

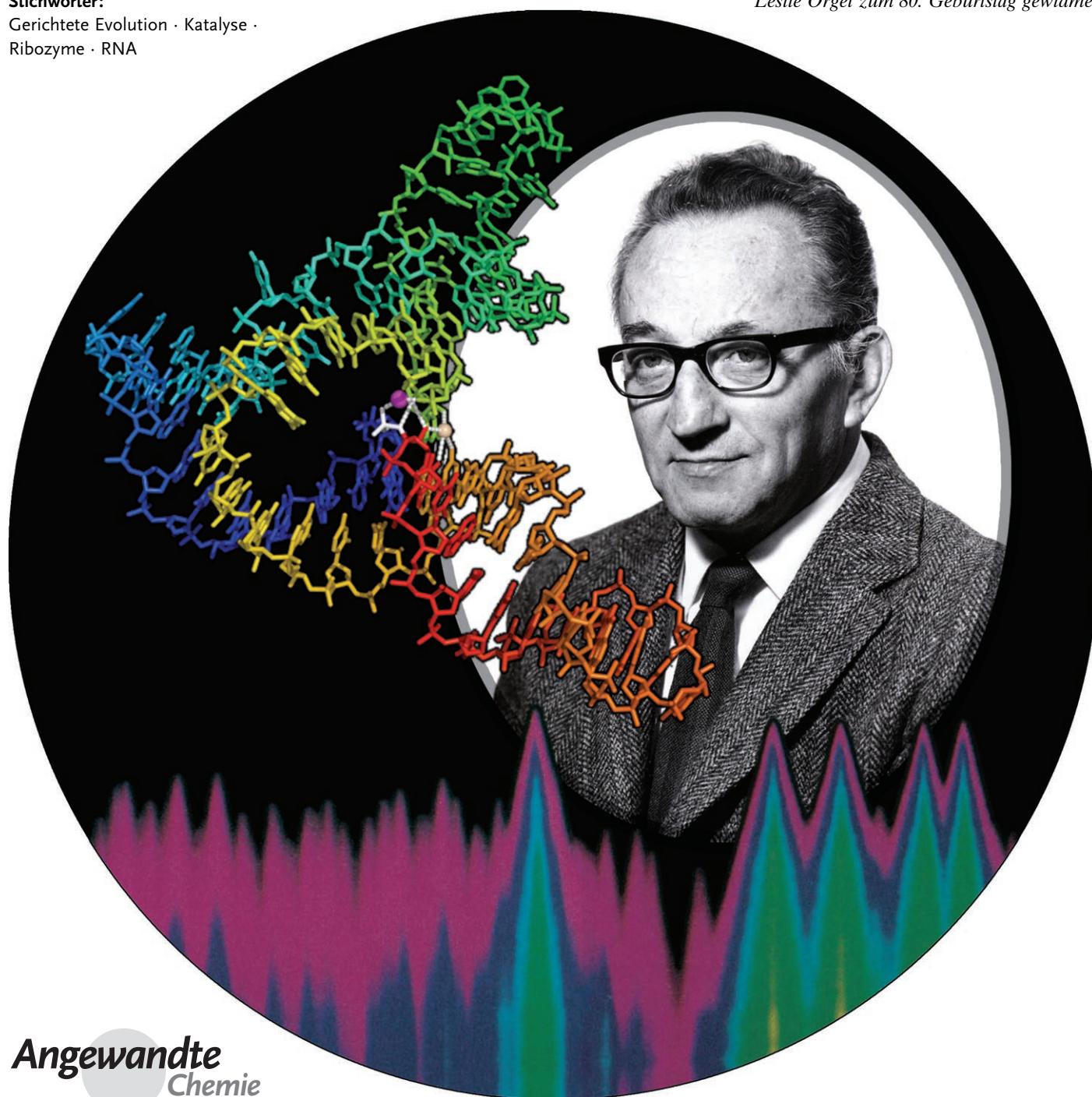
# Vierzig Jahre Evolution im Reagenzglas\*\*

Gerald F. Joyce\*

Stichwörter:

Gerichtete Evolution · Katalyse ·  
Ribozyme · RNA

*Leslie Orgel zum 80. Geburtstag gewidmet*

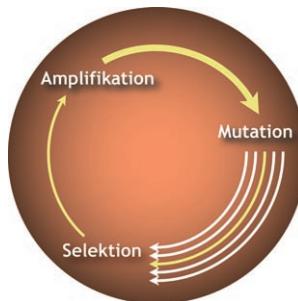


**V**ierzig Jahre ist es her, dass Spiegelman und Mitarbeiter demonstrierten, wie RNA-Moleküle *in vitro* („im Reagenzglas“) evolviert werden können. Damit war einwandfrei festgestellt, dass die Darwinsche Evolution ein chemischer Prozess ist, und der Weg für zahlreiche Folgeexperimente zur gerichteten Evolution war geebnet. Auch die Chemie fand Inspiration in Spiegelmans bahnbrechenden Arbeiten und den daraus hervorgegangenen Entwicklungen, die das Gebiet bis dicht an die Erschaffung von Leben im Labor geführt haben. Dieser Aufsatz gibt einen Überblick über die Konzepte und Methoden zur gerichteten Evolution von RNA-Molekülen im Reagenzglas.

## 1. Einführung

Im Jahr 2009 begeht die wissenschaftliche Fachwelt den 200. Geburtstag Charles Darwins und den 150. Jahrestag der Veröffentlichung seiner klassischen Abhandlung *Die Entstehung der Arten durch natürliche Zuchtwahl* (im englischen Original: *On the Origin of Species by Means of Natural Selection*).<sup>[1]</sup> Die Auswirkungen der Darwinschen Arbeiten für die biologischen Wissenschaften können nicht hoch genug eingeschätzt werden. Darwin hat die Biologie unter ein gemeinsames Prinzip gestellt, das jede biologische Form und Funktion begreifbar macht. Da der Aufbau eines biologischen Systems ein auf fundamentale Weise chemisches Phänomen ist, gelten die Prinzipien der Darwinschen Evolution auch auf der Ebene der Moleküle. Darwin starb lange bevor die makromolekularen Grundlagen der biologischen Evolution verstanden waren, und er hätte nie vorausahnen können, dass man einmal die vollständige genetische „Gebrauchsanweisung“ vieler Organismen, sogar des Menschen, kennen würde. Genauso wenig hätte er sich vorgestellt, dass sich die Darwinsche Evolution einmal als ein rein chemischer Prozess ausführen ließe, gänzlich außerhalb eines biologischen Systems.

In diesem Jahr feiert die chemische Fachwelt den 40. Jahrestag des ersten Evolutionsexperiments im Reagenzglas.



**Abbildung 1.** Die Darwinsche Evolution umfasst die drei Prozesse Amplifikation, Mutation und Selektion. Amplifikation ist die Vervielfältigung von Molekülen unter Bildung einer großen Zahl von Tochtermolekülen, durch Mutationen werden Abweichungen in die Population der Tochtermoleküle eingeführt, und durch Selektion werden diejenigen Moleküle ausgewählt, die Randbedingungen der Umgebung erfüllen. Die selektierten Moleküle (gelber Pfeil) werden zur Elterngenerationsrunde der nächsten Evolutionsrunde.

## Aus dem Inhalt

<b>1. Einführung</b>	6541
<b>2. Das erste Evolutionsexperiment im Reagenzglas</b>	6542
<b>3. Evolution von Q<math>\beta</math>-RNA</b>	6544
<b>4. Die Polymerasekettenreaktion</b>	6546
<b>5. Ein ganz besonderer Phänotyp</b>	6548
<b>6. Evolution eines RNA-Polymeraseribozyms</b>	6550
<b>7. Evolution von Ribozymen durch seriellen Transfer</b>	6552
<b>8. In-vitro-Evolution heute und morgen</b>	6554

Am 15. Juli 1967 veröffentlichten Sol Spiegelman und Mitarbeiter eine Studie in den *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* mit dem Titel „An Extracellular Darwinian Evolution Experiment with a Self-Duplicating Nucleic Acid Molecule“.<sup>[2]</sup> Als „selbstduplizierend“ würde man Spiegelmans Moleküle heute nicht mehr bezeichnen, außer Zweifel steht aber, dass diese Arbeit den Startpunkt einer sehr intensiven und erfolgreichen Forschung markiert. Diese erste Studie und die vielen Experimente, die folgen sollten, hatten enorme Auswirkungen sowohl auf die Chemie als auch auf die Biologie.

Die Darwinsche Evolution kann durch das Zusammenwirken dreier chemischer Prozesse unter Beteiligung informationstragender Makromoleküle beschrieben werden: Amplifikation, Mutation und Selektion (Abbildung 1). Amplifikation (genetische Vervielfältigung) ist der Prozess, der

[\*] Prof. G. F. Joyce  
Departments of Chemistry and Molecular Biology  
und  
The Skaggs Institute for Chemical Biology  
The Scripps Research Institute  
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)  
Fax: (+1) 858-784-2943  
E-Mail: gjoyce@scripps.edu

[\*\*] Der Vortitel zeigt ein Photo von Sol Spiegelman (1974; Wiedergabe mit Genehmigung der Albert and Mary Lasker Foundation) neben der Kristallstruktur eines RNA-Enzyms, das die RNA-Ligation an einem RNA-Templat katalysiert;<sup>[81]</sup> weiß: Nucleotid an der Ligationsstelle, violette Kugel: Mg<sup>2+</sup>-Ion, das wahrscheinlich an der Katalyse beteiligt ist (Graphik von Michael Robertson und William Scott). Der Hintergrund zeigt das Raum-Zeit-Diagramm einer fortschreitenden Welle evolvierender Q $\beta$ -RNA in einer Kapillare;<sup>[21]</sup> horizontale Achse: Position entlang der Kapillare, vertikale Achse: feste Zeitintervalle (von oben nach unten fortschreitend), Farbabstufung: RNA-Konzentration.

aus einer kleinen Zahl von „Elternmolekülen“ eine große Zahl von „Tochtermolekülen“ erzeugt. Normalerweise denkt man bei den Begriffen Eltern- und Tochtergeneration an Zellen oder ganze Organismen. Wenn es sich bei der Elterngeneration aber um ein Heteropolymer mit einer bestimmten Sequenz von Untereinheiten handelt und wenn dieses Molekül zu Abbildern mit sehr ähnlicher Sequenz von Untereinheiten dupliziert wird, so hat man es mit der Weitergabe von Information von einem Molekül auf ein nachfolgendes Molekül zu tun. Genau wie Zellen oder ganze Organismen hat jedes Molekül eine Lebensdauer, die von seinen Eigenschaften und der Umgebung abhängt. Moleküle, die schneller amplifiziert werden, als dass sie zerfallen, sind in ihrer Umgebung beständig, und die in ihnen gespeicherte Information entspricht einer Aufzeichnung der speziellen Anordnung von Untereinheiten im Molekül, die eine solche Beständigkeit ermöglicht.

Die Mutation (genetische Abweichung) – zusammen mit der Rekombination – ist der Prozess, durch den Eltern- und Tochtermoleküle verschieden werden. Beim Kopieren eines informationstragenden Makromoleküls treten gelegentliche Fehler auf, auch wenn die beteiligten Enzymsysteme hoch ausgereift sind. Zu viele Fehler löschen die genetische Information, gelegentliche Fehler führen hingegen zu sehr feinen Abweichungen, die für das System von Vorteil sein können. Wenn jede Kopie ein perfekte Kopie wäre, so hätten alle Moleküle in einer Population die identische Konfiguration. Solange diese bestimmte Konfiguration in ihrer Umgebung beständig ist, wird die Population überleben. Ändert sich aber die Umgebung in einer Weise, dass die Amplifikation der Moleküle langsamer wird als ihr Zerfall, so ist diese Population identischer Individuen zum Aussterben verurteilt. Das Entstehen von Abweichungen durch Mutation verleiht der Molekülpopulation erst die Fähigkeit zum langfristigen Überleben, weil dadurch die Möglichkeit besteht, dass bei einigen der Varianten die chemischen Untereinheiten so konfiguriert sind, dass die Moleküle auch in einer veränderten Umgebung beständig sind. Die Abweichungen können außerdem zu weiteren Varianten führen, die der veränderten Umgebung dann noch besser angepasst sind.

Der dritte Prozess der Darwinschen Evolution ist die Selektion (Auswahl bevorzugter Phänotypen). Der vollständige Titel von Darwins 1859 erschienem Buch lautet: *Die Entstehung der Arten durch natürliche Zuchtwahl oder Die Erhaltung der bevorzugten Rassen im Kampfe ums Dasein (On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the*



Gerald Joyce studierte an der University of California in San Diego und promovierte 1984 am Salk Institute unter der Anleitung von Leslie Orgel. 1989 wechselte er an das Scripps Research Institute, wo er zurzeit Professor am Institut für Chemie und Molekulärbiologie ist. Seine Forschungen befassen sich mit der Chemie und Biochemie der RNA sowie der gerichteten Evolution von Nucleinsäureenzymen.

*Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life).*<sup>[1]</sup> „Kampf“ bedeutet in der Sprache der Moleküle, dass ein informationstragendes Makromolekül schneller amplifiziert werden muss, als dass es zerfällt, und dies im Wettbewerb mit anderen Makromolekülen um begrenzte Ressourcen innerhalb der lokalen Umgebung. Die bevorzugten Sequenzen sind diejenigen, die am schnellsten und genauesten amplifiziert werden. Amplifizieren bezieht sich hier nicht nur auf das Kopieren von genetischer Information, sondern auf alle Prozesse, die dafür sorgen, dass der Kopiervorgang stattfinden kann – bei biologischen Organismen ist dies jeder am Stoffwechsel beteiligte Prozess, bei Makromolekülen sind es ihre chemischen Eigenschaften und ihre Wechselwirkungen mit anderen Molekülen.

Darwin waren die Techniken für die selektive Zucht von Pflanzen und Haustieren bekannt, und er wusste, wie die Anwendung dieser Techniken zu einer künstlichen Auslese erwünschter Merkmale führen kann. Wichtig war ihm die Unterscheidung zwischen künstlicher und natürlicher Auslese, mit Betonung darauf, dass letztere ungezielt stattfindet (d.h. nicht absichtlich zu einem bestimmten phänotypischen Merkmal führt) und nicht nur neue Abweichungen, sondern gänzlich neue Spezies zum Ergebnis hat. Darwins Vorstellungen setzten sich rasch durch, es sollte aber noch über ein Jahrhundert dauern, bis eine künstliche Auslese (unter Makromolekülen) auch außerhalb eines biologischen Systems vorgenommen wurde.<sup>[2]</sup> Sehr viel früher wäre dies auch kaum möglich gewesen, da zur Zeit des Spiegelmannschen Experiments zwar die Prinzipien der molekularen Evolution verstanden waren, man jedoch über keine Methoden zur Amplifikation, Mutation und Selektion informationstragender Makromoleküle verfügte. In den seither vergangenen 40 Jahren sind diese Methoden sehr viel ausgereifter geworden, sodass heute die technischen Möglichkeiten zur Evolution im Reagenzglas enorm sind und man in der Lage ist, unter einer Vielzahl von komplexen molekularen Merkmalen eine gezielte Auswahl zu treffen.

## 2. Das erste Evolutionsexperiment im Reagenzglas

Mitte der 1960er Jahre wollten Spiegelman und Mitarbeiter an der Universität von Illinois herausfinden, wie sich RNA-Viren (die ein RNA-Genom besitzen) in Zellen, die ein DNA-Genom haben, replizieren können. Spiegelmans Überlegung war, dass es ein eigenes Replikationssystem für die RNA geben müsse, und tatsächlich identifizierte er 1963 eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (die er als „RNA-Replikase“ bezeichnete), die die genomische RNA des MS-2-Virus replizierte.<sup>[3]</sup> Bei diesem Virus handelt es sich um einen Bakteriophagen, der *E.-coli*-Zellen infiziert. Die virale Replikase erkennt und vervielfältigt nur genomische RNA des MS-2-Virus und ignoriert die zahlreichen bakteriellen RNAs in der Zelle. Diese „selektive Präferenz“, wie Spiegelman es nannte, ist entscheidend für die effiziente Fortpflanzung des Virus.

1965 isolierte Spiegelman die RNA-Replikase eines zweiten Bakteriophagen, bezeichnet als Qβ.<sup>[4]</sup> Die Qβ-Replikase erwies sich ebenfalls als spezifisch für ihre genomische

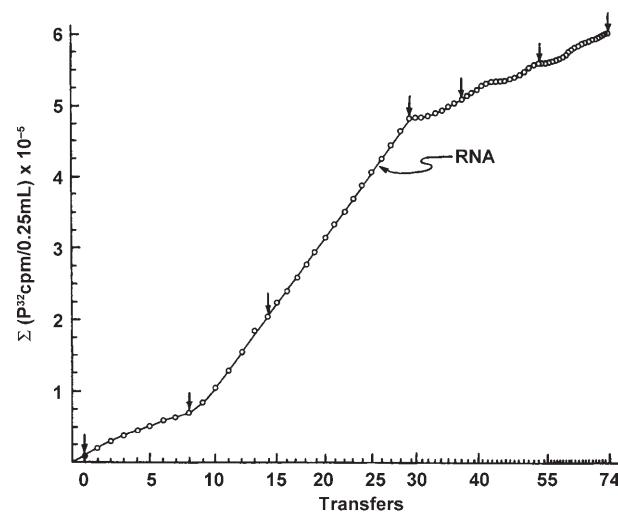
RNA, und beide Replikasen waren auch nicht in der Lage, das jeweils andere Genom zu replizieren. Die Experimente wurden vollständig *in vitro* ausgeführt, wobei aufgereinigtes Replikaseprotein, eine kleine Menge der genomischen RNA und jedes der vier Nucleosid-5'-triphosphate (NTPs) eingesetzt wurden. Die eingesetzte genomische RNA wurde durch die Replikase amplifiziert, ebenso wie die neu erzeugten Kopien, sodass innerhalb weniger Stunden ein exponentieller Zuwachs der RNA-Kopien verzeichnet wurde.<sup>[5]</sup> Die neu synthetisierte RNA wurde aufgereinigt, und man wies nach, dass sie ihre Fähigkeit zur Bildung von infektiösen viralen Partikeln beibehalten hatte.<sup>[6]</sup> Dies war die erste Laborsynthese einer infektiösen Nucleinsäure. Für diese Arbeiten und für seine Beiträge zur Entwicklung von Techniken zur Hybridisierung von Nucleinsäuren erhielt Spiegelman 1974 den Albert-Lasker-Preis für medizinische Grundlagenforschung.

Spiegelman betrachtete die *In-vitro*-Amplifikation von genomicscher Q $\beta$ -RNA als einen Prozess der „Selbstduplikation“ – natürlich aber duplizierte sich die RNA nicht wirklich selbst. Vielmehr führte das Replikaseprotein die Duplikation aus, und zwar auf eine sehr substratspezifische Weise. Wir wissen heute, dass diese Spezifität auf Sequenzelemente und Strukturmerkmale der genomicschen RNA zurückzuführen ist, die vom Replikaseprotein erkannt werden.<sup>[7-9]</sup> Die RNA selbst hat keine katalytische Funktion, arbeitet aber mit der Replikase zusammen und erzielt dabei eine exponentielle Amplifikation. Es sei daran erinnert, dass die RNA-Replikation – ähnlich wie die DNA-Replikation – die Synthese eines „Plus“- und „Minus“-Strangs erfordert. Die genomicsche RNA ist der Plus-Strang, dessen Kopie den komplementären Minus-Strang darstellt, aus dem wiederum ein neuer Plus-Strang erzeugt wird. Sowohl Plus- als auch Minus-Stränge müssen die benötigten Sequenz- und Strukturmerkmale enthalten, die durch das Replikaseprotein erkannt werden.

Mitte der 1960er Jahre war wenig über die Fehlerrate von Polymerasen bekannt; Spiegelman wusste aber, dass die Q $\beta$ -Replikase gelegentliche Mutationen hervorbringt (und befürchtete sogar, dass die Mutationshäufigkeit in der ungewohnten Umgebung eines enzymologischen Labors zu hoch sein könnte).<sup>[6]</sup> Er erkannte somit, dass dem Q $\beta$ -Replikationssystem alle Bestandteile zur Verfügung standen, die für die *In-vitro*-Amplifikation, Mutation und Selektion von RNA-Molekülen erforderlich waren. Sein klassisches Experiment begann mit einer Reaktionsmischung (250  $\mu$ L), die 0.2  $\mu$ g (0.16 pmol) genomicsche Q $\beta$ -RNA, 40  $\mu$ g (0.19 nmol) Q $\beta$ -Replikase, 0.8 mM von jedem NTP, 12.8 mM MgCl<sub>2</sub> und 84 mM Tris-HCl [pH 7.4; Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan] enthielt und bei 35 °C 20 Minuten inkubiert wurde.<sup>[2]</sup> Nach dieser Reaktionszeit wurde ein Aliquot von 20  $\mu$ L entnommen und in einen frischen Reaktionskolben überführt, der alle Komponenten außer Q $\beta$ -RNA enthielt. Damit konnten nur diejenigen RNA-Moleküle, die mit dem Aliquot überführt wurden, in dieser zweiten Reaktionsmischung amplifiziert werden. Da das Aliquot nur 8% des ursprünglichen Gemisches entsprach, sollten RNA-Moleküle, die im ersten Inkubationsschritt weniger als etwa ein Dutzend Kopien erzeugten, zu Beginn der zweiten Inkubation in geringerer Zahl vorhanden sein. Umgekehrt sollten RNA-Moleküle, von

denen im ersten Schritt mehr Kopien erzeugt wurden, in der zweiten Reaktionsmischung vorherrschend sein.

Spiegelman wiederholte die Inkubations- und Transferschritte viele Male. Diese Art von „seriellem Transfer“ wird gewöhnlich zum Kultivieren lebender Zellen verwendet – Spiegelman „kultivierte“ stattdessen RNA-Moleküle.<sup>[2]</sup> Nach dem neunten Transfer stellte er fest, dass die RNA-Moleküle deutlich schneller amplifiziert wurden als zu Beginn des Experiments, und ab dem 14. Transfer verkürzte er die Inkubationszeit von 20 auf 15 Minuten. Weitere Verkürzungen der Inkubationszeit wurden nach dem 29., 38. und 52. Transfer vorgenommen, bis schließlich eine Zeit von 5 Minuten erreicht war, die bis zum 74. Transfer beibehalten wurde (Abbildung 2). Am Ende wurden die RNA-Moleküle 15fach



**Abbildung 2.** Spiegelman und Mitarbeiter führten die *In-vitro*-Evolution von Q $\beta$ -RNA durch serielle Transfer der Reaktionsmischung aus. Die Abbildung, eine Wiedergabe aus der Originalveröffentlichung von 1967,<sup>[2]</sup> zeigt die Anreicherung von neu synthetisierter RNA während 74 aufeinander folgender Transfers; zur Analyse wurde [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-markiertes Uridin-5'-triphosphat (UTP) in die Polynukleotide eingebaut. Man beachte, dass die Wachstumsgeschwindigkeit nach dem neunten Transfer (siehe Pfeil) steigt und dass die Inkubationszeiten nach dem 14., 29., 38. und 52. Transfer verkürzt wurden (siehe Pfeile).

schneller amplifiziert als zu Beginn. Die Hauptursache für die beschleunigte Amplifikation war, dass die Moleküle zum Schluss nur etwa 15 % der Größe der Startmoleküle aufwiesen und die meisten der Nukleotide, die für die virale Infektion, nicht aber für die RNA-Amplifikation *in vitro* wichtig sind, abgeworfen hatten. Genomische Q $\beta$ -RNA enthält rund 3600 Nukleotide, während die „Minivarianten“, die nach 74 Transfers erhalten wurden, nur noch aus etwa 550 Nukleotiden bestanden.

Spiegelman beschrieb dieses Ergebnis als nicht überraschend, zumal er bereits erkannt hatte, dass kürzere RNA-Moleküle weniger Zeit zur Replikation benötigten und daher auch bevorzugt selektiert werden sollten. Trotzdem merkte er an: „It should not escape the attention of the reader that [...] other selective stresses can be imposed on the system to generate RNA entities which exaggerate other molecular features“.<sup>[2]</sup> Rückblickend relativierten manche Forscher die

Bedeutung dieses ersten Evolutionsexperiments im Reagenzglas, eben weil das Ergebnis nicht überraschte und weil in Anbetracht der strikten Substratspezifität der Q $\beta$ -Replikase auch gar kein anderes Resultat möglich war. Heute sind Techniken verfügbar, mit denen sich RNA-Moleküle fast jeder beliebigen Sequenz amplifizieren lassen, sodass es möglich ist, den Selektionsdruck speziell auf die intrinsischen Eigenschaften der RNA anstatt auf deren Verhalten als Substrat für ein Polymeraseenzym auszurichten. Allerdings kommt es selbst im Fall des Q $\beta$ -Evolutionssystems nicht einfach nur darauf an, dass die kleineren Moleküle die größeren verdrängen: Ebenfalls entscheidend ist, dass die für die RNA-Funktion erforderlichen Sequenz- und Strukturerkennungselemente sowohl innerhalb der Plus- als auch innerhalb der Minus-Stränge erhalten bleiben, selbst wenn es in anderen Bereichen des Moleküls zu umfangreichen Deletionen kommt.

Auch die erste „moderne“ Veröffentlichung (1990), in der die In-vitro-Selektion eines RNA-Aptamers beschrieben wurde, betraf eine RNA, die durch ein Polymeraseprotein anhand bestimmter Sequenzelemente und Strukturmerkmale innerhalb der RNA erkannt wurde.<sup>[10]</sup> Im Nachhinein könnte man behaupten, dass es Spiegelman war, der das erste RNA-Aptamer produzierte – tatsächlich aber betrachtete er die gerichtete Evolution als eine sehr spezielle Methode zur viralen Replikation, die aber nicht allgemein anzuwenden wäre. Er war sich der Tatsache bewusst, dass seine Experimente die ersten waren, die den Prozess der Darwinschen Evolution in einem nichtbiologischen System verwirklichten, und bisweilen sprach er recht unbescheiden über diese Errungenschaft.<sup>[11]</sup> Dessen ungeachtet ist es wohl angemessen, Spiegelmans Experiment mit Wöhlers Synthese von Harnstoff zu vergleichen.<sup>[12]</sup> Sowohl die organische Chemie als auch die molekulare Evolution haben sich in einer Weise fortentwickelt, wie es sich weder Wöhler noch Spiegelman hätten vorstellen können, und genauso wie Wöhler die irrtümliche Abgrenzung der biologischen Chemie von der organischen Synthese beseitigte, machte Spiegelman die Unterscheidung zwischen der Darwinschen Evolution in der Biologie und der Darwinschen Evolution als chemischem Vorgang gegenstandslos.

### 3. Evolution von Q $\beta$ -RNA

Spiegelman und andere unternahmen eine Vielzahl faszinierender Experimente mit dem Q $\beta$ -Evolutionssystem. Gewöhnlich wurde so vorgegangen, dass man der Population der replizierenden RNA-Moleküle neue, oftmals anspruchsvolle Aufgaben stellte und es anschließend der Evolution überließ, eine passende Lösung zu finden. Beim ersten Experiment mit künstlich auferlegtem Selektionsdruck, das über die Grundanforderung einer schnellen Replikation hinausging, wurde dem Reaktionsgemisch schrittweise Cytidin-5'-triphosphat (CTP) entzogen.<sup>[13]</sup> Die Minivarianten der Q $\beta$ -RNA, die Spiegelman erzeugt hatte, benötigen mindestens 100  $\mu$ M CTP, um wirksam amplifiziert zu werden. Spiegelman verringerte die Konzentration von CTP auf 16  $\mu$ M, führte zehn serielle Transfers aus, verringerte die Konzentration von

CTP auf 8  $\mu$ M und führte weitere 40 Transfers aus. Am Schluss dieser Prozedur wurden die evolvierten Moleküle in Gegenwart von 8  $\mu$ M CTP rund 1.6fach schneller amplifiziert als die ursprünglichen Moleküle. Die ursprünglichen und evolvierten RNA-Moleküle hatten die gleiche Größe und Gesamt-nucleotidzusammensetzung, wiesen aber feine Unterschiede in der Nucleotidsequenz auf, die das unterschiedliche Verhalten bewirkten.

In einem weiteren Evolutionsexperiment wurde die Reaktionsmischung mit 7-Desaza-ATP versetzt, das von der Q $\beta$ -Replikase anstelle von Adenosin-5'-triphosphat (ATP) eingebaut werden kann und die Amplifikation verlangsamt.<sup>[13]</sup> Die RNA-Moleküle wurden zunächst in Gegenwart einer verringerten Konzentration von ATP in 16 Transfers evolviert. Anschließend wurde die Evolution in 19 Transfers in Gegenwart von 40  $\mu$ M ATP und 240  $\mu$ M 7-Desaza-ATP fortgesetzt. Die Prozedur führte zu einer Variante, die in Gegenwart von 7-Desaza-ATP doppelt so schnell amplifiziert wurde wie die ursprüngliche RNA. Erneut fanden sich keine substanzialen Unterschiede in der Größe und Gesamt-nucleotidzusammensetzung der ursprünglichen und der evolvierten Moleküle.

#### 3.1. Molekulare Evolution von Resistenzverhalten

Die gleiche Minivariante der Q $\beta$ -RNA, die in den CTP-Experimenten eingesetzt wurde, kam auch in einem Evolutionsexperiment zum Einsatz, bei dem die Reaktionsmischung mit immer höheren Konzentrationen von Ethidiumbromid (EtBr) versetzt wurde.<sup>[14]</sup> EtBr interkaliert in bestimmte Bereiche doppelsträngiger RNA und inhibiert die Aktivität von RNA-Polymerasen einschließlich der Q $\beta$ -Replikase. Die Amplifikation der ursprünglichen Q $\beta$ -RNA wurde in Gegenwart von 6  $\mu$ M EtBr um 50% und in Gegenwart von 60  $\mu$ M EtBr vollständig inhibiert. Orgel und Mitarbeiter unternahmen Experimente (in Zusammenarbeit mit Spiegelman),<sup>[14]</sup> bei denen die Q $\beta$ -RNA zunächst in zehn Transfers in Gegenwart von 5  $\mu$ M EtBr evolviert wurde. Anschließend wurde die EtBr-Konzentration auf 10, 20 usw. bis schließlich auf 100  $\mu$ M im 108. Transfer erhöht. Die zum Schluss erhaltenen Moleküle wurden in Gegenwart von 80  $\mu$ M EtBr genau so effizient amplifiziert wie die ursprünglichen Moleküle in Gegenwart von 6  $\mu$ M EtBr.

Weitere Experimente zur Evolution von EtBr-resistenten Stämmen der Q $\beta$ -RNA belegten, dass die evolvierten Moleküle nicht einfach nur schnellere Replikatoren sind, sondern dass es sich um Moleküle handelt, die sich speziell an die Gegenwart von EtBr angepasst haben.<sup>[15]</sup> Die evolvierten Varianten bilden schwächere Komplexe mit EtBr und werden in Abwesenheit von EtBr weniger effizient amplifiziert als die ursprüngliche RNA. Die Sequenz der EtBr-resistenten RNA wurde bestimmt, wobei gefunden wurde, dass sie nur drei einfache Mutationen enthält. Eine Analyse intermediärer Populationen ergab, dass die Mutationen nacheinander eingeführt werden, wobei jede neue Mutation zu einer verbesserten Selektivität führt. Der Mechanismus, durch den die drei Mutationen die Bindung von EtBr hemmen und die RNA-Amplifikation erleichtern, wurde bislang nicht aufge-

klärt, dies sollte mit modernen Methoden jedoch relativ leicht möglich sein.

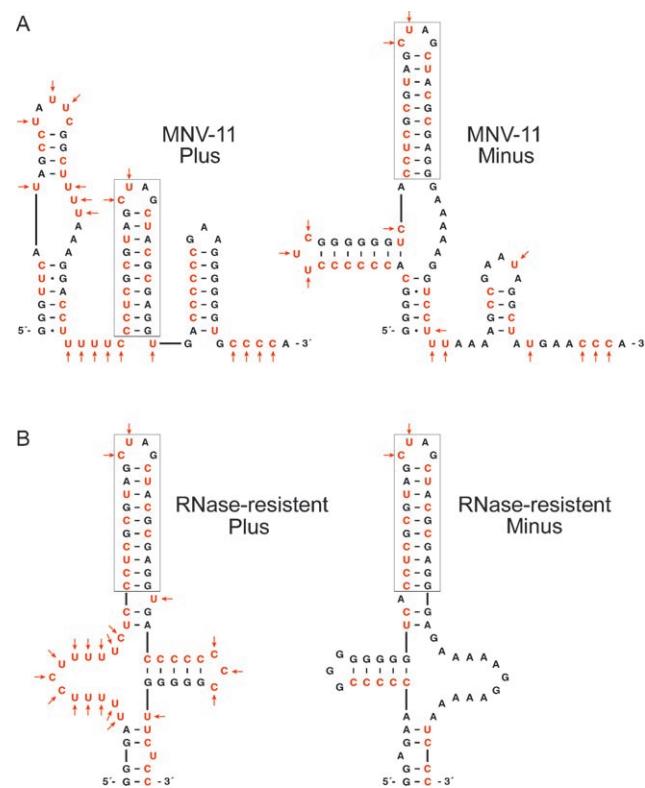
Ende der 1990er Jahre – dreißig Jahre nach Spiegelmans Evolutionsexperiment – führten Strunk und Ederhof ein bemerkenswertes Experiment mit Q $\beta$ -RNA aus,<sup>[16]</sup> bei dem der Reaktionsmischung Ribonuclease A (RNase A) zugesetzt wurde. Dieses Enzym spaltet die Phosphodiesterbindung auf der 3'-Seite von Pyrimidinresten (Cytosin und Uracil) in ungepaarten Bereichen der RNA. Die Minivarianten der Q $\beta$ -RNA enthalten in den Plus- und Minus-Strängen rund 50% Pyrimidinreste, von denen viele in Schleifen und internen Ausbuchtungen vorkommen und somit durch RNase A leicht gespalten werden können. Selbst wenn ein Strang der Q $\beta$ -RNA in diesen Regionen ausschließlich Purinreste enthalten würde, so würde der komplementäre Strang an den entsprechenden Positionen noch immer Pyrimidinreste aufweisen. Dies macht die Entwicklung von Resistenz gegen RNase A zu einer anspruchsvollen Aufgabe.

Die Amplifikation der Q $\beta$ -Minivarianten wird in Gegenwart von 1 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> RNase A zu einem gewissen Grad abgeschwächt und in Gegenwart von 2 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> RNase A vollständig unterdrückt. In einem seriellen Transferexperiment wurde die Konzentration von RNase A beginnend mit 1 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> schrittweise auf 3.5 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> erhöht, wobei jeweils soviel zugesetzt wurde, wie die Q $\beta$ -RNA tolerierte.<sup>[16]</sup> Anders als bei den Experimenten der 1960er und 1970er Jahre wurde ein Transferautomat verwendet, der die RNA-Konzentration kontinuierlich überwachte und ein Transferereignis auslöste, sobald die Konzentration einen festgelegten Schwellenwert erreichte. Auf diese Weise wurde die Evolution der Q $\beta$ -Population unter Bedingungen exponentiellen Wachstums aufrechterhalten, und es war sichergestellt, dass die Populationsgröße nie unter  $10^{11}$  Moleküle sank. Durch beide Faktoren wird gewährleistet, dass sich die vorteilhaftesten Individuen fortpflanzen und in der Population vorherrschend werden.<sup>[17]</sup>

Das Evolutionsexperiment wurde mit insgesamt 80 Transfers ausgeführt, bei einer elffachen Verdünnung pro Transfer, entsprechend einer RNA-Replikation über 280 Generationen.<sup>[16]</sup> Die Startmoleküle enthielten 87 Nucleotide in jedem Strang, die evolvierten Moleküle zum Schluss nur noch 65 (Abbildung 3). Bemerkenswerterweise reagierten die RNA-Moleküle auf den Selektionsdruck in der Weise, dass der Plus-Strang „geopfert“ wurde, während der Minus-Strang beibehalten blieb. Der Plus-Strang enthielt zum Schluss 42 Pyrimidinreste, von denen 20 durch RNase A gespalten werden konnten; der Minus-Strang enthielt dagegen nur 23 Pyrimidinreste, von denen nur zwei einer Spaltung unterlagen. Demzufolge blieb der Minus-Strang bei sehr viel höheren Generationszahlen intakt und hielt somit die Population aufrecht, während der Plus-Strang nur als kurzelbiges Intermediat vorlag.

### 3.2. Räumlich isolierte RNA-Evolution

Die Evolution der Q $\beta$ -RNA wurde auch in räumlicher Isolierung untersucht, entweder innerhalb molekularer „Kolonien“, die auf Agarose gezüchtet wurden,<sup>[18]</sup> oder in einer langen Kapillare, in der sich die Population mit einer linearen



**Abbildung 3.** Evolution einer Variante der Q $\beta$ -RNA mit Resistenz gegen RNase A. A) Serielles Transferexperiment<sup>[16]</sup> ausgehend von der Minivariante MNV-11 der Q $\beta$ -RNA,<sup>[112]</sup> die sowohl im Plus- als auch im Minus-Strang ungefähr gleiche Anteile an Purin- (schwarz) und Pyrimidinresten (rot) enthält. Die meisten der unpaarerten Pyrimidinreste können durch RNase A gespalten werden (Pfeile). B) Die evolierte Variante enthält 20 spaltbare Pyrimidine im Plus-, aber nur zwei im Minus-Strang. Letztere befinden sich in einer Schleife, die Bestandteil eines von der Q $\beta$ -Replikase erkannten Strukturmerkmals ist (Kasten).

Wellenfront ausbreitet.<sup>[19]</sup> Bei der Methode der Koloniebildung breitet man die Anfangspopulation der RNA über eine dünne Agaroseschicht aus, die die Q $\beta$ -Replikase enthält, und bedeckt die Oberfläche mit einer Nylonmembran, die mit den vier NTPs imprägniert ist. Jede Kolonie beginnt mit einem einzelnen RNA-Molekül und kann bis zu  $10^{12}$  Tochter-RNAs ergeben. Die Technik wurde zum Nachweis spontaner Rekombinationsereignisse zwischen 5'- und 3'-Fragmenten der Q $\beta$ -RNA genutzt, die stattfinden müssen, damit ein amplifizierbares Material entsteht.<sup>[20]</sup>

Beim Wellenfront-Experiment wird eine dünne Kapillare verwendet, die eine Lösung der Q $\beta$ -RNA sowie 15  $\mu$ M EtBr enthält. Das EtBr interkaliert in die RNA und macht diese im UV-Licht sichtbar. Im ursprünglichen Verfahren wurden konventionelle Photographien aufgenommen,<sup>[19]</sup> später wurde die gesamte Kapillare mithilfe einer CCD-Kamera kontinuierlich überwacht.<sup>[21]</sup> Die Kapillare wurde über eine Gesamtlänge von zwölf Metern hin- und hergewunden, und die RNA-Amplifikation wurde an verschiedenen Stellen entlang der Kapillare ausgelöst. Immer wenn replizierte Q $\beta$ -RNAs entstanden, breiteten sich von der betreffenden Stelle Fluoreszenzwellen in beide Richtungen aus, wobei die Ge-

schwindigkeit der Wellenfront ein direktes Maß für die Geschwindigkeit der exponentiellen RNA-Amplifikation ist. Eine typische Ausbreitungsgeschwindigkeit der Wellenfront war  $80 \mu\text{m min}^{-1}$ , was einer Wachstumsgeschwindigkeit von  $0.7 \text{ min}^{-1}$  entspricht.

Einer der Vorteile der Wellenfront-Experimente besteht darin, dass man Phänotypenbildung in vielen hundert unterschiedlichen Wellenfronten simultan überwachen kann.<sup>[21]</sup> Man kann eine Verteilung von Amplifikationsgeschwindigkeiten einer heterogenen Population evolvierender RNAs beobachten. In manchen Fällen werden sich langsam ausbreitende Wellen plötzlich beschleunigt, wenn neue, vorteilhaftere Varianten auftreten. Im Sog einer Wellenfront können sekundäre Wellenfronten erscheinen, die die Primärwelle überholen können, falls sie vorteilhaftere Varianten bilden. Wellenfronten können frontal aufeinanderstoßen, was zur Bildung neuartiger Varianten (wahrscheinlich Rekombinannten) führen kann, die wiederum eine sekundäre Wellenfront erzeugen, die sich dann schneller ausbreitet als jede der beiden kollidierenden Wellen.

Sol Spiegelman starb 1983, einige Zeit vor Einführung der Kolonie- und Wellenfront-Methoden und noch bevor man in der Lage war, die ursprünglich für die Q $\beta$ -RNA entworfenen Techniken der In-vitro-Evolution für beliebige RNA-Typen einzusetzen. In seiner 1967 erschienenen Veröffentlichung stellte Spiegelman die Frage: „*What will happen to the RNA molecules if the only demand made on them is the Biblical injunction, multiply, with the biological proviso that they do so as rapidly as possible?*“<sup>[2]</sup> Sein Experiment lieferte eine erste Antwort.

## 4. Die Polymerasekettenreaktion

Der hohe Grad an Substratselektivität der Q $\beta$ -Replikase für RNAs, die der genomischen Q $\beta$ -RNA ähnlich sind, ist vom Standpunkt der viralen Evolution sinnvoll. Für die Replikase ist es von großem Vorteil, andere RNAs in der Wirtzelle zu ignorieren und ihre Aktivität auf die Amplifikation ihres eigenen Genoms zu konzentrieren. Für In-vitro-Evolutionsstudien ist diese extreme Substratspezifität dagegen hinderlich. Es gibt viele interessante RNAs, die nicht das von der Q $\beta$ -Replikase benötigte Erkennungsmuster haben. Einige Versuche wurden unternommen, exogene Sequenzen in Varianten der Q $\beta$ -RNA einzuführen, in der Hoffnung, dass diese Sequenzen im Replikationsprozess mitgeführt würden.<sup>[22–24]</sup> Ausnahmslos zeigte sich jedoch, dass die zusätzlichen Sequenzen während der In-vitro-Evolution wieder verworfen wurden, weil sie die Amplifikation verlangsamt.

Der Durchbruch kam mit der Entwicklung der Polymerasekettenreaktion (PCR) und verwandter Methoden für die Amplifikation von Nucleinsäuren so gut wie beliebiger Sequenz.<sup>[25,26]</sup> Mit dieser Technik gelang es, RNA- und DNA-Moleküle auf verschiedene Eigenschaften hin zu selektieren, statt nur auf die Fähigkeit hin, durch ein Replikaseprotein amplifizierbar zu sein. Die Amplifikation von RNA durch PCR erfordert mehrere Schritte: die reverse Transkription der RNA in eine komplementäre DNA (cDNA), die anschließende PCR-Amplifikation auf der Ebene der DNA und

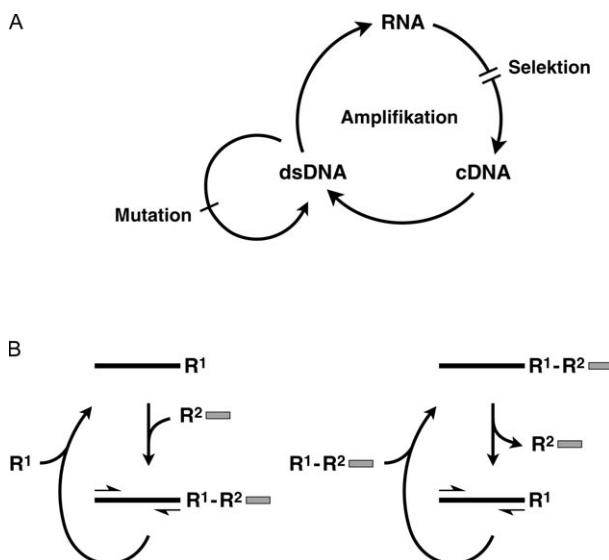
schließlich die Transkription der DNA zurück zur RNA. Eine ebenfalls leistungsfähige, wenn auch seltener eingesetzte Methode zur Amplifikation von Nucleinsäuren ist die isotherme RNA-Amplifikation.<sup>[27,28]</sup> Diese Methode beruht auf der Kombination einer reversen Transkriptase mit einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase, die mehrere wiederholende Runden von reverser und normaler Transkription ausführen und so die RNA-Amplifikation bei einer konstanten Temperatur vermitteln.

Sowohl die PCR- als auch die isotherme RNA-Amplifikation benötigen zur Strangsynthese Oligonucleotid-Primer, die an den Enden der zu amplifizierenden Moleküle angebracht werden. Reverse Transkription, PCR-Amplifikation und normale Transkription geben bestimmte Randbedingungen vor, die darüber entscheiden, welche Sequenzen mit hoher Effizienz amplifiziert werden können. Manche Sequenzen können verursachen, dass die Polymeraseenzyme anhalten oder vorzeitig abbrechen; im Selektionsexperiment wären diese Sequenzen dann benachteiligt. Der entscheidende Punkt ist aber, dass solchen benachteiligten Sequenzen eine große Zahl von gut tolerierten Sequenzen gegenübersteht – ganz anders als im Fall der Q $\beta$ -Replikase, wo eine sehr restriktive Selektion herrscht.

### 4.1. Selektion von RNA-Aptameren

Mit einer sequenzuniversellen Methode zur Amplifikation von Nucleinsäuren kann die Selektion von RNA-Phänotypen getrennt von der Amplifikation und Mutation eines zugehörigen RNA-Genotyps ausgeführt werden (Abbildung 4 A). Der Experimentator kann beliebige Selektionsbedingungen entwerfen, die auf die jeweiligen physikalischen und chemischen Eigenschaften der RNA abzielen. Zum Beispiel kann man die RNA auf ihre Fähigkeit zur Bindung an einen bestimmten Liganden selektieren.<sup>[10,29]</sup> Hierzu wird eine heterogene Population von RNAs einem immobilisierten Liganden ausgesetzt; die ungebundenen RNAs werden abgespült und die gebundenen RNAs zurückerhalten und selektiv amplifiziert. In mehreren Runden dieser Prozedur reichert sich die Population allmählich mit denjenigen RNA-Molekülen an, die am stärksten an den Liganden binden. Man nennt solche Moleküle Aptamere (von lat. aptus = passend),<sup>[20]</sup> und die Aptamergewinnung wird oft als SELEX-Prozess bezeichnet (systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung).<sup>[10]</sup>

Die ersten Aptamere waren kleine RNA-Moleküle, die an die T4-DNA-Polymerase<sup>[10]</sup> oder an organische Farbstoffe wie Cibacronblau<sup>[29]</sup> banden. In der Folgezeit wurden Hunderte von RNA- und DNA-Aptameren erhalten, die für verschiedenste Proteine und niedermolekulare Liganden spezifisch sind.<sup>[30–32]</sup> Mehrere RNA-Aptamere werden als mögliche therapeutische Wirkstoffe erforscht.<sup>[33–37]</sup> Ein Aptamer (Pegaptanib, Handelsname Macugen), das fest und spezifisch an den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor bindet, ist zur Behandlung von altersbedingter Makuladegeneration zugelassen.<sup>[38,39]</sup>



**Abbildung 4.** Allgemeines Schema für die In-vitro-Evolution funktionierender RNAs. A) Eine RNA wird durch reverse Transkription zur komplementären DNA (cDNA), Umwandlung der cDNA in doppelsträngige DNA (dsDNA) und Rücktranskription zur RNA amplifiziert. Auf der Stufe der dsDNA kann eine zusätzliche Amplifikation durch PCR vorgenommen werden. Während der PCR-Amplifikation können Mutationen eingeführt werden. Der Experimentator hat die Möglichkeit, einen Selektionsdruck zu erzeugen, in der Art, dass nur solche Moleküle, die eine auszuwählende Funktion ausüben, amplifiziert werden. B) RNA-Moleküle, die eine Bindungsbildung (links) oder eine Bindungsspaltung (rechts) zwischen reaktiven Gruppen R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> katalysieren, erwerben bzw. verlieren einen Marker (graues Kästchen). Nach Amplifikation der selektierten RNAs (kleine gegenläufige Pfeile) wird der ursprüngliche Terminus in den Tochterpopulationen wiederhergestellt.

## 4.2. Selektion von katalytischen RNAs

RNAs können anhand ihrer katalytischen Wirkung selektiert werden.<sup>[40]</sup> Es gibt eine Handvoll RNA-Enzyme (Ribozyme), die in der Natur entdeckt wurden, und eine sehr viel größere Zahl, die man durch In-vitro-Evolution im Labor erhalten hat. Zwei Ansätze für die Selektion katalytischer RNAs sind in Verwendung, je nachdem ob eine Bindungsbildung oder eine Bindungsspaltung bewirkt werden soll (Abbildung 4B). Eine Bindungsbildung zwischen zwei reaktiven Gruppen R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> kann als Grundlage für die Selektion dienen, indem eine der beiden Gruppen, R<sup>1</sup>, an jedes RNA-Molekül der Population gebunden wird und die andere reaktive Gruppe, R<sup>2</sup>, als Bestandteil eines separaten Substrats bereitgestellt wird. Jede RNA, die eine Bindung zwischen R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> hervorbringt, wird in einer Weise modifiziert, dass sie von nichtumgesetzten RNAs unterscheidbar ist. R<sup>2</sup> wird typischerweise mit einem chemischen Marker wie Biotin oder einem kurzen Oligonucleotid verknüpft, sodass die Bildung der R<sup>1</sup>-R<sup>2</sup>-Bindung darin resultiert, dass die reaktive RNA mit dem Marker versehen wird. Die markierten RNAs werden dann isoliert und selektiv amplifiziert. Im anderen Fall, bei einer Bindungsspaltung, geht man von einer Population von RNAs aus, die über eine R<sup>1</sup>-R<sup>2</sup>-Verknüpfung mit einem Marker verbunden sind. RNA-Moleküle, die die

Spaltung der R<sup>1</sup>-R<sup>2</sup>-Bindung katalysieren, werden vom Marker losgetrennt. Die markerfreien RNAs werden anschließend isoliert und selektiv amplifiziert.

## 4.3. Bedeutung der Diversität

Zusätzlich zu den Methoden der Amplifikation und Selektion benötigt die In-vitro-Evolution eine Methode zur Einführung von Mutationen. Die Polymeraseenzyme, die zur RNA-Amplifikation verwendet werden, haben eine Fehlerrate von nur 10<sup>-4</sup> bis 10<sup>-6</sup> pro Nucleotid.<sup>[41-43]</sup> Dies reicht nicht aus, um in einer evolvierenden Population von RNAs, die weniger als einige hundert Nucleotide enthalten, eine signifikante Sequenzheterogenität aufrechtzuerhalten, da fast jede Kopie identisch mit der Vorlage sein wird. Eine ideale Fehlerrate sollte im Durchschnitt ungefähr eine Mutation pro Kopie erzeugen. Dies würde eine Erforschung von gelegentlich auftretenden fehlerreichen Mutanten ermöglichen, aber keine ausufernde Akkumulation von Mutationen verursachen, die eine Anreicherung der vorteilhaften Sequenzen verhindern würde. Bezuglich der für die Evolution optimalen Fehlerrate gibt es zahlreiche theoretische und experimentelle Studien, die unter anderem zeigen, wie ein genetisches System beim Überschreiten einer „Fehlerschwelle“ die Fähigkeit verliert, genetische Information weiterzuvererben.<sup>[44-47]</sup>

Die am häufigsten eingesetzte Technik zur Einführung zufälliger Mutationen ist die fehlerhafte PCR (error-prone PCR).<sup>[48,49]</sup> Ein gängiges Protokoll, das mit einer Fehlerrate von 0.007 pro Nucleotid ohne signifikante Sequenzspezifität arbeitet, beruht auf der Anwendung veränderter Reaktionsbedingungen und ungleichmäßiger Konzentrationen der vier Desoxynucleosid-5'-triphosphate (dNTPs).<sup>[50]</sup> Ein ebenfalls verbreitetes Protokoll – bezeichnet als hypermutagene PCR – nutzt extremere Reaktionsbedingungen und eine erhöhte Zahl von Temperaturzyklen und erreicht eine Fehlerrate von 0.1 pro Nucleotid, ist dabei aber deutlich sequenzabhängig.<sup>[51]</sup> Ein etwas anderer Ansatz ist die Verwendung einer gentechnisch veränderten, thermostabilen DNA-Polymerase mit verringriger Polymerisationsgenauigkeit.<sup>[52,53]</sup> Zum Beispiel ergibt das Enzym Mutazym (Stratagene Inc.) eine Fehlerrate von 0.001 bis 0.007 pro Nucleotid, je nach Menge der eingesetzten DNA.

Ein In-vitro-Evolutionsexperiment beginnt normalerweise mit der Synthese einer heterogenen Population von RNAs. Hierzu kann man eine fehlerhafte PCR einsetzen, häufiger ist aber die Anwendung einer automatisierten DNA-Synthese mit Lösungen der vier Nucleosidphosphoramidite, die jeweils mit einer geringen, festzulegenden Menge der anderen drei Nucleotidbausteine versetzt werden.<sup>[54]</sup> Mit dieser Methode kann die Sequenzheterogenität der Anfangspopulation an jeder Nucleotidposition präzise vorgegeben werden. Wichtig ist es nun, Mutationen während der Evolutionsphase sowie über die Gesamtpopulation von Molekülen hinweg einführen zu können, was sich nicht durch chemische Synthese erreichen lässt. Wenn zusätzliche Mutationen in die Gesamt-population eingeführt werden, so verteilen sich diese entsprechend der Zahl der verschiedenen Sequenzen, die zu-

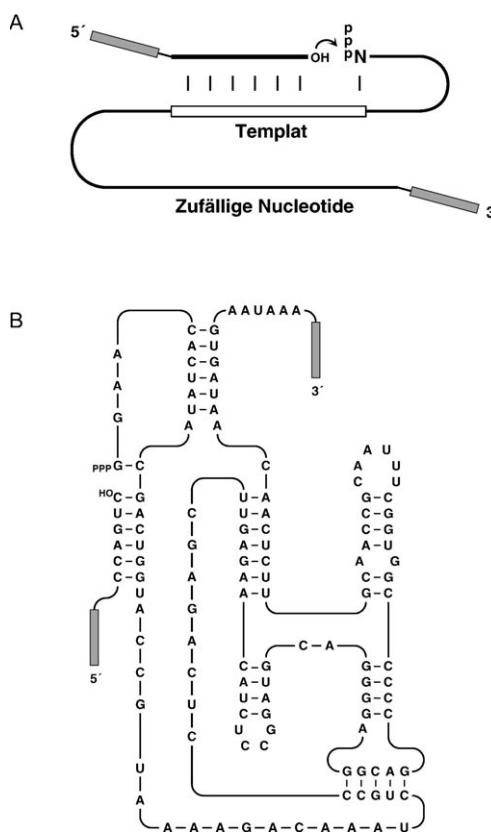
sammen die Population bilden. Die vorteilhaften Sequenzen, die in höherer Zahl vorhanden sind, bekommen automatisch einen proportional größeren Anteil der neu eingeführten Mutationen, sodass die Evolution weiter in Richtung solcher Sequenzen gelenkt wird, die sich bis dahin schon als vorteilhaft erwiesen haben. Es ist zwar nicht garantiert, dass vorteilhafte Sequenzen im Laufe der Zeit zu immer vorteilhafteren evolvieren, wenn man aber annimmt, dass nah verwandte Sequenzen vermutlich ähnliche Phänotypen haben, so ist dies der wirksamste Weg, die Suche durchzuführen.

## 5. Ein ganz besonderer Phänotyp

Durch In-vitro-Evolution wurden Ribozyme erhalten, die eine Vielfalt von bindungsbildenden Reaktionen katalysieren, z.B. die Bildung eines RNA-Phosphodiesters,<sup>[55]</sup> einer Peptidbindung,<sup>[56]</sup> einer glycosidischen Bindung,<sup>[57]</sup> eines Diels-Alder-Cycloadditionsprodukts,<sup>[58,59]</sup> eines Michael-Additionsprodukts<sup>[60]</sup> und eines Aldolkondensationsprodukts.<sup>[61]</sup> Weitere Ribozyme wurden erhalten, die Bindungsspaltungen katalysieren, z.B. die Spaltung von DNA- oder RNA-Phosphoestern,<sup>[62,63]</sup> die Hydrolyse eines Carbonsäureesters,<sup>[64]</sup> einen Aminoacyl-Transfer<sup>[65]</sup> und die Hydrolyse eines Thionophosphats.<sup>[66]</sup>

Jede dieser Reaktionen wäre eine gesonderte Betrachtung wert; herausragende Bedeutung für die in diesem Aufsatz diskutierte Thematik hat jedoch die Verknüpfung von RNA-Molekülen an RNA-Templaten. Besonders wichtig ist die templatgelenkte Reaktion der 3'-Hydroxygruppe eines Oligonucleotids mit einem Nucleosid-5'-triphosphat, die zur Bildung eines 3',5'-Phosphodiesters unter Freisetzung eines anorganischen Pyrophosphats führt. Dies ist im Grunde die gleiche Reaktion, wie sie von den RNA-Polymeraseproteinen einschließlich der Qβ-Replikase ausgeführt wird. Wenn man ein Ribozym erhalten könnte, das diese Reaktion genau und effizient katalysiert, so könnte dieses anstelle der Qβ-Replikase (oder einer Kombination von Polymeraseproteinen) in einem In-vitro-Evolutionsexperiment eingesetzt werden. Besonders interessant wäre, wenn es sich bei der zu evolvierenden RNA um das RNA-Replikaseribozym selbst handelte. Die Evolution würde dann selbsterhaltend verlaufen, wobei alle informationstragenden Makromoleküle, die für den Evolutionsprozess benötigt werden, Bestandteil des evolvierenden Systems wären.

Im Standardverfahren zur Erzeugung von Ribozymen mit Polymeraseaktivität wird eine Population von 5'-Triphosphat-RNAs vorgelegt, der die Anforderung gestellt wird, mit einem Oligonucleotid-Substrat mit 2',3'-Hydroxygruppen zu reagieren (Abbildung 5 A). Die ligierten Produkte können in verschiedener Weise selektiert werden, z.B. aufgrund ihrer verminderten Beweglichkeit in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel oder anhand einer Markersequenz oder Biotineeinheit im gebundenen Substrat. Um die Bildung des 3',5'- anstelle des 2',5'-Phosphodiesters zu begünstigen, hat es sich als wichtig erwiesen, die Watson-Crick-Paarbildung in der Umgebung der Ligationsstelle zu verstärken<sup>[67]</sup> oder Gegenmaßnahmen zu treffen, um Katalysatoren mit 2',5'-Ligaseaktivität auszuschalten.<sup>[68]</sup> Die 3',5'-Verknüpfung ist von



**Abbildung 5.** In-vitro-Evolution eines RNA-Ligaseribozyms, ausgehend von einer RNA-Population zufälliger Sequenz.<sup>[55]</sup> A) Die Selektion beruht auf dem Angriff einer 3'-Hydroxygruppe eines templatgebundenen Oligonucleotid-Substrats am 5'-Triphosphat der RNA. Nur diejenigen RNA-Moleküle, die die Reaktion eingehen, enthalten hinterher beide Bindungsstellen für die Primer (graue Kästchen), die für die reverse Transkription und die PCR-Amplifikation benötigt werden. B) Sequenz und Sekundärstruktur der b1-207-Form der Klasse-I-Ligase, die nach 14 Runden der In-vitro-Evolution erhalten wurde.<sup>[69,70]</sup>

besonderem Interesse, weil sie in biologischen RNAs auftritt und in denjenigen RNA-Molekülen vorliegt, die aus dem Evolutionsexperiment als Ligations-Katalysatoren hervorgehen. Sobald ein RNA-Ligaseribozym erhalten wurde, kann dieses weiterentwickelt werden, um die templatgestützte Addition von NTPs zu katalysieren, was schlussendlich zur Entwicklung einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase führt.

### 5.1. Ein Ribozym, das RNAs zusammenfügt

Das erste In-vitro-Evolutionsexperiment, das ein RNA-Ligaseribozym lieferte, wurde 1993 von Bartel und Szostak beschrieben.<sup>[55]</sup> Genau genommen isolierten die Autoren drei unterschiedliche Ligasen, von denen aber nur eine, die Klasse-I-Ligase, die Bildung eines 3',5'-Phosphodiesters katalysierte.<sup>[69]</sup> Diese Ligase wurde ausgehend von einer Anfangspopulation von  $10^{15}$  unterschiedlichen RNA-Molekülen erhalten, von denen jedes ein 5'-Triphosphat trug und eine Zentralregion von 220 Nucleotiden zufälliger Sequenz enthielt. Die Anforderung an die Moleküle war, über ihr 5'-Ende eine Ligation mit einem Oligonucleotid-Substrat einzugehen.

Zur Selektion wurden die Produkte an einer Affinitätsäule mit substratspezifischem Oligonucleotid hybridisiert und der PCR-Amplifikation mit einem für die ligierte Substratsequenz spezifischen Primer unterzogen. Diese selektive Amplifikationsprozedur wurde über zehn Runden wiederholt, wobei die Reaktionszeit von der ersten bis zur letzten Runde von 16 Stunden auf 10 Minuten herabgesetzt wurde. Nach der vierten, fünften und sechsten Runde wurden mithilfe fehlerhafter PCR zufällige Mutationen eingeführt.

Nach der zehnten Runde wurden Individuen der Population kloniert, sequenziert und auf katalytische Aktivität getestet. Der aktivste Katalysator, der identifiziert wurde, war die Klasse-I-Ligase. Diese enthält 186 Nucleotide und bringt es auf eine Katalysegeschwindigkeit von  $0.029 \text{ min}^{-1}$  (gemessen in Gegenwart von 60 mM MgCl<sub>2</sub> und 200 mM KCl bei pH 7.4 und 22 °C).<sup>[69]</sup> Dieses Molekül wurde mit einer Mutationshäufigkeit von 20 % pro Nucleotid nochmals randomisiert und vier weiteren selektiven Amplifikationsrunden unterzogen. Basierend auf den Sequenzen der zum Schluss isolierten Moleküle wurden verkürzte Formen der Klasse-I-Ligase entworfen und getestet. Eine dieser Ligasen, bezeichnet als b1-207-Ribozym (Abbildung 5B), enthält 119 Nucleotide und erreicht eine Katalysegeschwindigkeit von  $14.4 \text{ min}^{-1}$  (gemessen unter den gleichen Bedingungen wie zuvor).<sup>[70]</sup> Unter drastischeren Reaktionsbedingungen (z.B. pH 9.0) und mit einigen geringfügigen Sequenzänderungen kann das b1-207-Ribozym eine Geschwindigkeit von  $360 \text{ min}^{-1}$  erzielen, der höchste Wert, der je für eine RNA-katalysierte Reaktion dokumentiert wurde.<sup>[71]</sup> Die Geschwindigkeit der unkatalysierten templatunterstützten RNA-Ligation beträgt  $2 \times 10^{-7} \text{ min}^{-1}$  bei pH 7.4 und  $1 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}$  bei pH 9.0.<sup>[72]</sup>

## 5.2. Eine Menagerie von Ligaseribozymen

Fünf weitere Ribozyme wurden durch In-vitro-Evolution erhalten, die die templatunterstützte Verknüpfung der 3'-Hydroxygruppe eines Oligonucleotids mit dem 5'-Triphosphat eines zweiten Oligonucleotids katalysieren (Tabelle 1). Eines dieser Ribozyme, die hc-Ligase, wurde von 85 Nucleotiden zufälliger Sequenz abgeleitet, die an ein Strukturgerüst gebunden wurden, das in Form einer unabhängigen Faltungsdomäne in einem natürlich vorkommenden Ribozym auftritt.<sup>[73]</sup> Nach zehn Runden selektiver Amplifikation (mit mehreren Schritten fehlerhafter PCR) wurde ein Ribozym erhalten, das 337 Nucleotide enthält und eine Katalysegeschwindigkeit von  $0.26 \text{ min}^{-1}$  erreicht (gemessen in Gegen-

wart von 50 mM MgCl<sub>2</sub> und 200 mM KCl bei pH 7.5 und 50 °C). Die Bezeichnung hc-Ligase leitet sich davon ab, dass das Ribozym in der helicalen Umgebung (*helical context*) eines Watson-Crick-Doppelstrangs sequenzuniversell operiert. Ähnlich wie bei der Klasse-I-Ligase ist das Templat der hc-Ligase gleichzeitig Bestandteil des Ribozyms und kein separates Molekül.

In weiteren Experimenten wurde daher versucht, die hc-Ligase so zu modifizieren, dass sie intermolekular an einem externen Templat-Substrat-Komplex agiert,<sup>[74]</sup> wie es die RNA-Polymeraseproteine tun. Der Templat-Substrat-Komplex wurde zunächst über einen langen Oligouridylat-Linker an das Ribozym gebunden, um so eine pseudo-intermolekulare Reaktion zu bewirken. Anschließend waren 18 Evolutionsrunden erforderlich, um ein Ribozym hervorzubringen, das vollständig intermolekular an einem Templat-Substrat-Komplex operieren kann (mit einer Katalysegeschwindigkeit von  $k_{\text{cat}} = 0.074 \text{ min}^{-1}$  und einer Michaelis-Menten-Konstanten ( $K_M$ ) von 3.9 μM, gemessen unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie zuvor). Sowohl die Klasse-I-Ligase, die an einem internen Templat operiert, wie auch die hc-Ligase, die an einem externen Templat operiert, sind nur eingeschränkt in der Lage, die Addition von NTPs an das 3'-Ende eines Oligonucleotid-Primers zu katalysieren.<sup>[74,75]</sup> Wie wir in Abschnitt 6.1 diskutieren werden, wurde die Klasse-I-Ligase jedoch zu einer Variante weiterentwickelt, die an einem externen Templat operiert und bis zu 14 aufeinander folgende NTPs anfügen kann.<sup>[76]</sup>

Drei weitere durch In-vitro-Evolution erzeugte Ribozyme mit der Aktivität einer 3',5'-Ligase sind die L1-, R3C- und DSL-Ligasen.<sup>[77–79]</sup> Sie haben einen ähnlichen Aufbau mit einer zentralen Drei-Helix-Kreuzung, die einige Basenpaare von der Ligationsstelle entfernt ist, und sie erreichen eine Katalysegeschwindigkeit von 0.1–0.4 min<sup>-1</sup>. Die L1-Ligase hat die ungewöhnliche Eigenschaft, dass ihre Aktivität von der Gegenwart des DNA-Primers abhängt, der verwendet wurde, um bei der selektiven Amplifikation den Schritt der reversen Transkription auszulösen.<sup>[77,80]</sup> Die Ursache ist, dass der Primer während der Ligationsreaktion in der Lösung vorhanden war und von der Ligase zur Bildung einer Stamm-Struktur genutzt wurde, die Teil des katalytischen Motivs ist.

Kürzlich wurde eine Röntgenkristallstruktur einer modifizierten Form der L1-Ligase mit 2.6 Å Auflösung gelöst.<sup>[81]</sup> Dies ist das einzige Ligaseribozym, für das eine Struktur in atomarer Auflösung zur Verfügung steht. In der Struktur liegen tertiäre Wechselwirkungen zwischen phylogenetisch konservierten Resten in der Nähe der Drei-Helix-Kreuzung und Nucleotiden in unmittelbarer Nachbarschaft zur Ligationsstelle vor. Die Wechselwirkungen umfassen ein GAU-Basentriplett sowie ionische Wechselwirkungen zwischen einem koordinierten Mg<sup>2+</sup>-Ion und drei Phosphatgruppen. Die Struktur lässt vermuten, dass das Ribozym weder mit anderen Sequenzen an der Ligationsstelle wirksam wäre noch einen intermolekularen Templat-Substrat-Komplex binden kann. Es

**Tabelle 1:** Durch In-vitro-Evolution erzeugte Ribozyme, die die Bildung einer 3',5'-Phosphodiesterbindung zwischen zwei templatgebundenen RNAs katalysieren.

Ligase	Variante	Selektionsrunden	Länge [nt]	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	[Mg <sup>2+</sup> ] [mM]	pH	T [°C]	Lit.
Klasse I	b1-207	14	119	14.4	60	7.4	22	[69, 70]
hc	hc16	10	337	0.26	50	7.5	50	[73]
L1	R8-9	13	96	0.37	60	7.7	25	[77, 80]
R3	R3C	16	71	0.32	25	8.5	23	[78]
DSL	cis-DSL-1S	9	140	0.12	50	7.7	37	[79]
P4-P6	Klon I	11	153	0.003	80	8.5	37	[83]

scheint daher unwahrscheinlich, dass die L1-Ligase durch In-vitro-Evolution zu einem Polymeraseribozym evolviert werden kann.

Die R3C-Ligase dürfte ebenfalls kein guter Ausgangspunkt für die Entwicklung eines RNA-Polymeraseribozyms sein, weil sie ebenfalls nicht in der Lage scheint, einen intermolekularen Templat-Substrat-Komplex zu binden. Allerdings konnte die R3C-Ligase genutzt werden, um den Zusammenhang zwischen konstitutiver Komplexität und Evolvierbarkeit der katalytischen Funktion zu untersuchen.<sup>[78]</sup> Die ursprüngliche Version dieser Ligase wurde nach zehn Runden der In-vitro-Evolution erhalten, ausgehend von einer Population von RNAs zufälliger Sequenz, die Adenosin, Guanosin und Uridin, aber kein Cytidin enthielten. Sie trägt die Bezeichnung R3-Ligase („random 3-letter“), enthält 74 Nucleotide (25 A, 32 U, 17 G) und erreicht einen  $k_{cat}$ -Wert von 0.013 min<sup>-1</sup> sowie einen  $K_m$ -Wert von 6.2 μm (gemessen in Gegenwart von 25 mM MgCl<sub>2</sub> und 50 mM KCl bei pH 8.5 und 23°C). Die R3-Ligase wurde anschließend mit Cytidinresten in einer Häufigkeit von 1% pro Nucleotidposition versehen, einer hypermutagenen PCR unterzogen und sechs weiteren Runden der In-vitro-Evolution ausgesetzt. Diese Prozedur führte zur R3C-Ligase, die 73 Nucleotide enthält (22 A, 24 U, 20 G, 7 C) und einen  $k_{cat}$ -Wert von 0.32 min<sup>-1</sup> sowie einen  $K_m$ -Wert von 0.4 μm erzielt (gemessen unter den gleichen Bedingungen wie zuvor). Das hinzugefügte Cytidin resultierte in einer 25fach höheren Katalysegeschwindigkeit, was einer Umlagerung der Drei-Helix-Kreuzung und einer damit verbundenen höheren Stabilität der GC-Paare in der Umgebung der Kreuzung zugeschrieben wurde.

In einem umgekehrten Experiment wurde die R3-Ligase so verändert, dass sie nur noch zwei Arten von Nucleotiden enthielt: 2,6-Diaminopurin (D) und Uracil.<sup>[82]</sup> Zuerst wurden dabei alle Adeninreste durch Diaminopurin ersetzt, dann die GU-Paare durch DU-Paare und schließlich die ungepaarten Guaninreste durch jeweils gleiche Anteile von Diaminopurin und Uracil. Danach wurden zehn Runden In-vitro-Evolution ausgeführt, die zur 83 Nucleotide (50 D und 33 U) enthaltenden R2-Ligase führten. Dieses Ribozym erreicht nur eine Katalysegeschwindigkeit von 0.0011 min<sup>-1</sup>. Die R2-Ligase kann wegen ihrer hohen Selbstkomplementarität sehr leicht andere Konformationen einnehmen, und nur 6–8% der Moleküle falten in die aktive Konformation. Die Katalysegeschwindigkeit der R2-Ligase ist 12-mal niedriger als die der R3-Ligase, dies entspricht aber immer noch einer Beschleunigung um den Faktor  $3.6 \times 10^4$  gegenüber der unkatalysierten Reaktion. Das Beispiel der R2-Ligase zeigt auf, wie die Darwinsche Evolution eine makromolekulare Funktion selbst ausgehend von einem stark eingeschränkten Satz von chemischen Bausteinen erzeugen kann.

Das neueste Ribozym mit 3',5'-Ligase-Aktivität ist die DSL-Ligase („designed and selected ligase“),<sup>[79]</sup> die von Inoue und Mitarbeitern mit einem ähnlichen Ansatz wie zur Evolution der hc-Ligase erzeugt wurde. Die Anfangspopulation von RNAs enthielt 30 Nucleotide zufälliger Sequenz, die an ein Strukturgerüst konjugiert wurden, das von einem natürlich vorkommenden Ribozym abgeleitet war. Zusätzlich wurden tertiäre Erkennungselemente in die Moleküle eingebaut, die nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen dem

Strukturgerüst und dem Templat-Substrat-Komplex ermöglichen. Während der In-vitro-Evolution wurde das Templat mit dem 5'-Ende der Gerüstdomäne verbunden, man hoffte aber, dass die tertiären Erkennungselemente dem Ribozym letztlich die Möglichkeit geben würden, an einem freien Templat-Substrat-Komplex zu operieren. Die DSL-Ligase wurde nach insgesamt zehn Runden In-vitro-Evolution erhalten. Die aktivste Form enthält 140 Nucleotide und erreicht eine Katalysegeschwindigkeit von 0.12 min<sup>-1</sup> (gemessen in Gegenwart von 50 mM MgCl<sub>2</sub> und 200 mM KCl bei pH 7.7 und 37°C). Die Ligase kann auf 60 Nucleotide verkürzt werden und ist tatsächlich in der Lage, mit einem freien, externen Templat-Substrat-Komplex zu reagieren, solange der Komplex die passenden tertiären Erkennungselemente enthält.

Ein weiteres 3',5'-Ligaseribozym erhielten Inoue und Mitarbeiter durch einen ähnlichen Ansatz, bei dem ein größeres Strukturgerüst verwendet und der Entwurf weniger modular gestaltet wurde.<sup>[83]</sup> Das erzeugte Ribozym, das die Autoren von der P4-P6-Domäne des natürlich vorkommenden *Tetrahymena*-Ribozyme ableiteten, erzielte eine Katalysegeschwindigkeit von nur 0.0027 min<sup>-1</sup> (gemessen in Gegenwart von 80 mM MgCl<sub>2</sub> und 50 mM KCl bei pH 8.5 und 37°C). Eine weitere evolutionäre Optimierung wurde bislang nicht unternommen, zumal die DSL-Ligase die interessanteren Eigenschaften hat. Die DSL-Ligase hat das Potenzial, zu einer RNA-Polymerase evolviert zu werden. Ähnlich wie die Klasse-I- und hc-Ligasen kann sie die templatunterstützte Addition von NTPs an das 3'-Ende eines Oligonucleotid-Primers katalysieren.<sup>[79]</sup> Bevor die DSL-Ligase aber jemals als eine Polymerase agieren kann, müssen die tertiären Erkennungselemente, die in einer auf den Templat-Substrat-Komplex bezogenen Position fixiert sind, durch ein anderes Erkennungselement ersetzt werden, das mit den zunehmend größer werdenden Produkten der Polymeraseverlängerung zurechtkommt.

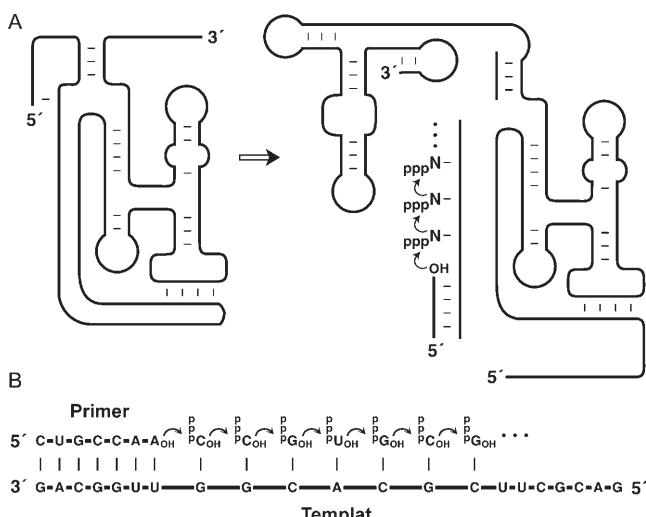
## 6. Evolution eines RNA-Polymeraseribozyme

### 6.1. Von der Ligase zur Polymerase

Das einzige Ligaseribozym, das bislang zu einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase evolviert werden konnte, ist die Klasse-I-Ligase.<sup>[76]</sup> Bartel und Mitarbeiter gingen dabei von der b1-207-Form dieses Ribozyme aus (Abbildung 5B), führten zufällige Mutationen ein und konjugierten 76 Nucleotide zufälliger Sequenz an das 3'-Ende. Die interne Templatregion wurde deletiert, und stattdessen wurde ein externes Templat bereitgestellt. Weiterhin wurde der Oligonucleotid-Primer über eine 5',5'-Phosphodiesterbindung an das 5'-Ende des Ribozyme angefügt. An die Population dieses RNA-Konstrukts wurde die Anforderung gestellt, die templatgelenkte Addition von NTPs an das 3'-Ende des Primers zu katalysieren. Die Selektion erfolgte durch Anlagerung eines chemischen Markers (N6-Biotinyladenin oder 4-Thiouracil), der im letzten zu addierenden NTP enthalten war. Ribozyme, die ein N6-Biotinyl-ATP einbauten, wurden über die Bindung an Streptavidin selektiert, während solche, die 4-Thio-UTP einbauten, über die Wechselwirkung des Thiols mit

in Polyacrylamid eingelagertem *N*-Acryloylaminophenylquecksilberacetat und der entsprechend verzögerten Mobilität selektiert wurden. Der Biotin-Marker ergab einige unerwünschte Nebeneffekte, wogegen die 4-Thiouracil-Methode sehr erfolgreich zur selektiven Anreicherung von Ribozymen führte, die die NTP-Addition katalysieren.

Nach zehn Runden In-vitro-Evolution wurden Individuen aus der Population kloniert und sequenziert. Dabei wurde ein einzelner Klon identifiziert, der über einen templatvermittelten Mechanismus mehrere NTPs an das 3'-Ende eines externen Oligonucleotid-Primers anfügte.<sup>[76]</sup> Dieser spezielle Klon wurde in zufälliger Weise mutiert und acht weiteren Evolutionsrunden ausgesetzt. Abermals wurden Individuen aus der Population isoliert, und ein Klon mit besonders robuster Polymeraseaktivität wurde identifiziert. Dieser wurde anhand eines Vergleichs mit Sequenzen anderer aktiver Klone weiter modifiziert, sodass letztlich ein als „18.12.23“ bezeichnetes Ribozym erhalten wurde (auch als Class-I-derived-Polymerase bezeichnet). Dieses bemerkenswerte Ribozym, das 189 Nucleotide enthält, ist in der Lage, bis zu 14 NTPs nacheinander an ein externes RNA-Templat zu polymerisieren (Abbildung 6). Es weist eine hohe Genauigkeit bei der Nucleotid-Addition auf und kann an verschiedenen Templatsequenzen operieren.



**Abbildung 6.** RNA-katalysierte Polymerisation von RNA. A) Die als Ribozym agierende Klasse-I-Ligase (links) wurde zu einer RNA-Polymerase (rechts) weiterentwickelt, die die Addition von NTPs an das 3'-Ende eines templatgebundenen Oligonucleotid-Primers katalysiert. B) In Gegenwart eines speziellen Templat (aus 21 Nucleotiden) und eines komplementären Primers (aus 7 Nucleotiden) kann die Polymerase die Addition von bis zu 14 NTPs katalysieren und so ein vollständiges Doppelstrangprodukt liefern.

## 6.2. Eine robustere RNA-Polymerase

Bei näherer Betrachtung des Polymeraseribozyms lassen sich mehrere Einschränkungen erkennen: So beträgt z. B. die Katalysekonstante für die NTP-Addition zwar über  $1 \text{ min}^{-1}$ , der  $K_M$ -Wert für das Konjugat mit dem externen Templat-Primer-Komplex ist aber unmessbar groß und liegt über

1 mm.<sup>[76,84]</sup> In der Praxis bedeutet dies, dass bei typischen Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  des Templat-Primer-Komplexes ungefähr zwei Stunden für ein erfolgreiches Substratbindungsereignis benötigt werden. Mit den meisten Templaten weist das Ribozym eine nur geringe Prozessivität auf, d. h., es ist kaum in der Lage, mehrere NTPs anzufügen, bevor es vom Templat-Primer-Komplex dissoziiert.<sup>[84]</sup> Für das nächste erfolgreiche Bindungsereignis werden daher weitere zwei Stunden benötigt. Die Phosphodiesterbindungen des Ribozys werden unter den bevorzugten Reaktionsbedingungen von 200 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.5 und 22°C mit einer Geschwindigkeitskonstanten von ca.  $10^{-2} \text{ min}^{-1}$  nichtspezifisch gespalten.<sup>[85]</sup> Dies bedeutet, dass im Wettlauf zwischen NTP-Addition und Ribozymabbau zwölf NTPs in 24 Stunden addiert werden können, sehr viel mehr ist aber nicht möglich, da das Ribozym dann weitgehend abgebaut ist.

Eine zweite Einschränkung des 18.12.23-Polymerase-ribozys besteht darin, dass es zwar unter Verwendung eines speziellen Templat bis zu 14 NTPs anfügen kann, mit vielen anderen Templaten aber nur einige wenige NTPs bewältigt.<sup>[84]</sup> Schon eine kleine Veränderung in der Sequenz des Templat verringert das Ausmaß der NTP-Addition drastisch. Eine dritte Einschränkung ist schließlich, dass zwar die Genauigkeit der Templatvervielfältigung bezogen auf das Vollängenprodukt hoch ist, die Gesamtgenauigkeit aber beträchtlich darunter liegt, weil der Einbau eines falschen NTP die nachfolgende Strangverlängerung deutlich verlangsamt.<sup>[86]</sup> Eine vierte Einschränkung ist schließlich, dass die Affinität der NTP-Bindung zum Templat hauptsächlich von der Stärke der Watson-Crick-Basenpaare bestimmt wird, was eine hohe Konzentrationen von NTPs erforderlich macht und dazu führt, dass GC-Basenpaare generell bevorzugt sind.<sup>[76]</sup>

Im Prinzip kann man jede dieser Einschränkungen durch weitere Evolution überwinden, und es wurden auch einige Versuche in diese Richtung unternommen. Lawrence und Bartel kehrten nochmals zu derjenigen Ribozympopulation zurück, die nach den ersten drei Runden der In-vitro-Evolution zur Verbesserung der Polymeraseaktivität erhalten worden war, und schlugen davon ausgehend einen anderen Weg ein.<sup>[87]</sup> Sie selektierten nicht in Bezug auf den Einbau von N6-Biotinyladenin-Resten, die sich in vorherigen Studien als problematisch erwiesen hatten, sondern in Bezug auf den Einbau von zwei 4-Thiouracil-Resten. Zur Selektion wurden die umgesetzten Moleküle an der Grenzfläche zwischen einem Standard-Polyacrylamidgel und einem Quecksilberhaltigen Polyacrylamidgel abgefangen. Nach elf Evolutionsrunden konnten mehrere neue Ribozymotive identifiziert werden, von denen sich einige als brauchbare Polymerasen erwiesen; keine erreichte aber das Leistungsvermögen der zuvor identifizierten 18.12.23-Polymerase.

In einer neueren Studie verwendeten Zaher und Unrau eine Wasser-in-Öl-Emulsion, um Ribozympolymerasen anhand ihrer Aktivität in isolierten Kompartimenten der Emulsion zu selektieren.<sup>[86]</sup> Als Startsystem wählten sie die 18.12.23-Polymerase und mutierten diese mit einer Häufigkeit von 3% pro Nucleotidposition in der ursprünglichen Ligasedomäne und 10% pro Nucleotidposition in der angefügten 3'-terminalen Domäne. Eine Population ribozymkodierender DNAs wurde in den einzelnen Kompartimenten

der Emulsion verteilt, die außerdem T7-RNA-Polymerase, die vier NTPs und ein Templat für die RNA-katalysierte Primerverlängerung enthielten. Der RNA-Primer wurde an das 3'-Ende der ribozymkodierenden DNA konjugiert. Innerhalb der Kompartimente setzte Transkription ein, und die entstehenden RNAs wurden nach ihrer Fähigkeit zur Verlängerung des Primers selektiert; auf diese Weise wurden diejenigen DNAs markiert, die für die Ribozyme kodieren, welche die Primerverlängerung katalysieren. Die markierten DNAs wurden aus der Emulsion gewonnen und amplifiziert, und die erhaltenen DNA-Kopien wurden in einem neuen Satz von Kompartimenten verteilt. Um große und diverse Ribozympopulationen untersuchen zu können, wurden Methoden entwickelt, die die Handhabung von 3 L der Wasser-in-Öl-Emulsion mit ca.  $10^{15}$  unterschiedlichen Individuen ermöglichen.

Nach sechs Runden selektiver Amplifikation in den Kompartimenten wurde ein Ribozym identifiziert – bezeichnet als B6.61 –, das rund dreifach schneller katalysierte als die 18.12.23-Polymerase.<sup>[86]</sup> Auch dieses Ribozym bindet nur schwach an den Templat-Primer-Komplex, kann aber 20 NTPs nacheinander an ein externes RNA-Templat polymerisieren. Diese Verbesserung ist vor allem auf die höhere Genauigkeit der B6.61-Polymerase zurückzuführen, die die Wahrscheinlichkeit eines Kettenabbruchs durch Einbau eines falschen NTP verringert.

Ein RNA-Polymeraseribozym, das lange RNA-Template beliebiger Sequenz kopieren kann, steht bislang nicht zur Verfügung, allerdings scheint die Entwicklung eines solchen Katalysators durchaus machbar. Vielleicht führt die weitere Evolution von Abkömmlingen der Klasse-I-Ligase zum Erfolg. Voraussetzung wäre eine verbesserte Erkennung des externen Templat-Substrat-Komplexes und eine noch höhere Genauigkeit und Sequenztoleranz. Vielleicht ist es möglich, durch weitere Evolution des DSL-Liganden oder eines der anderen oben diskutierten Ligaseribozyme ein effizientes Polymeraseribozym zu erhalten. Wahrscheinlicher ist aber, dass man wieder bei einem großen Pool von RNAs zufälliger Sequenz beginnen muss und eine große Zahl von Evolutionsrunden zur Selektion eines Polymeraseribozyms ausführen muss. Bislang hat niemand eine Ligase evolviert, die von Beginn an auf ihre Fähigkeit zur Katalyse der NTP-Addition an einen externen Templat-Substrat-Komplex selektiert wurde. Mit zunehmenden Fortschritten bei den Methoden der In-vitro-Evolution – Beispiele hierfür sind die Verwendung von Wasser-in-Öl-Emulsionen sowie Erkenntnisse über niedermolekulare Cofaktoren, die die RNA-Katalyse unterstützen können – rückt die Entwicklung eines robusten RNA-Polymeraseribozyms in greifbare Nähe.

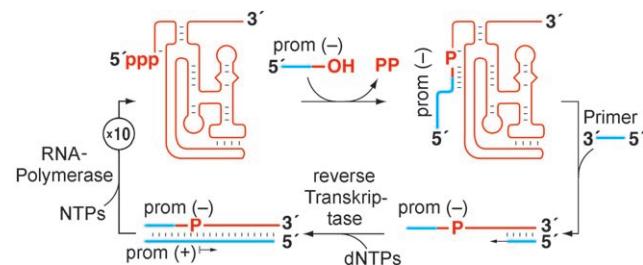
## 7. Evolution von Ribozymen durch seriellen Transfer

Wenn es gelänge, ein ausreichend leistungsfähiges RNA-Polymeraseribozym zu entwickeln, könnte dieses genutzt werden, um anstelle der Q $\beta$ -Replikase die In-vitro-Evolution einer RNA durch seriellen Transfer auszuführen. Genau wie die Q $\beta$ -Replikase müsste das Replikaseribozym Plus- und Minus-Strände der evolvierenden RNAs vervielfältigen

können. Außerdem würde ein Mechanismus benötigt, der die beiden Strände des RNA-Doppelstrangs trennt, ähnlich wie es die Q $\beta$ -Replikase tut, indem sie eine Faltung des neu synthetisierten Strangs verursacht und ihn dadurch vom Templat löst.<sup>[88]</sup> Anders jedoch als die Q $\beta$ -Replikase könnte ein solches Replikaseribozym in der Lage sein, ein breites Spektrum von Templatsequenzen zu vervielfältigen, sodass die Entwicklung von RNAs mit katalytischer Funktion, einschließlich Polymeraseaktivität, möglich würde.

### 7.1. Kontinuierliche Evolution

Die meisten In-vitro-Evolutionsexperimente mit Ribozymen wurden schrittweise ausgeführt, wobei das Reaktionsmaterial in aufeinander folgenden Runden von selektiver Amplifikation und Mutation umfangreich manipuliert wird. Mit bestimmten Ligaseribozymen ist es aber möglich, die RNAs auf kontinuierliche Weise mithilfe einer seriellen Transferprozedur zu evolvieren, wie sie ähnlich von Spiegelman beschrieben wurde (Abbildung 7).<sup>[89]</sup> Die Reaktionsmi-



**Abbildung 7.** Kontinuierliche In-vitro-Evolution des Klasse-I-Ligaseribozyme.<sup>[89]</sup> Das Ribozym katalysiert die Ligation eines chimären DNA-RNA-Substrats an sein 5'-Ende (blaue DNA, rote RNA). Das Substrat hat die Sequenz des T7-RNA-Polymerasepromotors (prom). Die reverse Transkription der umgesetzten Ribozyme – nicht aber der nichtumgesetzten – ergibt doppelsträngige Moleküle, die durch die T7-RNA-Polymerase transkribiert werden und vielfache Kopien der Tochter-RNA erzeugen. Das 5'-Triphosphat (PPP) wird bei der Transkription wiederhergestellt, und der nächste Replikationszyklus kann beginnen.

schung für die kontinuierliche Evolution von Ribozymen ist komplexer als die zur Evolution der Q $\beta$ -RNA eingesetzte Mischung: Benötigt werden Startribozyme, das Substrat für die RNA-katalysierte Ligation, die beiden Polymeraseproteine (reverse Transkriptase und T7-RNA-Polymerase) für die isotherme RNA-Amplifikation, der DNA-Primer zur Initiierung der cDNA-Synthese, die vier dNTPs, die vier NTPs, MgCl<sub>2</sub>, KCl sowie Puffer. Das Substrat mit der Sequenz des T7-RNA-Polymerasepromotors ist ein chimäres Molekül, das fünf oder mehr Desoxyribonucleotide an seinem 5'-Ende und ein oder mehrere Ribonucleotide an seinem 3'-Ende trägt.<sup>[90]</sup>

Jedes Ribozym in der Reaktionsmischung, das ein Substratmolekül an sein 5'-Ende ligiert (durch Reaktion zwischen der 3'-Hydroxygruppe des Substrats und dem 5'-Triphosphat des Ribozyme), wird also zugleich mit der Promotorsequenz ausgestattet. Diejenigen RNAs, die diese Umsetzung eingehen, werden durch reverse Transkription in doppelsträngige Moleküle überführt, die beide Strände des T7-Promotors

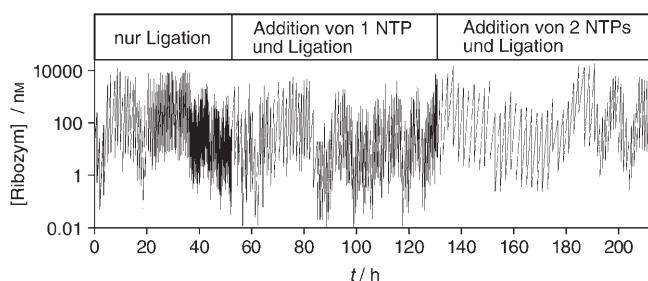
enthalten. Nichtumgesetzte RNAs werden ebenfalls revers transkribiert, wobei aber die RNA in Form eines RNA-DNA-Heterodoppelstrangs maskiert wird, der unreaktiv ist und keinen Promotor trägt. Moleküle, die den doppelsträngigen Promotor enthalten, werden von der T7-RNA-Polymerase erkannt, die dann vielfache Kopien der RNA erzeugt, von denen jede ein 5'-Triphosphat trägt. Die Transkription beginnt an der durch die RNA-katalysierte Ligation erhaltenen Verbindungsstelle. Die neu synthetisierten RNAs liegen daher in einer Form vor, in der sie in der Lage sind, weitere Ligationen einzugehen.

Die kontinuierliche Evolution läuft solange, bis der Vorrat an Substratmolekülen (oder einem anderen umsatzbestimmenden Reagens) erschöpft ist. Man kann der Reaktionsmischung Aliquote entnehmen und in neue Reaktionsgefäß mit frischem Materialvorrat überführen. Nur diejenigen Ribozyme, die mit dem Aliquot überführt werden, haben Gelegenheit, in der nächsten Reaktionsmischung zu reagieren. Damit ein Ribozym überleben kann, müssen mehrere Bedingungen erfüllt sein: 1) Die Reaktion des Ribozyms mit dem Substrat muss schneller sein als die reverse Transkription. 2) Das Ribozym muss genügend Kopien erzeugen, um den Verdünnungsfaktor beim Transfer auszugleichen. 3) Das Ribozym muss mit den anderen Ribozymen in der Reaktionsmischung in der Weise konkurrieren, dass es möglichst viele Kopien erzeugt, bevor der Transfer vorgenommen wird.

Die Klasse-I-Ligase war das erste Ribozym, das einer kontinuierlichen In-vitro-Evolution unterzogen wurde.<sup>[89]</sup> Die b1-207-Form der Klasse-I-Ligase wurde so modifiziert, dass ihre interne Templatregion zu einem Substrat mit der Sequenz des T7-Promotors komplementär war. Dieses modifizierte Ribozym setzte sich nur schlecht mit einem reinen RNA-Substrat um und zeigte keine Aktivität zur Ligation des chimären DNA-RNA-Substrats. Anschließend wurden fünfzehn schrittweise Evolutionsrunden ausgeführt, in denen unter Bedingungen, die für die Klasse-I-Ligase günstig sind, eine Katalysegeschwindigkeit von  $0.1 \text{ min}^{-1}$  erzielt wurde – allerdings waren die erhaltenen Ribozyme unter Bedingungen, wie sie von der reversen Transkriptase und der T7-RNA-Polymerase benötigt werden (z. B. 25 mM MgCl<sub>2</sub> und 50 mM KCl bei pH 8.5 und 37°C), noch immer deutlich weniger aktiv als die ursprüngliche b1-207-Form. Daher wurde zunächst eine schnelle Evolutionsprozedur verwendet, um die Ribozyme an die erwünschten Bedingungen anzupassen. Hierzu wurde jeweils zwischen zwei Reaktionsmischungen abgewechselt (einer für die RNA-Katalyse und einer für die selektive isotherme Amplifikation), deren Zusammensetzung allmählich angenähert wurde. Nach 100 Runden dieser Prozedur war die Population von Ribozymen in der Lage, mit dem chimären Substrat unter den gewünschten Bedingungen mit einer Katalysegeschwindigkeit von  $> 1 \text{ min}^{-1}$  zu reagieren.

Die aus dieser Evolutionsprozedur erhaltenen Moleküle wurden für eine kontinuierliche In-vitro-Evolution verwendet.<sup>[89]</sup> Während der ersten 24 Transfers betrug die Inkubationszeit eine Stunde bei einem Verdünnungsfaktor von 1000. Wie in Spiegelmans Experiment von 1967<sup>[2]</sup> wurde der Verdünnungsfaktor in den weiteren Transfers konstant gehalten, und die Inkubationszeit wurde soweit verkürzt, wie es die

Population tolerierte (am Ende 15 Minuten). Insgesamt wurden 100 Transfers ausgeführt, entsprechend einer Gesamtverdünnung von ca.  $10^{300}$  (Abbildung 8). Dies ist eine



**Abbildung 8.** Kontinuierliche Evolution von Ribozymen, die eine RNA-Ligation katalysieren,<sup>[89]</sup> zu Varianten, die eine oder zwei NTP-Additionen mit anschließender RNA-Ligation katalysieren.<sup>[97]</sup> Insgesamt 265 Transfers wurden ausgeführt, bei 1000facher Verdünnung pro Transfer und variierender Zeit zwischen den Transfers. Das Diagramm zeigt die Konzentration von Ribozymen vor und nach jedem Transfer.

beeindruckende Zahl, man aber darf nicht vergessen, dass das System einem exponentiellen Wachstum unterliegt, das über die wiederholten Verdünnungsstufen aufrechterhalten bleibt. Jedes Ligationereignis resultiert in der Bildung von ungefähr zehn Kopien der umgesetzten RNA. Damit entspricht eine Amplifikation um den Faktor  $10^{300}$  ungefähr 300 Runden aus Ligation und selektiver Amplifikation.

Die Ribozyme, die nach 100 Transfers mit kontinuierlicher Evolution entstanden waren, enthielten rund 30 Mutationen bezogen auf die b1-207-Ligase und rund 15 Mutationen bezogen auf die Moleküle, die zu Beginn der kontinuierlichen Evolution vorlagen.<sup>[89]</sup> Diese Mutationen ergaben eine  $10^4$ fache Steigerung der Katalyseeffizienz des Ribozyms, die sich aus einer jeweils  $10^2$ fachen Verbesserung in  $k_{\text{cat}}$  und  $K_M$  zusammensetzt. Die Erhöhung der Katalysegeschwindigkeit konnte nur schwer auf eine bestimmte Mutation zurückgeführt werden, während die verbesserte Gleichgewichtskonstante eindeutig aus einer längeren internen Templatregion des Ribozyms resultierte. Eine besonders gut untersuchte Variante, die E100-3-Ligase, die am Ende der 100 Transfers erhalten wurde, ergab Werte von  $k_{\text{cat}} = 21 \text{ min}^{-1}$  und  $K_M = 1.7 \mu\text{M}$ .<sup>[91]</sup> Ihre Verdopplungszeit beträgt 1.5 Minuten im kontinuierlichen In-vitro-Evolutionsgemisch, entsprechend der Produktion von  $10^{12}$  Kopien pro Stunde unter exponentiellen Wachstumsbedingungen.

## 7.2. Neue Anforderungen an kontinuierlich evolvierende Ribozyme

Randomisierte Varianten der E100-3-Ligase wurden in einer Reihe von kontinuierlichen Evolutionsexperimenten eingesetzt. Hieraus resultierten Tochterligasen mit veränderten Phänotypen, z. B. der Fähigkeit, in Gegenwart verringelter MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen<sup>[92]</sup> oder unter sauren (pH 5.8) oder alkalischen Bedingungen (pH 9.8) zu funktionieren.<sup>[93]</sup> In anderen Studien wurden Strategien der kontinuierlichen Evolution angewendet, um klassischen Fragen der Evoluti-

onsbiologie nachzugehen, betreffend etwa die Wahrscheinlichkeit von wiederkehrenden evolutionären Ergebnissen<sup>[94]</sup> oder die Auswirkungen einer progressiven Anreicherung von schädlichen Mutationen.<sup>[95]</sup> In einer Versuchsreihe,<sup>[91]</sup> die an die Studie erinnert, in der Qβ-RNA hinsichtlich einer Resistenz gegen Ethidiumbromid evolviert wurde,<sup>[14,15]</sup> wurde ein Ribozym-inaktivierendes DNA-Enzym eingesetzt,<sup>[96]</sup> gegen welches das Ribozym Resistenz entwickeln sollte. Das DNA-Enzym war so entworfen, dass es das Ligaseribozym unmittelbar neben der Ligationsstelle spaltet und so inaktiviert. Die Bindung des DNA-Enzyms an das Ribozym beruhte auf der Bildung von Watson-Crick-Paaren mit Nucleotiden in der Umgebung der internen Templatregion des Ribozyms. Diese Nucleotide können nicht mutiert werden, da sie vom Ribozym zur Erkennung seines eigentlichen Substrats benötigt werden. Von der Ribozympopulation wurde dieses schwierige Evolutionsproblem auf zweierlei Art bewältigt:<sup>[91]</sup> Erstens wurden sterisch blockierende Mutationen an beiden Enden der internen Templatregion eingebaut (zusammen mit ausgleichenden Mutationen, um die richtige Faltung der Ribozymstruktur zu gewährleisten), die die Fähigkeit des DNA-Enzyms zur Spaltung des Ribozyms um das 2000fache verminderten. Zweitens wurden Mutationen eingebaut, die den  $K_M$ -Wert des Ribozys für sein eigentliches Substrat verbesserten. Auf diese Weise war das Ribozym in der Lage, mehr von seinem eigentlichem Substrat und damit weniger vom konkurrierenden DNA-Enzym zu binden.

Strategien der kontinuierlichen In-vitro-Evolution wurden auch genutzt, um Varianten der E100-3-Ligase zu gewinnen, die eine oder zwei NTP-Additionen mit anschließender Ligation ausführen.<sup>[97]</sup> Erreicht wurde dies, indem das Oligonucleotidsubstrat um ein oder zwei Nucleotide gekürzt und dem Ribozym die Aufgabe gestellt wurde, die Promotorsequenz durch Addition der passenden NTPs zu vervollständigen und dann selbst an das verlängerte Substrat zu ligieren. Die Ribozyme wurden zunächst nach ihrer Fähigkeit selektiert, eine einzelne NTP-Addition mit anschließender Ligation auszuführen. Benötigt wurden hierzu fünf Runden schrittweiser Evolution und 105 Transfers mit kontinuierlicher Evolution bei 1000facher Verdünnung pro Transfer (Abbildung 8). Danach wurden die Ribozyme nach ihrer Fähigkeit zur Addition von zwei NTPs mit anschließender Ligation selektiert, was acht Runden schrittweiser Evolution und 60 Transfers mit kontinuierlicher Evolution bei 1000facher Verdünnung pro Transfer erforderte. Ein typisches Ribozym, das aus der resultierenden Population isoliert wurde – bezeichnet als E278-19 –, enthält 30 Mutationen bezogen auf die E100-3-Ligase. Es führt zwei templatgesteuerte NTP-Additionen mit anschließender Ligation bei einer Gesamtgeschwindigkeit von  $3 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  aus (gemessen in Gegenwart von 2 mM jedes NTP, 25 mM MgCl<sub>2</sub> und 50 mM KCl bei pH 8.5 und 37°C).

Keinen Erfolg brachten Versuche, Strategien der kontinuierlichen Evolution zur Entwicklung von Ribozymen zu nutzen, die drei oder mehr NTP-Additionen mit anschließender Ligation ausführen können.<sup>[97]</sup> Wenn das Substrat um drei Nucleotide gekürzt wurde, wichen die Ribozyme dem Selektionsdruck aus, indem sie neue, nicht-standardmäßige Promotorsequenzen erzeugten, die ebenfalls zur Transkri-

tion befähigt waren. Es könnte deshalb sehr schwierig sein, mithilfe solcher Strategien effiziente RNA-Polymeraseribozyme zu entwickeln. Außerdem ist zu bedenken, dass sich Methoden der kontinuierlichen Evolution auf eine überschaubare Zahl chemischer Reaktionen beschränken. Im Prinzip können solche Strategien auf bindungsbildende Reaktionen angewendet werden, die zur Konjugation eines promotortragenden Substrats an das 5'-Ende des Ribozys führen; Bedingung ist aber, dass die neu gebildete Bindung durch die reverse Transkriptase verschoben werden kann und die reaktive Gruppe am 5'-Ende des Ribozys während der Transkription wiederhergestellt wird.

Bisher gelang die In-vitro-Evolution durch seriellen Transfer nur für Qβ-RNA, bestimmte nichtfunktionale Nucleinsäuren, die isotherm amplifiziert werden können,<sup>[98,99]</sup> und schnell reagierende Ligaseribozyme. Der serielle Transfer findet breite Anwendung als eine Methode zur Fortpflanzung von bakteriellen und eukaryotischen Zellen sowie auch seit langem schon zur Zucht von Pflanzen und Haustieren. Jedoch sind dies biologische Prozesse, die per Definition nicht *in vitro* ausgeführt werden können.

## 8. In-vitro-Evolution heute und morgen

Es hat sich als schwierig erwiesen, ein zweites Ribozym neben der Klasse-I-Ligase zu erhalten, das in der Lage ist, an einer kontinuierlichen In-vitro-Evolution teilzunehmen. Kein anderes Ligaseribozym erreicht bisher die Katalysegeschwindigkeit der Klasse-I-Ligase – eine hohe Katalysegeschwindigkeit ist aber für eine kontinuierliche Evolution notwendig, weil das Ribozym reagieren muss, bevor es durch die reverse Transkriptase inaktiviert wird.

Eine zweite Familie von kontinuierlich evolvierbaren Ribozymen, die erst kürzlich eingeführt wurde, sind Varianten der DSL-Ligase.<sup>[100]</sup> Die DSL-Ligase wurde zunächst so modifiziert, dass sie mit einem die Sequenz des T7-RNA-Polymerasepromoters tragenden Substrat reagieren konnte, was allerdings zu einem Verlust der Aktivität führte. Dementsprechend wurde eine schrittweise Evolution ausgeführt, wobei ein geringer Grad an Aktivität wiederhergestellt wurde. Anschließend wurde eine Domäne aus 35 Nucleotiden zufälliger Sequenz angefügt, und die Katalysegeschwindigkeit wurde optimiert, indem Moleküle selektiert wurden, die in nur 15 Millisekunden reagieren konnten. Diese sehr kurzen Reaktionszeiten wurden unter Verwendung einer Quench-Flow-Apparatur erzielt. Man erhielt eine Population von Ribozymen, die eine kontinuierliche In-vitro-Evolution mit über 80 Transfers bei einer mehr als 10<sup>200</sup> fachen Verdünnung einging.<sup>[100]</sup>

Da nun zwei Spezies von kontinuierlich evolvierenden Ribozymen zur Verfügung stehen, wäre es möglich, Coevolutionsstudien mit beiden Ribozymen in einer gemeinsamen Umgebung vorzunehmen. Hiermit ließe sich z.B. untersuchen, inwiefern funktionelle molekulare Spezies konkurrieren oder zusammenwirken. In-vitro-Untersuchungen zur „molekularen Ökologie“ mit zwei nicht-funktionellen, isotherm amplifizierbaren Nucleinsäuren wurden bereits beschrieben.<sup>[101,102]</sup> In einer Studie fungierte die cDNA-Form des

einen Moleküls als cDNA-Primer des anderen Moleküls, sodass ein gekoppeltes System erhalten wurde, das für einen kurzen Zeitraum fungierte, bevor es der Bildung parasitärer Moleküle unterlag.<sup>[101]</sup> In einer anderen Studie fungierten die cDNA-Formen zweier unterschiedlicher Moleküle jeweils gegenseitig als Primer für das andere Molekül, was zu einem kooperativ gekoppelten System führte, das ebenfalls rasch parasitär wurde.<sup>[102]</sup> Um gekoppeltes Verhalten in einem In-vitro-Evolutionssystem über längere Zeiträume aufrechtzuerhalten, ist es wohl erforderlich, dass jede Spezies ihre eigene Funktion ausüben kann und auf diese Weise amplifizierbar und damit weniger anfällig für nicht-funktionelle Parasiten ist.

Ein anderer Fortschritt mit Bezug zur kontinuierlichen In-vitro-Evolution ist die Entwicklung eines Mikrofluidik-Wafers, mit dem sich serielle automatisierte Verdünnungen vornehmen lassen.<sup>[103]</sup> Dieses System wurde verwendet, um die kontinuierliche Evolution von Ligaseribozymen in Sub-mikrolitervolumina auszuführen.<sup>[104]</sup> Die evolvierende Population wird kontinuierlich mit einem konfokalen Lasermikroskop überwacht, wobei der interkalierende Farbstoff Thiazolorange verwendet wird, der ein Fluoreszenzsignal der Ribozymkonzentration erzeugt. Sobald eine frei wählbare Schwellenkonzentration erreicht ist, werden computergesteuerte Mikroventile aktiviert, um ein Aliquot der Reaktionsmischung zu isolieren und dieses mit frischem Reaktionsgemisch zu verdünnen. Dieser Prozess von Wachstum und Verdünnung kann viele Male wiederholt werden, analog zum manuellen seriellen Transfer. Die Evolution auf einem Chip ist weitaus präziser und besser reproduzierbar als manuelle Techniken.<sup>[103]</sup> Die Mikrofluidik-Evolutionsapparatur kann über eine exponentielle Wachstumsphase variabler Dauer eine Population von  $10^9$ – $10^{11}$  Individuen aufrechterhalten, dann in 20 Sekunden eine 5- bis 25fache Verdünnung vornehmen, um dann wieder in die Wachstumsphase zu treten.

Eine Robotereinheit wurde zur In-vitro-Selektion von RNA-Aptameren verwendet.<sup>[105]</sup> In einer neueren Arbeit wurde eine Mikrofluidikapparatur beschrieben, die die Schritte der Aptamerselektion automatisiert vornimmt, wenn auch bislang kein Aptamer erhalten wurde.<sup>[106]</sup> Wie in Abschnitt 3.1 erwähnt, wurde ein Robotersystem mit seriellem Transfer zur In-vitro-Evolution von Q $\beta$ -RNA eingesetzt.<sup>[16]</sup> Es ist anzunehmen, dass eine Mikrofluidikapparatur, wie sie zur Evolution von Ligaseribozymen eingesetzt wurde, auch für die Evolution von Q $\beta$ -RNA genutzt werden kann. Die letzte Stufe wäre, Mikrofluidikapparaturen zur Evolution von Polymerase- und Ligaseribozymen einzusetzen, wobei dann die Möglichkeit bestünde, Tausende von Selektionsrunden ohne Benutzereingriff auszuführen. Wenn Bau- und Funktionsweise eines Mikrofluidikchips erst einmal validiert sind, lassen sich einzelne Chips kostengünstig anfertigen, und da jeder Chip 24 einzelne Verdünnungskreisläufe enthält, wird es möglich sein, evolvierende Ribozyme in parallelen Studien sowie in Studien mit einer großen Zahl aufeinander folgender Schritte zu untersuchen.

Ein übergeordnetes Ziel der Evolutionsforschung ist die Entwicklung eines Systems, das in einer selbsterhaltenden Weise evolvieren kann, d.h. ohne die Hilfe von Proteinpolymerasen oder anderen informationstragenden Makromole-

külen, die nicht selbst Bestandteil des evolvierenden Systems sind. Gemäß mancher Definitionen entspräche dies der Realisierung von Leben im Labor.<sup>[107–109]</sup> Ein vielversprechender Ansatz hierfür scheint die Entwicklung eines robusten RNA-Polymeraseribozyms zu sein, das als eine RNA-Replikase fungieren kann. Wie oben diskutiert wurde, dürfte dies ein beträchtliches Ausmaß an In-vitro-Evolution erfordern, beginnend bei entweder einem existierenden Ligaseribozym oder einer Population von RNAs zufälliger Sequenz. Glücklicherweise werden die Methoden der In-vitro-Evolution zunehmend leistungsfähiger, sodass berechtigte Hoffnung besteht, dass RNA-Moleküle mit den benötigten katalytischen Eigenschaften irgendwann erhalten werden können.

Für die selbsterhaltende Evolution eines Replikaseribozyms ist es notwendig, dass der katalytische Strang sowohl Plus- als auch Minus-Stränge der RNA vervielfältigt, die dem Katalysator bzw. seinem komplementären Strang entsprechen. Es wurden Mechanismen vorgeschlagen, wie sich ein Ribozym buchstäblich selbst vervielfältigen könnte,<sup>[110]</sup> viel wahrscheinlicher ist aber, dass das Ribozym andere Moleküle vervielfältigt, die die gleiche oder komplementäre Sequenz wie das Ribozym haben. In einer selbsterhaltenden RNA-Evolution sind diejenigen Ribozyme im Vorteil, die nur solche RNA-Moleküle erkennen und amplifizieren, die eng miteinander verwandt sind. Ein möglicher Mechanismus hierfür beruht auf der Erkennung einer Markersequenz – vielleicht einer tRNA entsprechend – jeweils an den Enden der Plus- und Minus-Stränge.<sup>[111]</sup> Die spezifische Erkennung durch die Replikase – ob nun direkt mit der Substratbindung zusammenhängend oder indem man Enzym und Substrat räumlich zusammenbringt – führt dann zu einer „selektiven Bevorzugung“, wie es erstmals durch Spiegelman für die Replikation von RNA-Viren beschrieben wurde.<sup>[3]</sup> Diese Eigenschaft verstärkt sich bei weiterer In-vitro-Evolution, was dazu führt, dass die Replikase immer selektiver in Bezug auf die Substratsequenz wird. Damit würde ein System für die künstliche Selektion von Molekülen, dem ein Experimentator die Selektionsbedingungen vorgibt, letztlich zu einer Form von natürlicher Auslese im Labor führen, bei der funktionelle Moleküle selbstständig evolvieren, ohne auf einen bestimmten Phänotyp ausgerichtet zu sein.

*Ich danke meinen Mitarbeitern, die an der Entwicklung und Anwendung der In-vitro-RNA-Evolution beteiligt waren. Mein Dank gilt außerdem Leslie Orgel und Richard Lerner für ihre vielen hilfreichen Vorschläge und Anmerkungen zum Manuskript. Unsere Arbeiten werden durch das Exobiologie-Programm der National Aeronautics and Space Administration und die National Institutes of Health unterstützt.*

Eingegangen am 29. März 2007  
Online veröffentlicht am 16. Juli 2007  
Übersetzt von Dr. Frank Maaß, Weinheim

- [1] C. R. Darwin, *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*, John Murray, London, 1859.
- [2] D. R. Mills, R. L. Peterson, S. Spiegelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, 58, 217–224.

- [3] I. Haruna, K. Nozu, Y. Ohtaka, S. Spiegelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1963**, *50*, 905–911.
- [4] I. Haruna, S. Spiegelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1965**, *54*, 579–587.
- [5] I. Haruna, S. Spiegelman, *Science* **1965**, *150*, 884–886.
- [6] S. Spiegelman, I. Haruna, I. B. Holland, G. Beaudreau, D. Mills, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1965**, *54*, 919–927.
- [7] F. Meyer, H. Weber, C. Weissmann, *J. Mol. Biol.* **1981**, *153*, 631–660.
- [8] T. Nishihara, D. R. Mills, F. R. Kramer, *J. Biochem.* **1983**, *19*, 228–236.
- [9] D. Brown, L. Gold, *Biochemistry* **1995**, *34*, 14765–14774.
- [10] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505–510.
- [11] G. Klein, *The Atheist and the Holy City: Encounters and Reflections*, MIT Press, Cambridge, **1990**, S. 37–52.
- [12] F. Wöhler, *Ann. Chim. Phys.* **1828**, *37*, 330–333.
- [13] R. Levisohn, S. Spiegelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1969**, *63*, 805–811.
- [14] R. Saffhill, H. Schneider-Bernloehr, L. E. Orgel, S. Spiegelman, *J. Mol. Biol.* **1970**, *51*, 531–539.
- [15] F. R. Kramer, D. R. Mills, P. E. Cole, T. Nishihara, S. Spiegelman, *J. Mol. Biol.* **1974**, *89*, 719–736.
- [16] G. Strunk, T. Ederhof, *Biophys. Chem.* **1997**, *66*, 193–202.
- [17] C. K. Biebricher, M. Eigen, W. C. Gardiner, *Biochemistry* **1985**, *24*, 6550–6560.
- [18] H. V. Chetverina, A. B. Chetverin, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 2349–2353.
- [19] G. J. Bauer, J. S. McCaskill, H. Otten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 7937–7941.
- [20] A. B. Chetverin, H. V. Chetverina, A. A. Demidenko, V. I. Ugarov, *Cell* **1997**, *88*, 503–513.
- [21] J. S. McCaskill, G. J. Bauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 4191–4195.
- [22] E. A. Miele, D. R. Mills, F. R. Kramer, *J. Mol. Biol.* **1983**, *171*, 281–295.
- [23] P. M. Lizardi, C. E. Guerra, H. Lomeli, I. Tussie-Luna, F. R. Kramer, *Biotechnology* **1988**, *6*, 1197–1202.
- [24] Y. Wu, D. Y. Zhang, F. R. Kramer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 11769–11773.
- [25] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloon, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim, *Science* **1985**, *230*, 1350–1354.
- [26] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich, *Science* **1988**, *239*, 487–491.
- [27] J. C. Guatelli, K. M. Whitfield, D. Y. Kwoh, K. J. Barringer, D. D. Richman, T. R. Gingeras, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 1874–1878.
- [28] J. Compton, *Nature* **1991**, *350*, 91–92.
- [29] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818–822.
- [30] L. Gold, B. Polisky, O. Uhlenbeck, M. Yarus, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 763–797.
- [31] D. S. Wilson, J. W. Szostak, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 611–647.
- [32] *The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications* (Hrsg.: S. Klussmann), Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [33] L. C. Griffin, G. F. Tidmarsh, L. C. Bock, J. J. Toole, L. L. Leung, *Blood* **1993**, *81*, 3271–3276.
- [34] J. Floege, T. Ostendorf, U. Janssen, M. Burg, H. H. Radeke, C. Vargeese, S. C. Gill, L. S. Green, N. Janjic, *Am. J. Pathol.* **1999**, *154*, 169–179.
- [35] C. P. Rusconi, E. Scardino, J. Layzer, G. A. Pitoc, T. L. Ortell, D. Monroe, B. A. Sullenger, *Nature* **2002**, *419*, 90–94.
- [36] H. A. D. Lagasse, P. G. Merlino, M. C. Gilbert, J. R. Killough, K. Mills, R. M. Boomer, S. D. Lewis III, A. S. Makim, C. R. Benedict, T. G. McCauley, J. B. Rottman, H. N. Marsh, J. L. Diener, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**, *25*, 66.
- [37] P. Kobelt, S. Helmling, A. Stengel, B. Wlotzka, V. Andresen, B. F. Klapp, B. Wiedemann, S. Klussmann, H. Mönnikes, *Gut* **2006**, *55*, 788–792.
- [38] J. Ruckman, L. S. Green, J. Beeson, S. Waugh, W. L. Gillette, D. D. Henninger, L. Claesson-Welsh, N. Janji, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 20556–20567.
- [39] E. W. M. Ng, D. T. Shima, P. Calias, E. T. Cunningham, Jr., D. R. Guyer, A. P. Adamis, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 123–132.
- [40] D. L. Robertson, G. F. Joyce, *Nature* **1990**, *344*, 467–468.
- [41] M. A. Sirover, L. A. Loeb, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3605–3610.
- [42] P. Keohavong, W. G. Thilly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 9253–9257.
- [43] K. A. Eckert, T. A. Kunkel, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 3739–3744.
- [44] M. Eigen, *Naturwissenschaften* **1971**, *58*, 465–523.
- [45] J. McCaskill, *Biol. Cybernetics* **1984**, *50*, 60–73.
- [46] M. Eigen, J. McCaskill, P. Schuster, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 6881–6891.
- [47] P. Schuster, J. Swetina, *Bull. Math. Biol.* **1988**, *50*, 635–660.
- [48] D. W. Leung, E. Chen, D. V. Goeddel, *Technique* **1989**, *1*, 11–15.
- [49] R. C. Cadwell, G. F. Joyce in *PCR Primer: A Laboratory Manual*, 2. Aufl. (Hrsg.: C. W. Dieffenbach, G. S. Dveksler), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **2003**, S. 453–458.
- [50] R. C. Cadwell, G. F. Joyce, *PCR Methods Applic.* **1992**, *2*, 28–33.
- [51] J.-P. Vartanian, M. Henry, S. Wain-Hobson, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 2627–2631.
- [52] J. Cline, H. Hogrefe, *Strategies* **2000**, *13*, 157–162.
- [53] B. D. Biles, B. A. Connolly, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e176.
- [54] J. D. Hermes, S. M. Parekh, S. C. Blacklow, H. Köster, J. R. Knowles, *Gene* **1989**, *84*, 143–151.
- [55] D. P. Bartel, J. W. Szostak, *Science* **1993**, *261*, 1411–1418.
- [56] B. Zhang, T. R. Cech, *Nature* **1997**, *390*, 96–100.
- [57] P. J. Unrau, D. P. Bartel, *Nature* **1998**, *395*, 260–263.
- [58] T. M. Tarasow, S. L. Tarasow, B. E. Eaton, *Nature* **1997**, *389*, 54–57.
- [59] B. Seelig, A. Jäschke, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 167–176.
- [60] G. Sengle, A. Eisenführ, P. S. Arora, J. S. Nowick, M. Famulok, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 459–473.
- [61] S. Fusz, A. Eisenführ, S. G. Srivatsan, A. Heckel, M. Famulok, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 941–950.
- [62] A. A. Beaudry, G. F. Joyce, *Science* **1992**, *257*, 635–641.
- [63] T. Pan, O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **1992**, *31*, 3887–3895.
- [64] S.-M. Chun, S. Jeong, J.-M. Kim, B.-O. Chong, Y.-K. Park, H. Park, J. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10844–10845.
- [65] P. A. Lohse, J. W. Szostak, *Nature* **1996**, *381*, 442–444.
- [66] D. Saran, D. M. Held, D. H. Burke, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 3201–3208.
- [67] R. L. Coppins, S. K. Silverman, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16426–16432.
- [68] W. E. Purtha, R. L. Coppins, M. K. Smalley, S. K. Silverman, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13124–13125.
- [69] E. H. Ekland, J. W. Szostak, D. P. Bartel, *Science* **1995**, *269*, 364–370.
- [70] E. H. Ekland, D. P. Bartel, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 3231–3238.
- [71] N. H. Bergman, W. K. Johnston, D. P. Bartel, *Biochemistry* **2000**, *39*, 3115–3123.
- [72] R. Rohatgi, D. P. Bartel, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3332–3339.
- [73] L. Jaeger, M. C. Wright, G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14712–14717.
- [74] K. E. McGinness, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 297–307.
- [75] E. H. Ekland, D. P. Bartel, *Nature* **1996**, *382*, 373–376.

- [76] W. K. Johnston, P. J. Unrau, M. S. Lawrence, M. E. Glasner, D. P. Bartel, *Science* **2001**, *292*, 1319–1325.
- [77] M. P. Robertson, A. D. Ellington, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 62–66.
- [78] J. Rogers, G. F. Joyce, *RNA* **2001**, *7*, 395–404.
- [79] Y. Ikawa, K. Tsuda, S. Matsumura, T. Inoue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 13750–13755.
- [80] M. P. Robertson, J. R. Hesselberth, A. D. Ellington, *RNA* **2001**, *7*, 513–523.
- [81] M. P. Robertson, W. G. Scott, *Science* **2007**, *315*, 1549–1553.
- [82] J. S. Reader, G. F. Joyce, *Nature* **2002**, *420*, 841–844.
- [83] W. Yoshioka, Y. Ikawa, L. Jaeger, H. Shiraishi, T. Inoue, *RNA* **2004**, *10*, 1900–1906.
- [84] M. S. Lawrence, D. P. Bartel, *Biochemistry* **2003**, *42*, 8748–8755.
- [85] Y. Li, R. R. Breaker, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5364–5372.
- [86] H. S. Zaher, P. J. Unrau, *RNA* **2007**, *13*, 1017–1026.
- [87] M. S. Lawrence, D. P. Bartel, *RNA* **2005**, *11*, 1173–1180.
- [88] C. Dobkin, D. R. Mills, F. R. Kramer, S. Spiegelman, *Biochemistry* **1979**, *18*, 2038–2044.
- [89] M. C. Wright, G. F. Joyce, *Science* **1997**, *276*, 614–617.
- [90] K. E. McGinness, G. F. Joyce, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 2987–2991.
- [91] P. Ordoukhalian, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 881–889.
- [92] T. Schmitt, N. Lehman, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 857–869.
- [93] H. Kühne, G. F. Joyce, *J. Mol. Evol.* **2003**, *57*, 292–298.
- [94] N. Lehman, *Artif. Life* **2004**, *10*, 1–22.
- [95] S. J. Soll, C. D. Arenas, N. Lehman, *Genetics* **2006**, *175*, 267–275.
- [96] S. W. Santoro, G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4262–4266.
- [97] K. E. McGinness, M. C. Wright, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 585–596.
- [98] R. R. Breaker, G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 6093–6097.
- [99] F. Oehlenschläger, M. Eigen, *Origins Life Evol. Biosphere* **1997**, *27*, 437–457.
- [100] S. B. Voytek, G. F. Joyce, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [101] B. Wlotzka, J. S. McCaskill, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 25–33.
- [102] R. Ehricht, T. Ellinger, J. S. McCaskill, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 358–364.
- [103] B. M. Paegel, W. H. Grover, A. M. Skelley, R. A. Mathies, G. F. Joyce, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7522–7527.
- [104] B. M. Paegel, G. F. Joyce in *Ninth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences* (Hrsg.: K. F. Jensen, J. Han, D. J. Harrison, J. Voldman), Transducer Research Foundation, Boston, **2005**, S. 28–30.
- [105] J. C. Cox, A. D. Ellington, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2525–2531.
- [106] G. Hybarger, J. Bynum, R. F. Williams, J. J. Valdes, J. P. Chambers, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *384*, 191–198.
- [107] C. Sagan, *Encyclopaedia Britannica*, Vol. 22, Encyclopaedia Britannica, Chicago, **1998**, S. 964–981.
- [108] G. F. Joyce in *Origins of Life: The Central Concepts* (Hrsg.: D. W. Deamer, G. R. Fleischaker), Jones and Bartlett, Boston, **1994**, S. xi–xii.
- [109] C. F. Chyba, G. D. McDonald, *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **1995**, *23*, 215–249.
- [110] N. R. Pace, T. L. Marsh, *Origins Life Evol. Biosphere* **1985**, *16*, 97–116.
- [111] A. M. Weiner, N. Maizels, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7383–7387.
- [112] C. K. Biebricher, R. Luce, *EMBO J.* **1992**, *11*, 5129–5135.