Weise, die bislang nur für die Substrate natürlicher makromolekularer Template verfügbar war. So können normalerweise inkompatible Reaktionen in einer einzigen Lösung durchgeführt werden. Auch einige Reaktionen, die mit konventionellen Synthesemethoden kaum möglich sind, z.B. Heterokupplungen zwischen Substraten, die bevorzugt Homokupplungen eingehen, gelingen mit einem DNA-gestützten Format (siehe *Anmerkung bei der Korrektur*). Wir erwarten, dass die DTS künftig geordnete mehrstufige Synthesen in einer einzigen Lösung zwischen Reaktanten ermöglichen wird, die normalerweise nichtsteuerbare Produktmischungen liefern. Diese einzigartigen Möglichkeiten der Reaktivitätssteuerung mithilfe der effektiven Molarität könnten die Zugänglichkeit und strukturelle Vielfalt von Bibliotheken synthetischer nieder- und hochmolekularer Verbindungen über das mit derzeitigen Methoden zugängliche Maß hinaus erweitern.

Die Fähigkeit der DTS, amplifizierbare Information in synthetische Strukturen zu übersetzen, hat auch zu fundamental neuen Denkansätzen für weit verbreitete Herausforderungen geführt, mit denen Chemiker konfrontiert sind. Diese Herausforderungen, wie die Nucleinsäuredetektion, die Entdeckung synthetischer nieder- und hochmolekularer Verbindungen und die Entdeckung neuartiger Reaktionen, können nun prinzipiell mithilfe wirkungsvoller Strategien aus Translation, Selektion, Amplifikation und Diversifizierung angegangen werden, die bislang nur für biologische Makromoleküle verfügbar waren.

Bis die in dieser Übersicht vorgestellte Vision vollständig realisiert ist, müssen jedoch noch einige Ziele erreicht werden. Dazu gehören 1) die kontinuierliche Weiterentwicklung der Anwendungsbreite und synthetischen Möglichkeiten der DTS über die wenigen beschriebenen synthetisch-organischen Reaktionen hinaus, 2) die kontinuierliche Entwicklung und Anwendung neuer Modi der Steuerung von Reaktivität durch die DTS, die mit konventionellen Synthesemethoden nicht erreicht werden können, 3) die Entdeckung weiterer Reaktionen, die im DTS-Format effizient ablaufen und bislang unbekannt sind oder Templat-frei nicht ablaufen, und 4) die Entdeckung funktioneller synthetischer nieder- und hochmolekularer Verbindungen, die schwer oder gar nicht auf anderen Wegen zugänglich sind. Leslie Orgel sagte 1995 voraus, dass die Entwicklung chemischer Systeme, die die fundamentalen und wirkungsvollen Eigenschaften biologischer Moleküle nutzen, „will require a combination of the techniques of organic chemistry ... and the methods of molecular biology.“^[1] Weniger als ein Jahrzehnt später hat die DNA-gestützte Synthese diese Voraussage in ein fruchtbares Feld für die Organische Chemie verwandelt.

Anmerkung bei der Korrektur (16. August 2004): Die dritte in Abschnitt 6 für die DTS vorgeschlagene Anwen-

dung, die Entdeckung von Reaktionen, wurde inzwischen realisiert; siehe: „Reaction Discovery Enabled by DNA-Templated Synthesis and In Vitro Selection“: M. W. Kanan, M. M. Rozenman, K. Sakurai, T. M. Snyder, D. R. Liu, *Nature* **2004**, im Druck.

8. Abkürzungen

ANA	Altritolnucleinsäure
CDI	1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid
DMT-MM	4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholiniumchlorid
Dabsyl	5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl
DTS	DNA-gestützte Synthese
EDC	3-(3-Dimethylaminopropyl)-1-ethylcarbodiimid
FRET	resonanter Fluoreszenzenergietransfer
HNA	Hexitnucleinsäure
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laserdesorptions/ionisations-Massenspektrometrie mit Flugzeitdetektion (matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight)
PCR	Polymerasekettenreaktion
Sulfo-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid, Natriumsalz
TNA	Threosenucleinsäure

Wir danken Matt Kanan, Jeff Doyon, Allen Buskirk, Zev Gartner, Prof. Stuart Schreiber und Prof. Matthew Shair für hilfreiche Diskussionen. X.L. wird unterstützt durch die National Institutes of Health (NIH/NIGMS, R01 GM065865) und das Office of Naval Research (N00014-03-1-0749).

Eingegangen am 13. Februar 2004 [A656]

Übersetzt von Dr. Ralf Petri, Köln

- [1] L. E. Orgel, *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 109.
- [2] G. Ertem, J. P. Ferris, *Nature* **1996**, 379, 238.
- [3] L. E. Orgel, *Nature* **1992**, 358, 203.
- [4] J. P. Ferris, R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1968**, 33, 693.
- [5] M. P. Robertson, S. L. Miller, *Nature* **1995**, 375, 772.
- [6] R. Lohrmann, L. E. Orgel, *Science* **1968**, 161, 64.
- [7] W. D. Fuller, R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1972**, 67, 25.
- [8] G. Arrhenius, J. L. Bada, G. F. Joyce, A. Lazcano, S. Miller, L. E. Orgel, *Science* **1999**, 283, 792.
- [9] G. F. Joyce, *Nature* **2002**, 418, 214.
- [10] G. F. Joyce, *Nature* **1989**, 338, 217.
- [11] W. Gilbert, *Nature* **1986**, 319, 618.
- [12] J. P. Ferris, G. Ertem, *Science* **1992**, 257, 1387.
- [13] R. Naylor, P. T. Gilham, *Biochemistry* **1966**, 5, 2722.
- [14] A. Luther, R. Brandsch, G. von Kiedrowski, *Nature* **1998**, 396, 245.
- [15] T. Li, K. C. Nicolaou, *Nature* **1994**, 369, 218.
- [16] T. Inoue, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 7666.
- [17] T. Inoue, L. E. Orgel, *Science* **1983**, 219, 859.
- [18] T. Inoue, G. F. Joyce, K. Grzeskowiak, L. E. Orgel, J. M. Brown, C. B. Reese, *J. Mol. Biol.* **1984**, 178, 669.
- [19] W. S. Zielinski, L. E. Orgel, *Nature* **1987**, 327, 346.

- [20] W. S. Zielinski, L. E. Orgel, *J. Mol. Evol.* **1989**, 29, 281.
- [21] H. Rembold, L. E. Orgel, *J. Mol. Evol.* **1994**, 38, 205.
- [22] L. Rodriguez, L. E. Orgel, *J. Mol. Evol.* **1991**, 33, 477.
- [23] C. B. Chen, T. Inoue, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1985**, 181, 271.
- [24] C. Bohler, P. E. Nielsen, L. E. Orgel, *Nature* **1995**, 376, 578.
- [25] M. Bolli, R. Micura, A. Eschenmoser, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 309.
- [26] M. K. Herrlein, J. S. Nelson, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 10151.
- [27] Y. Xu, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 9040.
- [28] Y. Xu, N. B. Karalkar, E. T. Kool, *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 148.
- [29] Y. Xu, E. T. Kool, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 875.
- [30] S. Sando, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9686.
- [31] Z.-Y. J. Zhan, J. Ye, X. Li, D. G. Lynn, *Curr. Org. Chem.* **2001**, 5, 885.
- [32] Z.-Y. J. Zhan, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 12420.
- [33] P. Luo, J. C. Leitzel, Z.-Y. J. Zhan, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 3019.
- [34] X. Li, Z.-Y. J. Zhan, R. Knipe, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 746.
- [35] X. Li, D. G. Lynn, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 4749; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 4567.
- [36] Y. Gat, D. G. Lynn, *Biopolymers* **1998**, 48, 19.
- [37] Y. Gat, D. G. Lynn in *Templated Organic Synthesis* (Hrsg.: P. J. Stang, F. Diederich), Wiley-VCH, Weinheim, **1999**, S. 133.
- [38] J. T. Goodwin, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9197.
- [39] J. C. Leitzel, D. G. Lynn, *Chem. Rec.* **2001**, 1, 53.
- [40] Y. Xu, E. T. Kool, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 5595.
- [41] Y. Xu, E. T. Kool, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 3159.
- [42] D. Summerer, A. Marx, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 93; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 89.
- [43] Z. J. Gartner, M. W. Kanan, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1847; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1796.
- [44] Z. J. Gartner, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6961.
- [45] J. L. Czlapinski, T. L. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 8618.
- [46] Z. J. Gartner, R. Grubina, C. T. Calderone, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 1408; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 1370.
- [47] Z. J. Gartner, M. W. Kanan, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 10304.
- [48] X. Li, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 10188.
- [49] Z. Ma, J. S. Taylor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 11159.
- [50] A. Mattes, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 3277; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3178.
- [51] U. Landegren, R. Kaiser, J. Sanders, L. Hood, *Science* **1988**, 241, 1077.
- [52] K. J. Barringer, L. Orgel, G. Wahl, T. R. Gingeras, *Gene* **1990**, 89, 117.
- [53] D. Y. Wu, R. B. Wallace, *Genomics* **1989**, 4, 560.
- [54] D. A. Nickerson, R. Kaiser, S. Lappin, J. Stewart, L. Hood, U. Landegren, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 8923.
- [55] F. Barany, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 189.
- [56] M. Samiotaki, M. Kwiatkowski, J. Parik, U. Landegren, *Genomics* **1994**, 20, 238.
- [57] J. Luo, D. E. Bergstrom, F. Barany, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 3071.
- [58] R. Favis, J. P. Day, N. P. Gerry, C. Phelan, S. Narod, F. Barany, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 561.
- [59] M. Nilsson, G. Barbany, D. O. Antson, K. Gertow, U. Landegren, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 791.
- [60] C. E. Pritchard, E. M. Southern, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 3403.
- [61] A. De Mesmaeker, R. Haner, P. Martin, H. E. Moser, *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 366.
- [62] D. G. Knorre, V. V. Vlassov, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1985**, 25, 291.
- [63] A. S. Boutorine, C. Boiziau, T. Le Doan, J. J. Toulme, C. Helene, *Biochimie* **1992**, 74, 485.
- [64] A. S. Levina, M. V. Berezovskii, A. G. Venjaminova, M. I. Dobrikov, M. N. Repkova, V. F. Zarytova, *Biochimie* **1993**, 75, 25.
- [65] J. F. Ortigao, A. Ruck, K. C. Gupta, R. Rosch, R. Steiner, H. Seliger, *Biochimie* **1993**, 75, 29.
- [66] U. Piesles, B. S. Sproat, P. Neuner, F. Cramer, *Nucleic Acids Res.* **1989**, 17, 8967.
- [67] J. M. Kean, A. Murakami, K. R. Blake, C. D. Cushman, P. S. Miller, *Biochemistry* **1988**, 27, 9113.
- [68] D. S. Sigman, A. Mazumder, D. M. Perrin, *Chem. Rev.* **1993**, 93, 2295.
- [69] J. Chin, *Acc. Chem. Res.* **1991**, 24, 145.
- [70] C.-H. B. Chen, D. S. Sigman, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6570.
- [71] J. S. Sun, J. C. François, R. Lavery, T. Saison-Behmoaras, T. Montenay-Garestier, N. T. Thuong, C. Helène, *Biochemistry* **1988**, 27, 6039.
- [72] T. Le Doan, L. Perrouault, C. Helène, M. Chassignol, N. T. Thuong, *Biochemistry* **1986**, 25, 6736.
- [73] J. R. Morrow, L. A. Buttrey, V. M. Shelton, K. A. Berback, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1903.
- [74] D. Magda, R. A. Miller, J. L. Sessler, B. L. Iverson, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7439.
- [75] J. K. Bashkin, E. I. Frolova, U. S. Sampath, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 5981.
- [76] J. Hall, D. Husken, U. Piesles, H. E. Moser, R. Haner, *Chem. Biol.* **1994**, 1, 185.
- [77] D. R. Corey, D. Pei, P. G. Schultz, *Biochemistry* **1989**, 28, 8277.
- [78] W. P. Ma, S. E. Hamilton, J. G. Stowell, S. R. Byrn, V. J. Davisson, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, 2, 169.
- [79] S. Kanaya, C. Nakai, A. Konishi, H. Inoue, E. Ohtsuka, M. Ikehara, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 8492.
- [80] Q. Zhou, S. E. Rokita, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 15452.
- [81] Z. J. Gartner, B. N. Tse, R. Grubina, J. B. Doyon, T. M. Snyder, D. R. Liu, *Science* **2004**, im Druck.
- [82] J. B. Doyon, T. M. Snyder, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12372.
- [83] J. Ye, Y. Gat, D. G. Lynn, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 3787; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3641.
- [84] R. K. Bruick, P. E. Dawson, S. B. Kent, N. Usman, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 49.
- [85] G. F. Joyce, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. LII*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, **1987**, S. 41.
- [86] T. Wu, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7963.
- [87] T. Wu, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5496.
- [88] G. von Kiedrowski, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 932; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 932.
- [89] K. Schoning, P. Scholz, S. Guntha, X. Wu, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, *Science* **2000**, 290, 1347.
- [90] X. Wu, G. Delgado, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, *Org. Lett.* **2002**, 4, 1283.
- [91] X. Wu, S. Guntha, M. Ferencic, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, *Org. Lett.* **2002**, 4, 1279.
- [92] I. A. Kozlov, B. De Bouvere, A. Van Aerschot, P. Herdewijn, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5856.
- [93] S. Pitsch, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1995**, 78, 1621.
- [94] R. J. Lewis, P. C. Hanawalt, *Nature* **1982**, 298, 393.
- [95] J. Liu, J. S. Taylor, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 3300.
- [96] G. P. Royer, K. A. Cruickshank, L. E. Morrison, EP 0214626A2, **1989**.
- [97] J. Woo, P. B. Hopkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 5457.
- [98] R. L. Letsinger, T. Wu, R. Elghanian, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 811.
- [99] R. L. Letsinger, T. Wu, R. Elghanian, *Nucleosides Nucleotides* **1997**, 15, 643.

- [100] F. D. Lewis, T. Wu, E. L. Burch, D. M. Bassani, J.-S. Yang, S. Schneider, W. Jäger, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8785.
- [101] K. Fujimoto, S. Matsuda, N. Takahashi, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5646.
- [102] X. Li, Z. J. Gartner, B. N. Tse, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, im Druck.
- [103] K. V. Gothelf, A. Thomsen, M. Nielsen, E. Clo, R. S. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1044.
- [104] J. Brunner, A. Mokhir, R. Kraemer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12410.
- [105] R. B. Woodward, E. Logusch, K. P. Nambiar, K. Sakan, D. E. Ward, B. W. Au-Yeung, P. Balaram, L. J. Browne, P. J. Card, C. H. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3210.
- [106] G. Illuminati, L. Mandolini, *Acc. Chem. Res.* **1981**, *14*, 95.
- [107] J. A. Bittker, K. J. Phillips, D. R. Liu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 367.
- [108] L. H. Eckardt, K. Naumann, W. M. Pankau, M. Rein, M. Schweitzer, N. Windhab, G. von Kiedrowski, *Nature* **2002**, *420*, 286.
- [109] N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.* **1982**, *99*, 237.
- [110] N. C. Seeman, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3408; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3220.
- [111] N. C. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427.
- [112] N. C. Seeman, *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 437.
- [113] N. R. Kallenbach, R. I. Ma, N. C. Seeman, *Nature* **1983**, *305*, 829.
- [114] C. M. Niemeyer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 609.
- [115] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4254; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128.
- [116] C. M. Niemeyer, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3189.
- [117] E. Winfree, F. Liu, L. A. Wenzler, N. C. Seeman, *Nature* **1998**, *394*, 539.
- [118] C. Mao, T. H. LaBean, J. H. Relf, N. C. Seeman, *Nature* **2000**, *407*, 493.
- [119] K. J. Luebke, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8733.
- [120] A. T. Poulin-Kerstien, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15811.
- [121] B. E. Edelson, P. B. Dervan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 284.
- [122] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
- [123] W. G. Lewis, L. G. Green, F. Grynszpan, Z. Radic, P. R. Carlier, P. Taylor, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1095; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1053.
- [124] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192.
- [125] R. Huisgen in *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry* (Hrsg.: A. Padiva), Wiley-Interscience, New York, **1984**.
- [126] C. T. Calderone, J. W. Puckett, Z. J. Gartner, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4278; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4104.
- [127] G. C. Micalizio, S. L. Schreiber, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 160; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 152.
- [128] D. M. Perrin, T. Garestier, C. Helène, *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 377.
- [129] D. M. Perrin, T. Garestier, C. Helène, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1556.
- [130] J. A. Latham, R. Johnson, J. J. Toole, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2817.
- [131] T. Goullain, A. Sidorov, N. Mignet, S. J. Thorpe, S. E. Lee, J. A. Grasby, D. M. Williams, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1898.
- [132] 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.
- [133] K. Sakthivel, C. F. I. Barbas, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2998; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2872.
- [134] N. K. Vaish, A. W. Fraley, J. W. Szostak, L. W. McLaughlin, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 3316.
- [135] J. Matulic-Adamic, A. T. Daniher, A. Karpeisky, P. Haeblerli, D. Sweedler, L. Beigelman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1299.
- [136] T. M. Dewey, A. A. Mundt, G. J. Crouch, M. C. Zyzniewski, B. E. Eaton, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8474.
- [137] T. M. Dewey, M. C. Zyzniewski, B. E. Eaton, *Nucleosides Nucleotides* **1996**, *15*, 1611.
- [138] A. C. Forster, Z. Tan, M. N. Nalam, H. Lin, H. Qu, V. W. Cornish, S. C. Blacklow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6353.
- [139] H. Tao, V. W. Cornish, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 858.
- [140] S. R. Starck, X. Qi, B. N. Olsen, R. W. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8090.
- [141] A. Frankel, S. Li, S. R. Starck, R. W. Roberts, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 506.
- [142] A. Frankel, S. W. Millward, R. W. Roberts, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 1043.
- [143] J. C. Chaput, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9274.
- [144] I. A. Kozlov, S. Pitsch, L. E. Orgel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 13448.
- [145] I. A. Kozlov, P. K. Politis, A. Van Aerschot, R. Busson, P. Herdewijn, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2653.
- [146] I. A. Kozlov, L. E. Orgel, P. E. Nielson, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4462; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4292.
- [147] O. L. Acevedo, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1987**, *197*, 187.
- [148] J. G. Schmidt, L. Christensen, P. E. Nielsen, L. E. Orgel, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4792.
- [149] J. G. Schmidt, P. E. Nielsen, L. E. Orgel, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4797.
- [150] I. A. Kozlov, M. Zielinski, B. Allart, L. Kerremans, A. Van Aerschot, R. Busson, P. Herdewijn, L. E. Orgel, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 151.
- [151] J. A. R. Stutz, C. Richert, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12718.
- [152] D. M. Rosenbaum, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13924.
- [153] D. S. Wilson, J. W. Szostak, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 611.
- [154] C. J. Li, T. H. Chan, *Organic Reactions in Aqueous Media*, Wiley, New York, **1997**.
- [155] K. Eitner, F. Bartl, B. Brzezinski, G. Schroeder, *Supramol. Chem.* **2001**, *13*, 627.
- [156] B. Dietrich, P. Viout, J.-M. Lehn, *Macrocyclic Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **1993**.
- [157] D. Sinou in *Modern Solvent in Organic Synthesis* (Hrsg.: P. Knochel), Springer, Berlin, **1999**, S. 41.
- [158] H. Kinoshita, H. Shinokubo, K. Oshima, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7784.
- [159] J. P. Jost, J. Jiricny, H. Saluz, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 2143.
- [160] S. M. Mel'nikov, B. Lindman, *Langmuir* **1999**, *15*, 1923.
- [161] G. F. Joyce, G. M. Visser, C. A. A. Boeckel, J. H. van Boom, L. E. Orgel, J. van Westrenen, *Nature* **1984**, *310*, 602.
- [162] J. G. Schmidt, P. E. Nielsen, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1494.
- [163] J. Minshull, W. P. Stemmer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 284.
- [164] F. Arnold, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 125.
- [165] F. H. Arnold, L. Giver, A. Gershenson, H. Zhao, K. Miyazaki, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *870*, 400.
- [166] M. B. Tobin, C. Gustafsson, G. W. Huisman, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 421.
- [167] U. T. Bornscheuer, M. Pohl, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 137.
- [168] M. Chartrain, P. M. Salmon, D. K. Robinson, B. C. Buckland, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 209.
- [169] A. Jaschke, B. Seelig, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 257.
- [170] S. V. Taylor, P. Kast, D. Hilvert, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3408; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3310.
- [171] H. Lin, V. W. Cornish, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4580; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4402.
- [172] J. J. Bull, H. A. Wichman, *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **2001**, *32*, 183.