

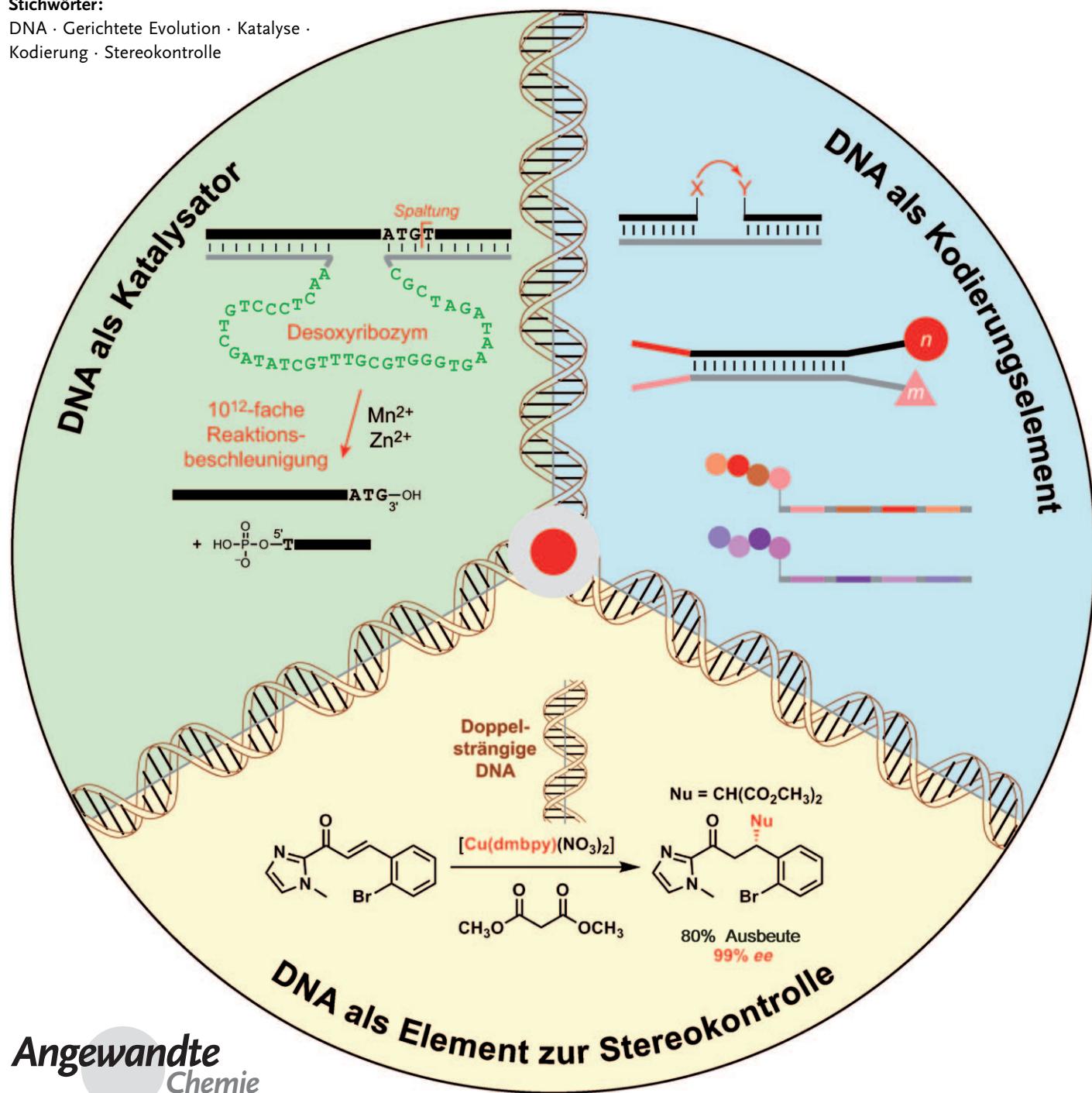
DNA – eine vielseitige chemische Verbindung für die Katalyse, zur Kodierung und zur Stereokontrolle**

Scott K. Silverman*

Stichwörter:

DNA · Gerichtete Evolution · Katalyse ·

Kodierung · Stereokontrolle



Die DNA (Desoxyribonukleinsäure) ist das genetische Material, das allen Organismen der Erde gemeinsam ist. Unser biologisches Verständnis der DNA ist umfangreich und wird weitreichend genutzt. In den letzten Jahren nun begannen Chemiker, die DNA auch für nicht-biologische Anwendungen in der Katalyse, der Kodierung und zur Stereokontrolle zu erschließen. Dieser Aufsatz fasst die wichtigsten Fortschritte auf diesen drei spannenden Forschungsfeldern zusammen, von denen sich jedes einen anderen bestimmten Aspekt der chemischen Eigenschaften der DNA zu Nutze macht.

1. Einleitung

Die Geschichte der DNA begann Ende der 60er Jahre des 19. Jahrhunderts mit der von Miescher durchgeführten Isolation von „Nuklein“ aus Leukozyten, die aus Eiter gewonnen wurden.^[1] Acht Jahrzehnte später, im Jahr 1944, stellten Avery, MacLeod und McCarty fest, dass es sich bei DNA um das Erbmaterial handelt.^[2] Watson und Crick^[3] postulierten 1953 – mit wichtigen Beiträgen von Wilkins^[4] und Franklin^[5] – die dreidimensionale Struktur der DNA, was eine weitreichende chemische und biologische Revolution auslöste, die bis heute andauert.

Seit der bahnbrechenden Veröffentlichung von Watson und Crick sind fast sechs Jahrzehnte vergangen. Unser biologisches Verständnis der DNA ist innerhalb dieser Zeit wesentlich vorangeschritten. So bieten Genomsequenzierungsprojekte vielversprechende Aussichten für medizinische Anwendungen, wie sie in der Mitte des letzten Jahrhunderts noch undenkbar waren.^[6] Neben dieser fundamentalen Wichtigkeit der DNA in der Biologie haben Wissenschaftler das weitgehend unerforschte Potential der DNA für interessante chemische Anwendungen entdeckt. Dieser Aufsatz deckt die Fortschritte auf drei Schlüsselgebieten ab: DNA als Katalysator, DNA als Kodierungselement und DNA als stereochemisches Kontrollelement. In ausgewählten Fällen werden parallele Entwicklungen mit Nukleinsäure-ähnlichen Polymeren erwähnt (z.B. Peptidnukleinsäuren, PNAs), eine vollständige Schilderung dieser Ergebnisse würde aber den Rahmen dieses Aufsatzes übersteigen. Die drei abgedeckten Anwendungen – Katalyse, Kodierung und Stereokontrolle – greifen jede auf eine andere Art und Weise auf die chemischen Eigenschaften der DNA zurück. Die Nebenanderstellung dieser drei Gebiete könnte bisher unbekannte Beziehungen sowie deren Weiterentwicklung anregen.

Viele andere interessante nicht-biologische Anwendungen von DNA gehen ebenfalls über den Rahmen dieses Aufsatzes hinaus. Die Verwendung von DNA als Sensorelement wurde bereits in Büchern^[7] ebenso wie in Übersichtsartikeln^[8] beschrieben. Auch Anwendungen als Rechenelement^[9] und als ein Regulator künstlicher biochemischer Kreisläufe^[10] sind beschrieben. Die Verwendung von DNA in der Nanotechnologie war Thema vieler Studien,^[11] und DNA wurde auch zur Konformationskontrolle anderer Makromoleküle verwendet.^[12]

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	7337
2. DNA als Katalysator	7337
3. DNA als Kodierungselement	7346
4. DNA als stereochemisches Kontrollelement	7352
5. Zusammenfassung	7356

2. DNA als Katalysator

Die meisten Chemiker dürfte es überraschen, dass DNA als Katalysator agieren kann. Normalerweise denkt man bei der DNA an die berühmte Watson-Crick-Doppelhelix (Abbildung 1), und ein langer starrer Stab wirkt im Allgemeinen

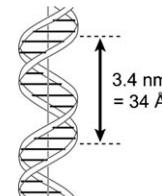


Abbildung 1. Die DNA-Doppelhelix gemäß dem Originalmanuskript von Watson und Crick aus dem Jahr 1953.^[3] Die Doppelhelixstruktur ist bestens für die Speicherung genetischer Informationen geeignet. Eine DNA-Katalyse erfordert allerdings zumindest eine teilweise Trennung der basengepaarten Strände, um die Bildung weniger regelmäßiger dreidimensionaler Strukturen zu ermöglichen, die eine katalytische Aktivität bewirken können. Da keine hochauflöste Struktur irgendeiner katalytisch wirksamen DNA bekannt ist, kann gegenwärtig keine analoge Abbildung eines Desoxyribozyms gezeigt werden.

nicht als effektiver Katalysator. Ein DNA-Strang muss allerdings *in vitro* nicht immer als Doppelstrang vorliegen. In der Natur muss die DNA in ihrer doppelsträngigen Form bewahrt bleiben, um die Integrität des Genoms zu erhalten – für Chemiker gilt diese Einschränkung aber keineswegs! Sobald ein DNA-Oligonukleotid von der Umklammerung seines komplementären Partners befreit ist, kann es eine komplexe

[*] Prof. S. K. Silverman

Department of Chemistry, University of Illinois at Urbana-Champaign
600 South Mathews Avenue, Urbana, IL 61801 (USA)
Fax: (+1) 217-244-8024
E-Mail: scott@scs.illinois.edu
Homepage: <http://www.scs.illinois.edu/silverman/>

[**] Der Vortitel illustriert drei Anwendungen von DNA: als Katalysator, als Kodierungselement und als chiralen Liganden zur Stereokontrolle.

dreidimensionale Struktur annehmen, die zur Katalyse befähigt ist.

Sowohl die Einzelstränge der RNA als auch der DNA sind in hohem Maße (und offensichtlich gleichwertig) dazu befähigt, komplexe dreidimensionale Strukturen zu bilden, die als „Aptamere“ bezeichnet werden und gut an die Zielverbindungen binden.^[13,14] Solche Bindungseignisse sind eine Grundvoraussetzung für die Katalyse. Da RNA-Katalysatoren (Ribozyme) aus der Evolution hervorgegangen sind und im Labor durch das Verfahren der In-vitro-Selektion identifiziert werden können,^[15–17] dürfen künstliche DNA-Katalysatoren (Desoxyribozyme) in chemischer Hinsicht plausibel erscheinen. In der Tat haben viele experimentelle Studien die katalytischen Fähigkeiten von DNA bestätigt, wenngleich noch viel Arbeit zum Verständnis von Desoxyribozymen und zur Erweiterung ihrer Reaktivität und Anwendungsbreite verbleibt. Es wurden mehrere Synonyme für Desoxyribozyme eingeführt: DNA-Enzyme, DNAzyme, DNA-Katalysatoren und katalytische DNA. In diesem Aufsatz werden all diese Begriffe austauschbar benutzt.

2.1. Erste Berichte über DNA als Katalysator für die RNA-Spaltung

Das erste Desoxyribozym wurde 1994 von Breaker und Joyce beschrieben. Es katalysierte die Spaltung einer einzelnen Ribonukleotid-Verknüpfung, die in einen Strang von DNA-Nukleotiden eingebettet war.^[18] Die Spaltung läuft über eine Umesterung durch den Angriff der 2'-Hydroxygruppe an der benachbarten Phosphodiesterbrücke ab (Abbildung 2a; man beachte, dass kein externes Wassermolekül eingebaut wird, sodass es sich streng genommen nicht um eine „Hydrolyse“ handelt). Das erste beschriebene Desoxyribozym benötigt für seine katalytische Aktivität Pb^{2+} als Cofaktor. Innerhalb weniger Jahre wurden viele weitere RNA-spaltende DNA-Enzyme entdeckt, die andere zweiwertige Metallionen wie Mg^{2+} , Ca^{2+} oder Zn^{2+} als Cofaktoren benötigen (Abbildung 2b).^[19] Alle diese Desoxyribozyme wurden durch In-vitro-Selektion identifiziert, worüber nachfolgend ein kurzer Überblick gegeben wird. In vielen Fällen werden Substrate, die ausschließlich aus RNA bestehen (also nicht

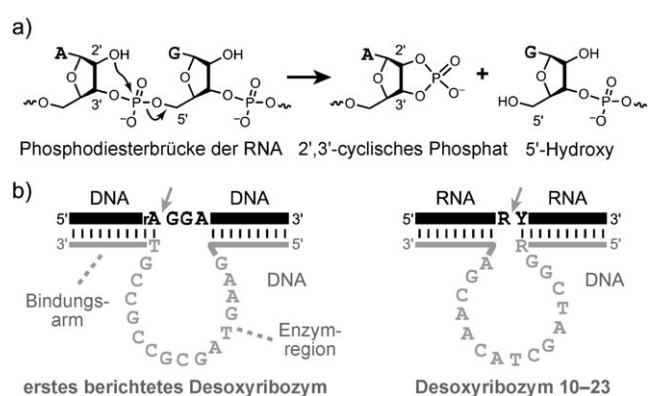


Abbildung 2. Desoxyribozym-katalysierte Spaltung von RNA. a) Chemie der Spaltungsreaktion: Umesterung am Phosphor. b) Zwei spezielle RNA-spaltende DNA-Enzyme: Links ist das erste beschriebene Desoxyribozym abgebildet, das Pb^{2+} benötigt und an einem einzelnen Ribonukleotid (rA) eingebettet in einem DNA-Strang spaltet (Pfeil).^[18] Rechts ist das Desoxyribozym 10-23 abgebildet, das Mg^{2+} benötigt (obwohl auch Mn^{2+} verwendet werden kann) und reine RNA-Substrate allgemeiner Sequenz spaltet.^[21] Für 10-23 ist nur das RNA-Sequenzmotiv R^Y an der Spaltungsstelle erforderlich, wobei es sich bei R um ein Purin handelt (A oder G) und bei Y um ein Pyrimidin (U oder C). Man beachte für beide Desoxyribozyme die Watson-Crick-Komplementarität zwischen den zwei „Bindungsarmen“ des Desoxyribozyms und dem Substrat.

nur eine einzige RNA-Verknüpfung aufweisen), effizient gespalten. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, nahezu jede beliebige RNA-Sequenz zu spalten, vorausgesetzt, dass viele verschiedene RNA-Substratsequenzen auch dann gespalten werden können, wenn lediglich die Watson-Crick-Komplementarität zwischen dem RNA-Substrat und dem DNA-Enzym gewährleistet ist.^[20] In den meisten Fällen unterliegen nur einige bestimmte RNA-Nukleotide nahe der Spaltungsstelle Beschränkungen ihrer Sequenzidentität. Eine Gruppe diverser Desoxyribozyme erlaubt jedoch kollektiv die Spaltung nahezu jeder RNA-Sequenz.^[20]

2.2. In-vitro-Selektion

Das Ziel der In-vitro-Selektion ist die Identifizierung spezieller DNA-Sequenzen, die eine katalytische Funktion haben – ähnlich der natürlichen Selektion von spezifischen Aminosäuresequenzen (d. h. Proteinen), die eine enzymatische Aktivität aufweisen. Für DNA ist das gesamte Verfahren der In-vitro-Selektion in anderen Übersichtsartikeln umfassend behandelt^[15,22] und wird daher hier nicht im Detail beschrieben. Im Prinzip werden Desoxyribozyme durch einen iterativen Prozess identifiziert, der von einem „Zufallspool“ aus DNA-Sequenzen ausgeht. Dieser Zufallspool besteht aus einem Gemisch von Oligonukleotiden, die zwei Abschnitte fester Sequenz aufweisen, die eine Region genau festgelegter Länge, aber vollkommen zufälliger Sequenzzusammensetzung (z. B. N_{40}) einrahmen. Erzeugt wird der Pool durch eine übliche DNA-Festphasensynthese unter Verwendung eines Gemisches der vier Standard-DNA-Phosphoramidite an jeder



Scott K. Silverman, geboren 1972 in Los Angeles, studierte Chemie an der UCLA und erwarb dort 1991 bei Christopher Foote seinen Bachelor (Mechanismen der Photo-oxygenierung). Er promovierte 1997 am California Institute of Technology (Caltech) bei Dennis Dougherty über organische High-Spin-Polyradikale und molekulare Neurobiologie. Danach absolvierte er ein Postdoktorat an der University of Colorado in Boulder bei Thomas Cech mit Untersuchungen zur Biochemie der RNA. Im Jahr 2000 wechselte er an die University of Illinois in Urbana-Champaign, wo er nun als Professor für Chemie, Biochemie und Biophysik tätig ist. Sein Arbeitskreis erforscht die Struktur und Faltung von Nukleinäsuren, ihre Eigenschaften in der Katalyse und insbesondere die Wirkung von DNA als Katalysator.

Position der zufälligen Abschnitte. Ausgehend vom Zufallspool bewirken iterative Selektionsrunden und PCR-Amplifikationen (Polymerasenkettenreaktion, Abbildung 3a) die Anreicherung von Sequenzen, die die gewünschte katalytische Aktivität haben, z.B. für die Spaltung von RNA (Abbildung 3b).

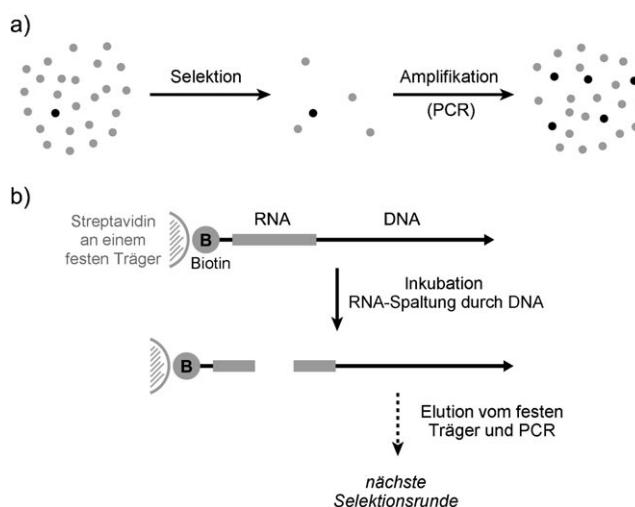


Abbildung 3. Überblick über das In-vitro-Auswahlverfahren zur Identifizierung von Desoxyribozymen. a) Auswahl und Vervielfältigung – die zwei grundlegenden Schritte der Selektion. Jeder Kreis repräsentiert eine mögliche DNA-Sequenz (hell = inaktiv, dunkel = aktiv). Im Selektionsschritt wird die Sequenzpopulation mit der aktiven Sequenz angereichert, und im Amplifikationsschritt wird die Populationsgröße wiederhergestellt. b) Selektionsschritt mithilfe eines 5'-biotinylierten RNA-Substrats zur Identifizierung von Desoxyribozymen, die die Spaltung von RNA katalysieren. Die DNA-katalysierte Spaltung der RNA führt zur Abtrennung des Biotins von der DNA, sodass die aktiven DNA-Sequenzen von einer Streptavidin-Säule eluiert werden können. Die Details der Selektion unterscheiden sich je nach gewünschtem Ergebnis, wie in umfassenderen Übersichtsartikeln beschrieben.^[15,22]

In jeder Runde beruht der Schlüsselschritt der Selektion auf einer geeigneten physikalischen Methode zur Abtrennung katalytisch aktiver DNA-Sequenzen von funktionslosen Sequenzen. In vielen der Selektionen RNA-spaltender Desoxyribozyme wurden 5'-biotinylierte RNA-Substrate verwendet, die kovalent an den Terminus des DNA-Zufallspools gebunden sind. Eine erfolgreiche DNA-katalysierte RNA-Spaltung trennt das Biotin von der katalytisch besonders aktiven DNA-Sequenz ab, wodurch ermöglicht wird, dass diese Sequenz von einer Streptavidin-Säule heruntergewaschen werden kann, während der Überschuss funktionsloser Sequenzen auf der Säule gebunden bleibt. Da kein physikalischer Trennungsprozess perfekt ist, wird in jeder Runde eine unvollständige Anreicherung funktioneller DNA-Sequenzen erreicht, und der Selektionsvorgang muss viele Male wiederholt werden (typischerweise 5–15 Runden), bis katalytisch aktive Sequenzen die Population dominieren. Einzelne Desoxyribozyme werden dann kloniert (d.h., ihre Sequenz wird identifiziert) und biochemisch hinsichtlich ihrer Reaktionsgeschwindigkeit, Ausbeute, Selektivität und anderen relevanten Eigenschaften charakterisiert. Für andere Aktivitäten

als die der RNA-Spaltung werden andere Methoden für den Schlüsselschritt des Selektionsprozesses verwendet, das Prinzip bleibt aber gleich. Ein gänzlich verschiedener Ansatz verwendet die In-vitro-Abschottung (IVC),^[23] die bei der In-vitro-Selektion von Nukleinsäureenzymen Anwendung findet, eine bis heute aber weniger gebräuchliche Methode ist.^[24,25]

Der gesamte Prozess der In-vitro-Selektion wurde für RNA einige Jahre vor demjenigen für DNA beschrieben.^[15,26] In-vitro-Selektionen von RNA und DNA laufen im Wesentlichen nach dem gleichen Verfahren mit den gleichen Überlegungen ab. Natürlich muss RNA im Laufe jeder Selektionsrunde aus DNA transkribiert und zu DNA revers transkribiert werden, wohingegen DNA gleichzeitig den Informationsträger und den Katalysator darstellt. Bei DNA handelt es sich um eine gute Katalysatorwahl, nicht nur weil DNA-Selektionen den Hin- und Hertransport von DNA-/RNA-Informationen vermeiden, sondern auch, weil Desoxyribozyme einfacher als Ribozyme zu untersuchen und zu handhaben sind. Ganz wichtig ist, dass DNA trotz seiner „fehlenden“ 2'-OH-Gruppe sowohl bei der Bindung von Substraten als auch in der Katalyse keine funktionellen Nachteile im Vergleich zu RNA zu haben scheint.^[15,27]

2.3. DNA-katalysierte Reaktionen

Die anfänglichen Erfolge bei der Identifizierung von Desoxyribozymen zur Spaltung von RNA regten Untersuchungen anderer DNA-katalysierter Reaktionen an. In der Tat wurden seither viele Desoxyribozyme beschrieben, die in anderen Reaktionen als der Spaltung von RNA aktiv waren. In den meisten dieser Reaktionen wird die Verwendung von Oligonukleotiden als Substrat beibehalten, was deswegen sinnvoll ist, weil DNA in seiner Eigenschaft als Nukleotidpolymer schon an sich gut (und selektiv) über „normale“ Watson-Crick-Wechselwirkungen an Oligonukleotid-Substrate bindet. Diese Wechselwirkungen liefern eine beträchtliche Menge an Enzym-Substrat-Bindungsenergie, die es dem In-vitro-Selektionsprozess erlaubt, DNA-Sequenzen bevorzugt aufgrund ihrer katalytischen Funktion und nicht ihrer Bindungsfähigkeit zu identifizieren. In einer kleinen, aber wachsenden Zahl von Fällen wurden auch andere Substrate als Oligonukleotide von Desoxyribozymen genutzt, was voraussichtlich ein Forschungsgebiet von großem Interesse werden wird. Umfangreiche neue Übersichtsartikel, die sich mit DNA-katalysierten Reaktionen befassen, stehen zur Verfügung.^[17,22,28] Hier werden einige Schlusselergebnisse zusammengefasst.

2.3.1. DNA-katalysierte Reaktionen von Oligonukleotiden

Neben der oben diskutierten Spaltung von RNA wurden umgekehrt auch Ligationen von RNA-Substraten durch Desoxyribozyme beschrieben. Durch die Selektion eines RNA-Substrats zur Bindungsbildung mit einem anderen RNA-Substrat, das entweder ein 2',3'-cyclisches Phosphat- oder ein 5'-Triphosphat-Elektrophil aufweist, konnten Desoxyribozyme identifiziert werden, die entweder lineare oder

verzweigte RNA-Topologien erzeugen (Abbildung 4a). Diese Desoxyribozyme benötigen typischerweise Mg^{2+} , Mn^{2+} oder Zn^{2+} für ihre Aktivität. Im Falle von Reaktionen, die mit 2',3'-cyclischen Phosphat-Elektrophilen ablaufen, stellt sich

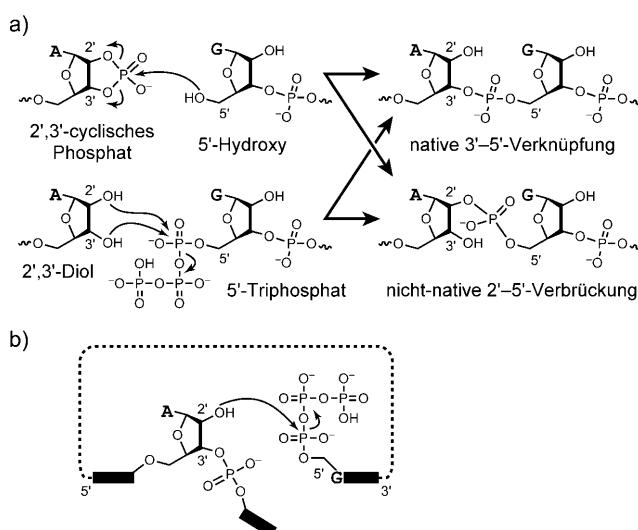


Abbildung 4. Desoxyribozym-katalysierte Ligation von RNA.^[22,30] a) Ein lineares RNA-Produkt kann entweder durch die Reaktion einer 5'-Hydroxygruppe mit einem 2',3'-cyclischen Phosphat aufgebaut werden oder durch die Reaktion eines 2',3'-Diols mit einem 5'-Triphosphat. b) Ein verzweigtes RNA-Produkt kann durch die Reaktion einer internen 2'-Hydroxygruppe mit einem 5'-Triphosphat aufgebaut werden. Bei dem verzweigten Produkt handelt es sich um Lariat-RNA, wenn die 2'-Hydroxygruppe und das 5'-Triphosphat Teile desselben RNA-Moleküls sind (angedeutet durch die gestrichelte Linie).

die Schlüsselfrage der Regioselektivität bei der Öffnung des cyclischen Phosphats, die entweder zu einer natürlichen 3'-5'- oder einer nichtnatürlichen 2'-5'-RNA-Verknüpfung führen kann. Bei Reaktionen, die unter Angriff eines 2',3'-Diols an einem 5'-Triphosphat ablaufen, stellt sich die Frage, mit welcher Selektivität die Hydroxygruppe am Reaktionsort angreift, da wieder entweder eine 3'-5'- oder eine 2'-5'-RNA-Verknüpfung gebildet werden kann. Es wurden viele interessante Experimente ausgeführt; in einem Fall wurden z. B. Desoxyribozyme auf die Fähigkeit hin entwickelt, die Bildung der natürlichen 3'-5'-Verknüpfung herbeizuführen.^[29] Diese Arbeiten über die Ligation von RNA durch DNA-Enzyme wurden an anderer Stelle im Detail zusammengefasst.^[22,30]

Ein faszinierendes Beispiel für die DNA-katalysierte Ligation von RNA ist die Bildung von 2',5'-verzweigter RNA und von Lariat-RNA (Abbildung 4b).^[20,31] Verzweigte RNA und Lariat-RNA werden in der Natur beim Spleißen von RNA^[32] und anderen biologischen Prozessen gebildet.^[33] Bis heute wird in allen untersuchten Fällen zur DNA-katalysierten Bildung von Verzweigungen oder von Lariaten nur der nucleophile Angriff einer einzigen 2'-Hydroxygruppe beobachtet, obwohl Hunderte konkurrierender 2'-Hydroxy-Nu-

kleophile innerhalb des RNA-Substrats vorhanden sind. Dieses Ergebnis veranschaulicht exemplarisch die den Enzymen analoge Selektivität von Desoxyribozymen. Eine analoge Synthese stark verzweigter RNA oder besonders von Lariat-RNA unter Verwendung eines niedermolekularen Katalysators würde eine große Herausforderung darstellen. Es wurden Desoxyribozyme identifiziert, die keine RNA-, sondern DNA-Substrate für die Verzweigung nutzen^[34] und die Bildung hochverzweigter DNA-Produkte ermöglichen (Abbildung 5).^[35]

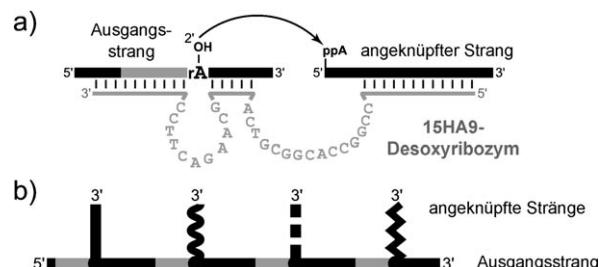


Abbildung 5. Bildung einer vielfach verzweigten DNA durch das 15HA9-Desoxyribozym.^[35] a) DNA-katalysierte Reaktion an einer einzelnen Verzweigungsstelle. b) Konnektivität eines mehrfach verzweigten Produkts mit vier Verzweigungsstellen. Die vier vertikalen Stränge entsprechen den vier verschiedenen 5'-adenylierten Strangsequenzen, die an den gemeinsamen Ausgangsstrang gebunden sind.

Es konnte gezeigt werden, dass ein Desoxyribozym (10DM24), das 2',5'-verzweigte RNA bildet, biophysikalische Marker wie Biotin oder Fluorescein im RNA-„Etikett“ (Tag) toleriert und somit die ortsspezifische Markierung von RNA ermöglicht (DECAL, desoxyribozyme-catalyzed labeling) (Abbildung 6).^[36] Diese Methode kann auch verwendet werden, um mehr als einen Marker an dieselbe RNA anzu-

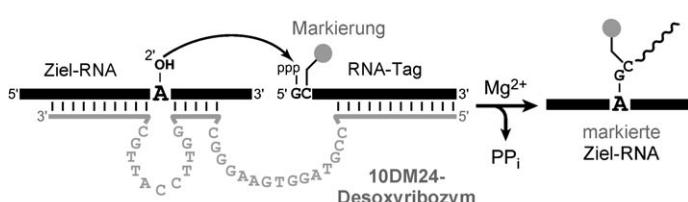


Abbildung 6. Desoxyribozym-katalysierte Markierung (DECAL) von RNA durch das Mg^{2+} -abhängige 10DM24-Desoxyribozym.^[36] Die Markierung wurde als N-Hydroxysuccinat (NHS) an eine 5-Aminoallylgruppe des RNA-Tags angehängt, die sich an der Nukleobase des zweiten Nukleotids befindet (und durch In-vitro-Transkription mithilfe von 5-Aminoallyl-CTP eingebaut wurde).

fügen, z. B. ein Paar von Fluoreszenzsonden für FRET-Experimente (FRET: resonanter Förster-Energietransfer).

Neben RNA-Substraten wurden auch DNA-Substrate durch Desoxyribozyme umgesetzt. In einer frühen Veröffentlichung wurde ein DNA-Ligase-Desoxyribozym E47 identifiziert, das entweder Zn^{2+} oder Cu^{2+} benötigt, um eine 5'-Hydroxygruppe mit einem 3'-Phosphorimidazolid umzusetzen.^[37] Später identifizierten Breaker und Mitarbeiter eine

ganze Serie von Desoxyribozymen, die die Selbst-Phosphorylierung, Selbst-Adenylierung (cap) und die Ligation zweier DNA-Stränge bewirken (Abbildung 7).^[38] Jedes dieser Desoxyribozyme stellt unterschiedliche Anforderungen an

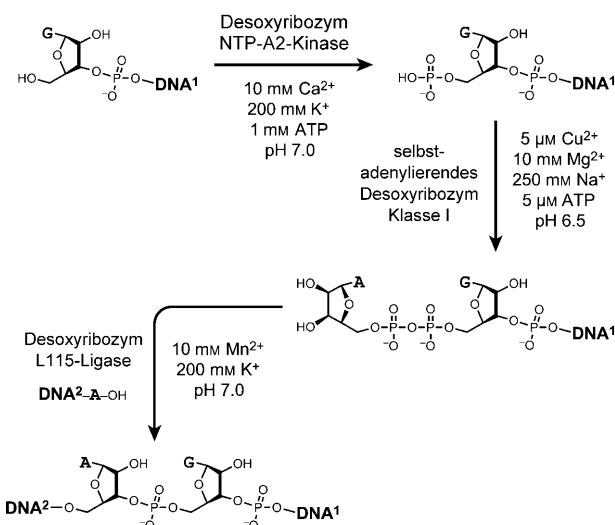


Abbildung 7. DNA-katalysierte Reaktionen von DNA-Substraten: Selbst-Phosphorylierung, Selbst-Adenylierung („Capping“) und Ligation.^[38] Jedes Desoxyribozym erfordert wie abgebildet verschiedene zweiwertige und einwertige Metallionen.

die Substratsequenz und die Inkubationsbedingungen (einschließlich verschiedener zweiwertiger Metallionen wie Ca^{2+} , Cu^{2+} oder Mn^{2+}), sodass nicht alle Reaktionen in einem Reaktionsansatz durchgeführt werden können, was eine breite Anwendbarkeit unmöglich machen. Dennoch: Das Rekapitulieren von Reaktionen, die die Natur zur Verknüpfung zweier Nukleinsäurestränge mit DNA-Enzymen nutzt, ist eine herausragende intellektuelle Leistung, und weitere Bemühungen könnten praktischere Anwendungen dieser oder verwandter Desoxyribozyme möglich machen.

Sen und Mitarbeiter zeigten, dass DNA-Enzyme photochemische Reaktionen ermöglichen können, indem sie die Photospaltung von Thymin-Dimeren katalysieren. Es wurde gefunden, dass ein Desoxyribozym, UV1C, durch Bestrahlung bei einer optimalen Wellenlänge von 305 nm in Abwesenheit zweiwertiger Metallionen Thymin-Dimere spaltet (Abbildung 8).^[39] UV1C scheint über die Bildung einer zweistufigen G-Quadruplexstruktur zu funktionieren, wodurch es eine Einheit zur Verfügung stellt, die sowohl Licht absorbiert als auch als Elektronenquelle dient, um die Spaltung des Thymin-Dimers anzuregen. Die zum UV1C führenden Experimente wurden ursprünglich mit der Absicht durchgeführt, Desoxyribozyme zu identifizieren, die für die Absorption von Licht von einem Cofaktor abhängig sind; während des Selektionsprozesses wurde aber eine Lösung gefunden, bei der die DNA selbst die Absorption vollzieht. In nachfolgenden Studien wurde ein anderes Desoxyribozym identifiziert, Sero1C, das durch Bestrahlung bei einer optimalen Wellenlänge von 315 nm in Gegenwart von Serotonin als Cofaktor Thymin- und verwandte Dimere, ebenfalls in

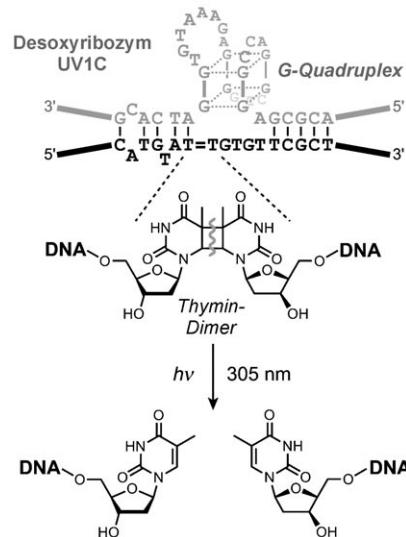


Abbildung 8. Photospaltung eines Thymin-Dimers durch das UV1C-Desoxyribozym.^[39] Ein verwandtes DNA-Enzym, Sero1C, katalysiert in Gegenwart von Serotonin als Cofaktor ähnliche Reaktionen.^[40]

Abwesenheit zweiwertiger Metallionen, spaltet.^[40] All diese Ergebnisse zeigen, dass Desoxyribozyme als effektive photochemisch angetriebene Katalysatoren wirken können. Viele andere Experimente zur Verwendung einer Kombination aus DNA-Enzymen und Licht zur Katalyse bestimmter chemischer Reaktionen sind denkbar.

Breaker und Mitarbeiter identifizierten zwei Klassen von Desoxyribozymen, die über Cu^{2+} -abhängige Reaktionspfade zur oxidativen Spaltung von DNA führen.^[41] Die eine Art von Desoxyribozymen benötigt sowohl Cu^{2+} als auch Ascorbat (das als Reduktionsmittel wirkt); die andere Art von DNA-Enzymen erfordert nur Cu^{2+} . Eine frühere Veröffentlichung beschreibt Cu^{2+} -abhängige Redoxschäden spezieller natürlicher DNA-Sequenzen, die offensichtlich Bindungsstellen auf der DNA mit einer besonders hohen Affinität zu Cu^{2+} entsprechen.^[42] Für alle neuen Desoxyribozyme wurde eine Heterogenität der Spaltstellen beobachtet. Dieses führt zu einer „Region-spezifischen“ Selbstspaltung und ist im Einklang mit der Beteiligung eines diffusionsfähigen Intermediates, z. B. dem Hydroxylradikal, im Verlauf der oxidativen Spaltung. Da die Spaltung von DNA unter oxidativer Zersetzung eines Nukleotids abläuft, werden sich solche Reaktionen wahrscheinlich nicht als präparativ nützlich erweisen, und die Erfordernis spezieller DNA-Sequenzen des Substrats schränkt eine breite praktische Nutzung zusätzlich ein.

Joyce und Mitarbeiter beschrieben das DNA-Enzym 10-28, das ein spezielles Guanosin-Nukleotid innerhalb seiner Sequenz in Gegenwart von Ca^{2+} , Mg^{2+} oder mehreren anderen zweiwertigen Metallionen depuriniert.^[43] Die erhaltene abasische Reaktionsstelle ist anfällig für eine β -Eliminierung, sofern zusätzlich eine Amin-Base wie Spermin vorhanden ist, was zur Spaltung des Strangs führt (Abbildung 9). Das pH-Optimum liegt um 5, was mit einer Protonierung des Guanin-N7 mit nachfolgender Addition von Wasser an das glycosidische Kohlenstoffatom vereinbar ist. In unabhängigen Arbeiten beschrieben Höbartner und Silverman ein Desoxy-

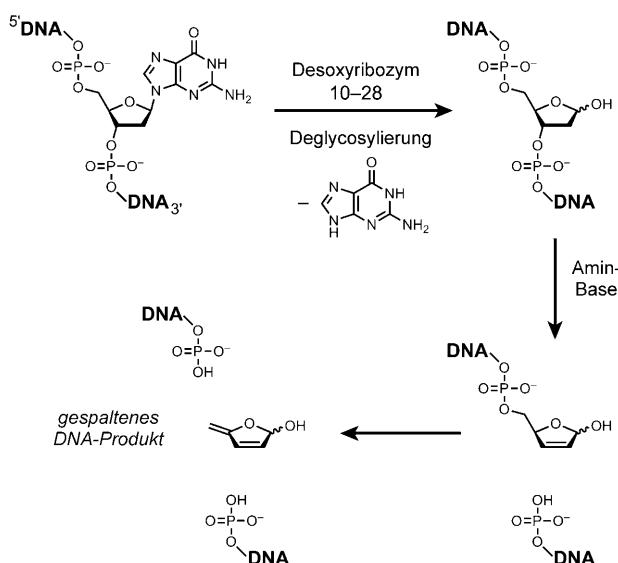


Abbildung 9. DNA-katalysierte Depurinierung (Deglycosylierung) durch das DNA-Enzym 10-28 gefolgt von einer Amin-abhängigen β -Eliminierung und Spaltung des DNA-Strangs.^[43]

riozym, das sein eigenes 5'-terminales Guanosin-Nukleotid in Gegenwart von Periodat (IO_4^-) als Cofaktor und in Abwesenheit zweiwertiger Metallionen depuriniert.^[44] Amosova et al. identifizierten eine bestimmte Stamm-Schleife-Sequenz, die eine spezifische Depurinierung etwa 10⁵-fach schneller eingeht als dies gemäß der normalen Hintergrundgeschwindigkeit in Abwesenheit irgendwelcher Cofaktoren oder zweiwertiger Metallionen der Fall wäre,^[45] was auf einen hervorragenden „Hotspot“ für eine unkatalysierte Depurinierung von DNA hindeutet.

Ein aufregendes neues Ergebnis ist der Befund, dass DNA die Fähigkeit besitzt, DNA-Phosphodiester-Verknüpfungen zu hydrolysieren. Chandra et al. beschrieben das Desoxyribozym 10MD5, das sowohl Mn^{2+} als auch Zn^{2+} benötigt, um unter ortsspezifischer Bildung der 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxy-Termini DNA zu hydrolysieren (Abbildung 10).^[46,47] Diese Reaktion verläuft mit hoher Sequenzspezifität des Substrats und mit nur einer kleinen, aus vier Nukleotiden (ATG[^]T) bestehenden Erkennungsstelle innerhalb des Substrats, was darauf hindeutet, dass eine weitere Ausarbeitung der Reaktion einen allgemein nützlichen Zugang zur Spaltung einzelsträngiger DNA-Substrate liefern kann. Die Verwendung analoger Desoxyribozyme zur Spaltung doppelsträngiger DNA wird gegenwärtig erforscht. Die unkatalysierte Hydrolyse von DNA-Phosphodiester-Bindungen hat eine Halbwertsdauer von 30 Millionen Jahren,^[48] während sich mit dem 10MD5-Desoxyribozym ein k_{obs} von mindestens 2.7 h^{-1} ergibt (entsprechend $t_{1/2}$ 15 min), sodass die Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit durch 10MD5 mindestens 10¹² beträgt. Hierbei handelt es sich um die größte Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit, die gegenwärtig für ein Desoxyribozym beschrieben ist.

Es gibt mehrere Beispiele für Desoxyribozyme, die unter allosterischer Abhängigkeit von niedermolekularen Verbindungen wie ATP^[49] oder Oligonukleotiden^[50] Nukleinsäuren

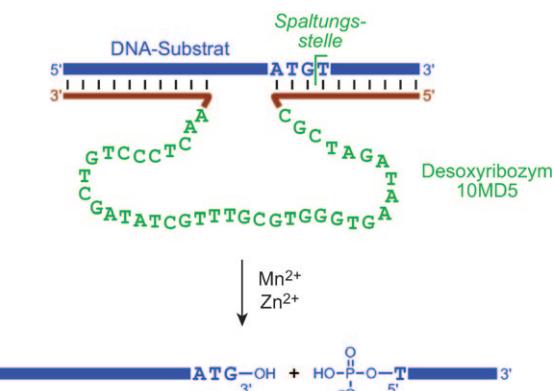


Abbildung 10. DNA-katalysierte sequenzspezifische Hydrolyse von DNA durch das 10MD5-Desoxyribozym, das sowohl Mn^{2+} als auch Zn^{2+} für seine katalytische Funktion benötigt.^[46,47] Außerhalb der ATG[^]T-Erkennungsstelle kann im Wesentlichen jedes Nukleotid im DNA-Substrat vorhanden sein, solange die Watson-Crick-Kovarianz zwischen dem Desoxyribozym und dem Substrat gewährleistet ist.

ligieren oder spalten. Solche allosterischen Desoxyribozyme (Aptazyme)^[51] könnten, wie in der Einleitung erwähnt, Verwendung bei der Konstruktion DNA-basierter Sensoren und datenverarbeitender Systeme finden.

2.3.2. DNA-katalysierte Reaktionen von anderen Substraten als Oligonukleotiden

Die Verwendung von Desoxyribozymen in Reaktionen mit anderen Substraten als Oligonukleotiden wurde bislang wenig untersucht. Der Hauptgrund hierfür ist, dass das Fehlen von Watson-Crick-Wechselwirkungen eine effiziente Substratbindung schwierig macht. Dennoch wurden einige Beispiele solcher Desoxyribozyme beschrieben, und zukünftige Studien werden sich sicherlich stärker auf solche Substrate konzentrieren.

Sen und Mitarbeiter untersuchten ausführlich ein DNA-Enzym, PS5.M, das Porphyrin metalliert.^[52] Entweder Cu^{2+} oder Zn^{2+} können mit dem Mesoporphyrin IX einen Komplex bilden (Abbildung 11). Das PS5.M-Desoxyribozym wurde über die DNA-Bindung an ein Übergangszustandsanalogon (ein nicht-planares *N*-Methylporphyrin) selektiert. Obwohl diese Selektionsmethode prinzipiell attraktiv ist,^[53] konnte sie

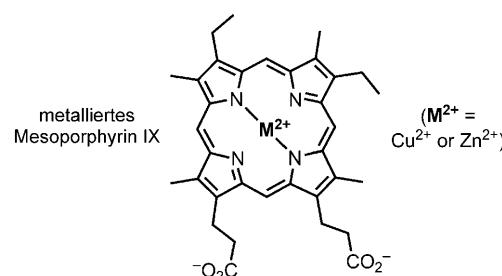


Abbildung 11. Produkt der Komplexierung von Cu^{2+} oder Zn^{2+} mit Mesoporphyrin IX, katalysiert durch das DNA-Enzym PS5.M, das durch In-vitro-Selektion über die Bindung an ein Übergangszustandsanalogon identifiziert wurde.^[52]

sich weder für RNA- noch für DNA-Enzyme etablieren.^[54] Das PS5.M-Desoxyribozym nimmt wahrscheinlich eine G-Quadruplexstruktur ein, die gut mit einem Porphyrin wechselwirken sollte. Unabhängig davon zeigten Sen und Mitarbeiter, dass ein Komplex bestehend aus einem DNA-Aptamer und Hämin (Fe^{3+} -Protoporphyrin IX) die moderate Peroxidaseaktivität von Hämin steigert.^[55]

Es wurden viele RNA- und DNA-Aptamere für die Bindung an Nukleotid-5'-triphosphate (NTP) identifiziert.^[14] Auch kann der aktivierte 5'-Terminus eines Oligonukleotids sehr einfach als Substrat für eine Desoxyribozym-Reaktion genutzt werden. Es erscheint daher plausibel, dass Desoxyribozyme befähigt sein sollten, NTPs als Substrate für Reaktionen mit niedermolekularen Verbindungen zu verwenden. Im Hinblick darauf modifizierten Höbartner und Silverman das 10DM24-Desoxyribozym dahingehend, dass es NTP-Substrate anstelle der 5'-Triphosphat-RNA bindet (Abbildung 12).^[56] Durch die simple Trennung des GTP vom

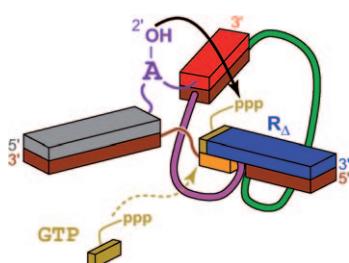


Abbildung 12. Einbau einer Bindungsstelle für GTP als niedermolekulares Substrat in das 10DM24-Desoxyribozym.^[56] Das Desoxyribozym (unterer Strang) und seine zwei RNA-Substrate (obere Stränge) bilden den gezeigten Knotenpunkt dreier Helices. R_A repräsentiert einen Oligoribonukleotid-Cofaktor, der auf die gleiche Art an 10DM24 bindet wie das ursprüngliche, 5'-triphosphorylierte RNA-Substrat, das aber am 5'-Ende um ein Nukleotid verkürzt wurde, um die GTP-Bindungsstelle zu generieren.

Rest des 5'-Triphosphat-RNA-Oligonukleotids wurde erreicht, dass 10DM24 in Gegenwart eines Oligonukleotid-Cofaktors, der dem Rest des ursprünglichen RNA-Substrats entspricht, GTP als ein freies niedermolekulares Substrat verwendet. Wenn das komplementäre DNA-Nukleotid innerhalb des Desoxyribozyms von C zu T ausgetauscht wurde, war 10DM24 in Gegenwart von ATP funktionsfähig, nicht mehr aber in Gegenwart von GTP. Dies bestätigte, dass Watson-Crick-Basenpaare das NTP-Substrat im aktiven Zentrum des Desoxyribozyms halten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Wasserstoffbrücken zwischen NTP und dem Desoxyribozym ebenfalls mit der Effizienz der Reaktion korreliert. Ein besonders interessanter Aspekt von 10DM24 und seiner Reaktivität gegenüber Oligonukleotiden im Vergleich zu NTP-Substraten ist, dass ein mehrfacher Umsatz nur mit NTP-Substraten beobachtet werden kann. Dieser Befund ist im Einklang damit, dass bei den zahlreichen oben beschriebenen RNA-Ligasen der mehrfache Umsatz durch Produktinhibierung unterdrückt wird.

Eine Erweiterung der in Abbildung 12 gezeigten Modifizierungsmethode auf andere Desoxyribozyme wird schwierig,

wenn nicht gar unmöglich sein, vor allem bei anderen niedermolekularen Substraten als NTPs. Aus diesem Grund wäre es wünschenswert, eine breiter anwendbare Methode zur Identifizierung von Desoxyribozymen zu entwickeln, die auf jede Art von niedermolekularen Substraten anwendbar ist.

Eine chemische Reaktion, die keinerlei Bezug zu Nukleinsäuren hat, ist die klassische Diels-Alder-Reaktion. Jäschke und Mitarbeiter untersuchten ausführlich ein Ribozym, das für die Katalyse einer Diels-Alder-Reaktion zwischen Anthracen und Maleimid identifiziert wurde.^[25,57] Hauptsächlich zu Vergleichszwecken unternahmen Chandra und Silverman die Identifizierung von Desoxyribozymen für die Diels-Alder-Reaktion.^[27] Die RNA-Sequenz von Jäschkes 39M49-Ribozym wurde teilweise randomisiert und in Form von DNA hergestellt. Parallel dazu wurde ein gänzlich randomisierter DNA-Pool evaluiert. Aus beiden Selektionsexperimenten konnten Desoxyribozyme identifiziert werden. Man fand heraus, dass ein bestimmtes Desoxyribozym, DAB22, mit hohem Turnover Diels-Alder-Reaktionen katalysierte, sofern keines der Substrate an die DNA gebunden war (Abbildung 13). DAB22 funktionierte sowohl mit Ca^{2+} , Mg^{2+} als auch Mn^{2+} ; das ursprüngliche 39M49-Ribozym funktionierte allerdings am besten mit Mg^{2+} . Obwohl DAB22 aus dem Pool identifiziert wurde, der von der partiellen Randomisierung von 39M49 stammt, hatten seine Sequenz und die erwartete Sekundärstruktur keinen Bezug zur Sequenz und Sekundärstruktur von 39M49, was darauf hindeutet, dass DAB22 im Wesentlichen ein neuer Katalysator ist. Wichtig ist, dass die quantitativen Parameter des DAB22-Desoxyribozyms und des 39M49-Ribozys (z.B. die effektiven Geschwindigkeitskonstanten und die Reaktionsbeschleunigung) vergleichbar waren, was bedeutet, dass zumindest für diese spezielle C-C-Kupplung DNA und RNA ähnliche katalytische Aktivitäten aufweisen. Es ist natürlich unmöglich, solche Schlüsse zu „beweisen“, solange nur einzelne Katalysatoren untersucht

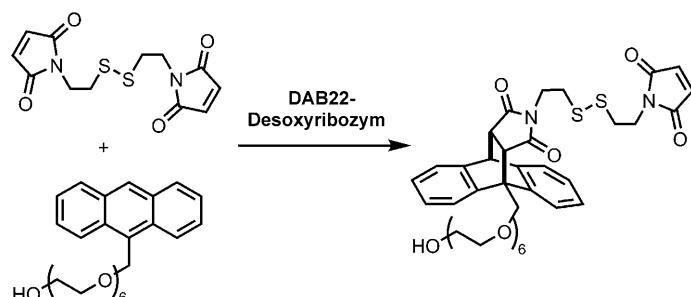


Abbildung 13. Intermolekulare Diels-Alder-Reaktion zwischen Anthracen und Maleimiden in Gegenwart von DAB22-Desoxyribozym als Katalysator.^[27] Ebenso wie bei Jäschkes Diels-Alder-Ribozym^[25,57] gibt es eine merkliche Enantioselektivität, die Richtung ist allerdings unbekannt (M. Chandra und S.K.S., unveröffentlichte Ergebnisse).

werden. Dennoch stützen diese Befunde die Aussage, dass DNA allein aufgrund der fehlenden 2'-Hydroxygruppe weder bei der Ligandenbindung noch in der Katalyse ein nennenswertes Handicap gegenüber RNA hat.

Reaktionen diverser funktioneller Gruppen sind von besonderem Interesse für die kontinuierliche Weiterentwick-

lung von Desoxyribozymen. Um die DNA-katalysierte Reaktivität von Aminosäure-Seitenketten zu untersuchen, platzierten Pradeepkumar et al. eine Tyrosin-, Serin- oder Lysin-Einheit am Knotenpunkt der vom 7S11-Desoxyribozym abgeleiteten Drei-Helix-Junction (Abbildung 14).^[34] Se-

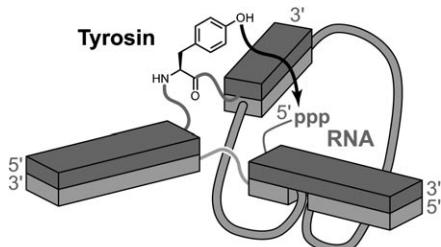


Abbildung 14. DNA-katalysierte Reaktion der Tyrosin-Seitenkette unter Bildung einer Tyr-RNA-Nukleopeptid-Verknüpfung.^[34] Die Architektur ist die gleiche wie in Abbildung 12.

lektionsexperimente führten zur Reaktion der Tyrosin-Seitenkette unter Bildung einer Tyr-RNA-Nukleopeptid-Verknüpfung, was zeigt, dass DNA zur Verwendung einer phenolischen Hydroxygruppe anstelle einer Ribose-2'-Hydroxygruppe als Nukleophil befähigt ist. Serin und Lysin reagierten hingegen nicht, was bedeutet, dass weitere Anstrengungen unternommen werden müssen, um die Anwendungsbreite von DNA in der Katalyse zu erweitern. Neuere Arbeiten haben in ähnlichen Zusammenhängen eine Reaktivität der Serin-Seitenkette offenbart (A. Sachdeva, O. Wong und S.K.S., unveröffentlichte Ergebnisse), was darauf hindeutet, dass es keine strikte chemische Limitierung für diese Art von DNA-katalysierter Reaktivität gibt.

Wang, Li und Mitarbeiter beschrieben Beispiele von Aldol- (Benzaldehyd + Aceton) und Henry-Reaktionen (Nitroaldol; Benzaldehyd + Nitromethan) in Wasser, bei denen natürliche doppelsträngige DNA als Katalysator verwendet wurde.^[58] Die mechanistische Rolle der DNA in diesen Prozessen ist unklar, die Katalyse scheint aber nicht von der DNA-Sequenz abhängig zu sein. Entgegen den in Abschnitt 4 beschriebenen Beispielen der asymmetrischen DNA-basierten Katalyse wird in diesen Versuchen keine chirale Induktion beobachtet. Sowohl die Unabhängigkeit von der DNA-Sequenz als auch das Fehlen der Enantioselektivität führen zu der Annahme, dass der Ursprung der Katalyse ein anderer ist als im Fall der zuvor beschriebenen Desoxyribozyme.

2.4. Strukturelle und mechanistische Untersuchungen von DNA-Katalysatoren: Es braucht Daten!

Obwohl die Sekundärstrukturen von Desoxyribozymen typischerweise in einer „offenen“ Anordnung gezeichnet werden (siehe z. B. Abbildung 2), ist es zwingend erforderlich, dass im Laufe der Katalyse die „Enzym“-Region des Desoxyribozyms, dessen Sequenz aus dem In-vitro-Selektionsprozess stammt, irgendwie mit dem Substrat/den Substraten

in Wechselwirkung tritt. Eine Kombination dieser Wechselwirkungen dient dazu, die Aktivierungsenergien herabzusetzen und die funktionellen Gruppen des Substrats genau zu positionieren; die Details jedes einzelnen Falls sind aber noch unbekannt. Daher besteht die größte Herausforderung auf diesem Gebiet der „DNA-Enzymologie“ darin, die Grundlagen der Desoxyribozym-Katalyse sowohl strukturell als auch mechanistisch im Detail zu verstehen. Dieses Verständnis wird derzeit dadurch behindert, dass keine Röntgenstrukturdaten oder NMR-Strukturanalysen katalytisch aktiver DNA-Enzyme zur Verfügung stehen. Kristalle, die nach Kristallisation des Desoxyribozyms 10–23 erhalten wurden, offenbarten eine 2:2-Stöchiometrie von Enzym und Substrat.^[59] Obwohl die resultierende Holliday-Struktur grundsätzlich faszinierend war, konnten keine mechanistischen Informationen zur DNA-Katalyse daraus gewonnen werden. Bemühungen hinsichtlich der Kristallisation von Desoxyribozymen werden zwar in vielen Laboratorien unternommen, bis heute wurden aber keine Strukturdaten veröffentlicht. NMR-Messungen sind zwar ebenfalls vorstellbar, allerdings wird eine solche Herangehensweise (neben anderen Problemen) durch die beträchtliche Signalüberlappung erschwert, und bis heute wurden keine NMR-Strukturen von Desoxyribozymen beschrieben.

Ohne hochauflösende Strukturinformationen ist der Entwurf neuer Experimente für Einblicke in mechanistische Details zwar möglich, aber schwierig.^[60] Der systematische Austausch oder das systematische Entfernen einzelner DNA-Nukleotide ist immer eine Möglichkeit, die in einigen Fällen auch genutzt wurde (siehe z. B. Lit. [31d]), letztendlich liefern solche Experimente aber eher begrenzte Informationen, wenn sie für sich genommen durchgeführt werden. Gewisse Erkenntnisse zu Ribozym-Mechanismen wurden aus hochauflösten RNA-Schlüsselstrukturen gewonnen.^[61] Es ist wahrscheinlich, dass die DNA-Enzymologie einen ähnlichen Weg durchlaufen wird. Bis das passiert, wird man über die naheliegendsten Parallelen zwischen Desoxyribozymen und Ribozymen spekulieren können. Ribozyme können gebundene zweiwertige Metallionen als Cofaktoren für die Katalyse heranziehen,^[62] und DNA kann natürlich dasselbe tun. Alternativ können RNA-Nukleobasen selbst die katalytisch aktive funktionelle Gruppe bereitstellen, ohne zwangsläufig von zweiwertigen Metallen abhängig zu sein.^[63] RNA-Nukleobasen können hierbei auf verschiedene Weise wirken, etwa als allgemeine Säure- oder Base-Katalysatoren, indem sie die elektrostatische Katalyse unterstützen oder indem sie Donoren oder Akzeptoren für Wasserstoffbrücken zur Verfügung stellen.^[61,64] Da DNA im Wesentlichen aus den gleichen Nukleobasen wie RNA besteht (wobei T durch U ersetzt ist), sollte sie ebenfalls befähigt sein, mithilfe eigener Nukleobasen ähnliche katalytische Wechselwirkungen einzugehen.

2.5. Zukünftige Forschungsrichtungen

Es sind mehrere Richtungen auszumachen, in die sich die zukünftigen Forschungen zur Anwendung von DNA als Katalysatoren bewegen dürfen.

2.5.1. Erweiterung des Anwendungsbereichs der DNA-Katalyse

Es scheint eindeutig, dass eine kontinuierliche Verbreiterung des Substrat- und Anwendungsbereichs der DNA-Katalyse insbesondere auf niedermolekulare Verbindungen und Proteine zu erwarten ist. Hierbei sind vor allem zwei Herausforderungen zu bewältigen: Zunächst müssen bessere Erkenntnisse über die Verwendung anderer Substrate als Oligonukleotide (insbesondere niedermolekulare Verbindungen und Proteine) gewonnen werden. Zweitens muss die Bandbreite an Reaktionen, die einer DNA-Katalyse zugänglich sind, weiter erhöht werden. Sehr vielversprechend ist die Beobachtung, dass die DNA-katalysierte Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen um den Faktor 10^{12} beschleunigt werden kann.^[46,47] Auch die in Abschnitt 2.3.2 beschriebenen Reaktionen mit anderen Substraten als Oligonukleotiden – wenn auch in gegenwärtig noch geringer Zahl – bieten eine aussichtsreiche Perspektive. Eine zweifellos wichtige Richtung im Rahmen der DNA-Katalyse wäre die systematische Untersuchung von Metallionen als katalytische Cofaktoren.

2.5.2. Erforschung der katalytischen Wirkung von funktionellen Gruppen, die nicht in DNA vorkommen

Eine bestimmte Eigenschaft der DNA, die zweifellos ihre Entwicklung als Katalysator aufgehalten hat, ist die relativ geringe Anzahl verschiedener funktioneller Gruppen. Da keine natürlichen Vertreter von Desoxyribozymen bekannt sind, gab es schlichtweg keine Gründe anzunehmen, dass DNA irgendeine katalytische Funktion haben könnte. Mittlerweile gibt es natürlich eine Menge experimenteller Daten, die belegen, dass die funktionellen Gruppen der DNA insbesondere in Kombination mit passenden Metallionen für eine leistungsfähige katalytische Wirkung ausreichen. Dennoch stellt sich die Frage, ob durch Anbringen zusätzlicher funktioneller Gruppen an der DNA ihre katalytische Funktion noch weiter verbessert werden könnte.

Um den Einfluss zusätzlicher funktioneller Gruppen abzuschätzen, können entweder kovalent modifizierte DNA-Nukleotide oder nicht-kovalent gebundene niedermolekulare Cofaktoren verwendet werden. Bei der Verwendung kovalent modifizierter Nukleotide müssen alle Vertreter eines speziellen Nukleotids (z.B. Adenosin) durch das modifizierte Gegenstück ersetzt werden, da für die DNA-Synthese während der In-vitro-Selektion die PCR verwendet wird. Dieser universelle Ersatz von Nukleotiden könnte funktionelle Auswirkungen haben, die entweder günstig oder ungünstig sind. In jedem Fall entstehen praktische Einschränkungen, da die DNA-Polymerase die nichtnatürlichen Nukleotide tolerieren muss (die wiederum zuvor synthetisiert werden müssen). Mehrere Arbeitsgruppen untersuchten besonders im Zusammenhang mit der DNA-katalysierten Spaltung von RNA die Verwendung kovalent modifizierter DNA-Nukleotide.^[65] In vielen Fällen verbesserte das modifizierte Nukleotid die Katalyse. Perrin und Mitarbeiter konnten z.B. zeigen, dass eine Kombination aus zwei oder drei passend modifizierten Nukleotiden die Menge an erforderlichen zweiwertigen Metallionen drastisch reduziert^[66] und eine empfindliche Detektion von Hg^{2+} -Ionen ermöglicht.^[67]

Niedermolekulare Cofaktoren weisen keinen der Nachteile kovalent modifizierter DNA-Nukleotide auf; es ist allerdings erforderlich, dass die Desoxyribozyme auf nicht-kovalente Weise mit dem Cofaktor wechselwirken, um die funktionelle Gruppe, die der Cofaktor zur Verfügung stellt, nutzen zu können. Roth und Breaker beschrieben ein Beispiel eines DNA-Enzyms, das für die RNA-Spaltung von einem Cofaktor (Histidin) abhängt.^[68] Hier könnte eine Ähnlichkeit zum natürlichen glmS-Ribozym bestehen.^[69] Die zuvor beschriebene Periodat-abhängige Selbst-Depurinierung von DNA ist ein Beispiel für eine von einem Cofaktor abhängige DNA-Katalyse, in der der Cofaktor offensichtlich verbraucht wird.^[44] Zukünftige Experimente sollten die Vorteile und Nachteile der Nutzung von entweder kovalent modifizierten Nukleotiden oder niedermolekularen Cofaktoren zusammen mit Desoxyribozymen zeigen.

2.5.3. Struktur-Funktions-Studien an Desoxyribozymer

Wie in Abschnitt 2.4 erläutert wurde, wären hochaufgelöste Strukturdaten von entscheidender Wichtigkeit, um eine Grundlage für biochemische Experimente an Desoxyribozymer zu haben – denn ohne Strukturen sind Struktur-Funktions-Beziehungen natürlich nur schwer zu erforschen. Daher ist es ein wichtiges Ziel, hochauflöste Strukturen von DNA-Enzymen zu erhalten, etwa durch Röntgenstrukturanalyse oder NMR-Spektroskopie.

2.5.4. Praktische Anwendungen von Desoxyribozymer

Desoxyribozyme, die Oligonukleotide umsetzen (Abschnitt 2.3.1), können für interessante biochemische Anwendungen genutzt werden. Ein weithin bekanntes Beispiel ist die Verwendung von DNA-Enzymen zur sequenzspezifischen Spaltung von RNA,^[19] was sowohl als präparative Strategie^[20] wie auch zu Analysezwecken nutzbar ist, z.B. zur Kartierung von RNA-Verzweigungsstellen.^[70] Beispiele für zukünftige Anwendungen könnten die DECAL-Markierung^[36] (Abbildung 6) zur Biotinylierung spezieller RNA-Sequenzen innerhalb eines komplexen Gemisches sein oder die DNA-katalysierte sequenzspezifische Hydrolyse von DNA^[46] als Alternative zu konventionellen Restriktionsenzymen.

Desoxyribozyme, die andere Substrate als Oligonukleotide umsetzen (Abschnitt 2.3.2), können ebenfalls für praktische Zwecke eingesetzt werden. Da man gegenwärtig sehr wenig über die Anwendung der DNA-Katalyse auf solche Substrate weiß, scheint ein praktischer Einsatz weit entfernt, und die Aussicht auf solche Anwendungen ist eine der Hauptmotivationen für die Erforschung von DNA-Enzymen. Zum Beispiel wäre ein Katalysator äußerst wertvoll, der selektiv an eine niedermolekulare Verbindung wie etwa einen Zucker an eine bestimmte Seitenkette einer Aminosäure an der Oberfläche eines intakten Proteins binden kann. Erste Schritte zur Identifizierung solcher Desoxyribozymer werden derzeit unternommen.

2.5.5. Weitere Überlegungen zu DNA-Katalysatoren

Sowohl RNA als auch DNA existieren in der Natur, wobei man die Rolle eines Katalysators nur von der RNA kennt. Auf der anderen Seite lassen sich im Labor ohne weiteres sowohl RNA- als auch DNA-Katalysatoren identifizieren. Dies wirft die Frage auf, ob DNA-Katalysatoren nicht auch in der Natur vorkommen. Die beste Antwort auf diese Frage ist, dass natürliche DNA-Katalysatoren gegenwärtig unbekannt sind, was aber nicht notwendigerweise ihre Existenz widerlegt. Die natürliche Selektion ist opportunistisch, d. h. sie nutzt im Prinzip jede verfügbare strukturelle oder funktionelle Komponente. Dies kann bedeuten, dass die katalytischen Eigenschaften der DNA durchaus biologisch genutzt werden würden, sofern nicht der Aufwand den Nutzen übersteigt. Die Natur hat gute Gründe dafür, die DNA zumeist in einer Doppelhelix anzurichten (Abbildung 1). Dessen ungeachtet scheint es plausibel, dass entweder vorübergehend oder permanent in Einzelsträngen vorliegende DNA nur darauf wartet, in biochemischen Zusammenhängen als Katalysator zu wirken.

Ganz gleich, ob die Natur die DNA nun in der Katalyse verwendet oder nicht, ist es uns im Labor freigestellt, jede Art von Katalysator zu nutzen. Jetzt, wo sowohl Proteine als auch RNA und DNA bereits als künstliche Katalysatoren etabliert wurden, beginnen einige Forscher, in noch allgemeinerem Rahmen über andere evolvierbare synthetische Polymere nachzudenken.^[71] Die große Herausforderung hierbei ist, dass der „Werkzeugkasten“ an natürlichen Polymerasen und anderen Enzymen für gewöhnlich nicht zur Manipulation nichtbiologischer Polymere verwendet werden kann. Die Entwicklung zuverlässiger und einfach anwendbarer Methoden, um solche Anwendungen dennoch zu erreichen, würde die sequenzbasierte makromolekulare Chemie revolutionieren. Bis dahin wird man auf Proteine, RNA und DNA zurückgreifen müssen. Alle experimentellen Daten in diesem Abschnitt weisen darauf hin, dass bei einer De-novo-Suche nach einer katalytischen Funktion die DNA ein konkurrenzfähiger Kandidat sein kann.

3. DNA als Kodierungselement

Die Verwendung der DNA als „kodierende Komponente“ unterscheidet sich grundlegend von ihrer Verwendung als Katalysator (Abschnitt 2). Wir verstehen darunter jegliche Art von Anwendung, in der allein die Sequenzinformation des Nukleotids von Bedeutung ist. Als Kodierungselement nimmt die DNA nicht an chemischen Reaktionen teil, außer vielleicht als Matrize. Es wurden zumindest fünf verschiedene Arten von Anwendungen beschrieben, in denen DNA als Kodierungselement wirkt; sie werden in diesem Abschnitt diskutiert. Natürlich ist auch die Verwendung der DNA als Genmaterial ein Beispiel für eine Kodierung.

3.1. Synthesesteuerung mit DNA-Template

Die in der Basenpaarung eines DNA-Doppelstrangs enthaltene Information kann zur Verknüpfung zweier Substrate

genutzt werden, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit über das Phänomen der effektiven Molarität erhöht wird. Diese Methode, die Synthesesteuerung mit DNA-Template (DTS; DNA-templated synthesis), wird seit vielen Jahren in zahlreichen Forschungslaboren untersucht. Zum Beispiel wurden erhebliche Bemühungen um die DTS von Oligonukleotiden angestellt.^[72] Ein umfassender Übersichtsartikel berichtet über Anwendungen der DTS bis 2004,^[73] sodass wir hier nur die allerwichtigsten Fortschritte neuerer Arbeiten präsentieren.

Das Prinzip der DTS ist in Abbildung 15 gezeigt. Zwei niedermolekulare Substrate, die beide eine reaktive funktionelle Gruppe (X und Y), sind mit zwei verschie-

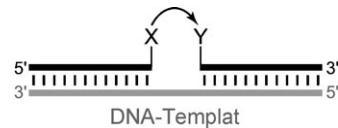


Abbildung 15. Synthesesteuerung durch DNA-Template (DTS): Zwei DNA-gebundene reaktive funktionelle Gruppen X und Y werden von einem komplementären DNA-Template (der „Schiene“) zusammengehalten. Die effektive Molarität, die sich dadurch einstellt, erhöht substanziell die Reaktionsgeschwindigkeit.

denen DNA-Oligonukleotiden verknüpft. Diese werden mit einer komplementären DNA-„Schiene“ hybridisiert, wodurch sich eine effektive Molarität einstellt, die die Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion gegenüber der Reaktion ohne Template beträchtlich erhöht. Es wurden mehrere Architekturen für die DTS entwickelt,^[74] und man fand, dass die Sekundärstruktur innerhalb der DNA-Template die Reaktivität beeinflussen kann.^[75]

Eine wichtige Anwendung der DTS ist die DNA-kodierte Entdeckung von Reaktionen. In einer bahnbrechenden Arbeit beschrieben Liu und Mitarbeiter die Entdeckung einer Pd^{II} -vermittelten Alken-Alkinamid-Makrocyclisierung unter Verwendung der DTS zur Suche nach möglichen Kupplungsreaktionen in einer 12×12 -Matrix niedermolekularer Substrate.^[76] Wichtig ist, dass die neu identifizierte Reaktion anschließend auch außerhalb des DTS-Formats durchgeführt werden konnte (Abbildung 16a). Die Kupplungsreaktion wurde anschließend in einer DNA-unabhängigen Weise weiterentwickelt, ohne dass eine Makrocyclisierung vorausgesetzt war.^[77] In einer weiteren Studie wurde ein Verfahren der DNA-Kodierung beschrieben, das keine Hybridisierung zweier DNA-Stränge erfordert, und zu einer neuen Au^{III} -vermittelten Hydroarylierung führte (Abbildung 16b).^[78] Streng genommen handelt es sich hierbei nicht um eine DTS, da die Synthesereaktion nicht in einem reinen DNA-Template-Format durchgeführt wird.

DTS-Ansätze werden im Allgemeinen in wässriger Lösung durchgeführt, da DNA in Wasser sehr gut löslich ist. In organischen Lösungsmitteln ist DNA normalerweise unlöslich, auf der anderen Seite werden viele organische Reaktionen in organischen Lösungsmitteln durchgeführt und sind außerdem in manchen Fällen mit Wasser nicht kompatibel. Aufbauend auf den bahnbrechenden Arbeiten von

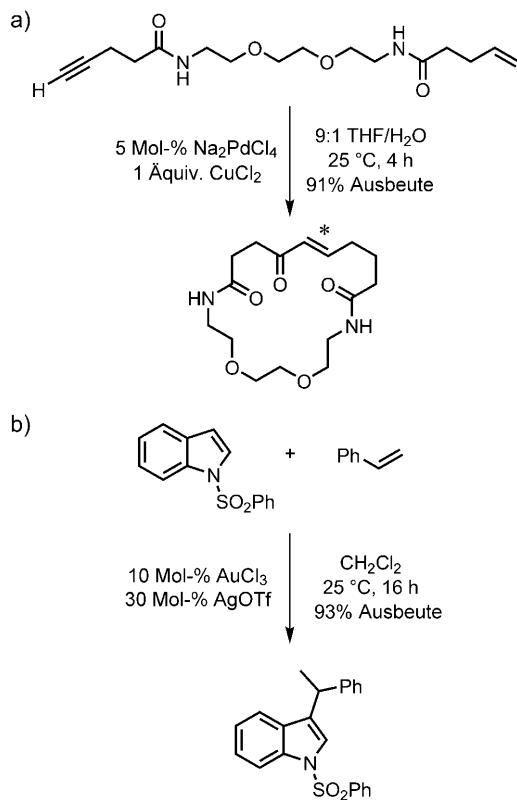


Abbildung 16. Beispiele von Reaktionen, die durch DNA-Kodierung entdeckt wurden. a) Pd^{II} -vermittelte Alken-Alkin-Makrocyclisierung.^[76] Der Stern kennzeichnet die Bindung, die beim Ringschluss gebildet wird. b) Au^{III} -vermittelte Hydroarylierung von geeignet substituierten Alkenen mit Indolen.^[78]

Okahata^[79] und anderen, die DNA durch Komplexierung mit quartären Ammoniumlipiden in organischen Lösungsmitteln solubilisierten, untersuchten Rozenman und Liu die DTS in organischen Lösungsmitteln mit minimalem Wassergehalt und fanden, dass etliche DNA-gesteuerte Reaktionen in Lösungsmitteln wie 95-proz. Acetonitril oder DMF durchgeführt werden können.^[80] Darüber hinaus liefen Reaktionen wie die Wittig-Olefinierung und die Aminacylierung in mäßigen Ausbeuten in >99.9 % organischen Lösungsmitteln (u. a. Dichlormethan) ab. In allen Fällen wurden die DNA-Verbindungen zunächst in wässriger Lösung hybridisiert und die Probe dann zur Verringerung des Wassergehalts entweder verdünnt oder gefriergetrocknet. Diese Studien wurden im Rahmen einiger der zuvor beschriebenen Experimente zur Entdeckung neuer Reaktionen genutzt.^[78]

Ein zweiter wichtiger Anwendungsbereich der DTS dient der Synthese komplexer Moleküle, besonders im Zusammenhang mit der Erstellung von Substanzbibliotheken für ein anschließendes Screening, z. B. auf Bindungsaktivität. Die bahnbrechende Arbeit auf diesem Gebiet stammte wiederum von Liu und Mitarbeitern, die die DTS im Bibliotheksformat und die Selektion einer 65 Komponenten umfassenden makrocyclischen Bibliothek beschrieben.^[81] Im DNA-Templat waren drei „Codons“ vorhanden, die die Bildung des Makrocyclus über den Einbau eines von verschiedenen organischen Bausteinen durch eine Aminacylierung an jeder von

drei benachbarten Stellen innerhalb des entstehenden Makrocyclus zuließen. Die erhaltene Bibliothek wurde *in vitro* auf ihre Proteinbindung untersucht und lieferte ein als Carboanhydraseligand bekanntes Molekül (Abbildung 17).

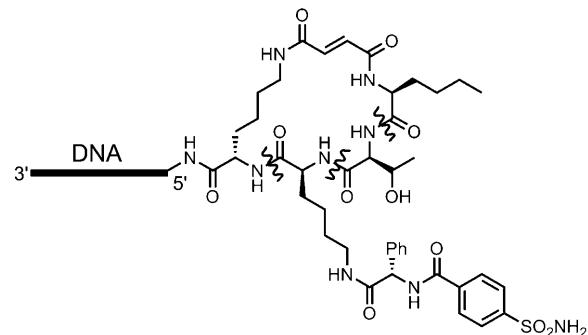


Abbildung 17. Beispiel für eine DTS zur Synthese komplexer Moleküle.^[81] Abgebildet ist das makrocyclische Endprodukt (ein bekannter Carboanhydraseligand), das durch eine spezifische DNA-Sequenz kodiert wurde. Die drei durch DTS aufgebauten Amidbindungen sind gekennzeichnet.

Später führten mehrere technische Fortschritte zum Aufbau einer >13000 Komponenten umfassenden DNA-kodierten Makrocyclenbibliothek, die ebenfalls durch Aminacylierungen unter Verwendung von drei variablen Komponenten erhalten wurde.^[82]

Liu und Mitarbeiter zeigten, dass mehrere Syntheseschritte in einer einzigen Probe durch ein DNA-Templat programmiert werden können; dagegen erforderte der oben beschriebene Ansatz zwischen allen aufeinanderfolgenden Schritten eine Reinigungsprozedur. In ihrer Studie verwendeten Liu und Mitarbeiter ein Oligonukleotid als Templat, das drei separate Regionen zur Anbindung von DNA-konjugierten Substraten aufweist. Entsprechende Substrate wurden sequenziell zugegeben und die Hybridisierung über die Temperatur moduliert, wodurch trimere DNA-verknüpfte Produkte erhalten wurden.^[83] Durch die Erfordernis einer temperaturabhängigen differenziellen Hybridisierung der DNA-konjugierten Reagentien scheint die Methode in der Zahl der sequenziellen Schritte begrenzt zu sein. Unabhängig davon zeigte die gleiche Arbeitsgruppe, dass eine DNA-gesteuerte Sequenz zur direkten Transformation von funktionalen Gruppen eines DNA-konjugierten niedermolekularen Substrats verwendet werden kann. In diesem Fall wurde ein DNA-konjugiertes Triphenylphosphan verwendet, das in einer Staudinger-Reduktion selektiv mit einem von mehreren DNA-konjugierten Aziden reagiert.^[84]

Liu und Mitarbeiter beschrieben mehrere DTS-Studien mit Peptidnukleinsäuren (PNAs).^[85] In einem Fall konnte gezeigt werden,^[86] dass eine PNA ausgehend von Tetramer- oder Pentamer-Bausteinen an einem DNA-Templat aufgebaut werden kann.^[87] Über diese Bausteine ließen sich Funktionalitäten in die PNA-Seitenketten einführen (Abbildung 18a), was einen Ansatz zur Evolution synthetischer Polymere bietet. In einer anderen Studie wurden nichtfunktionalisierte PNA-Rückgrate ohne Nukleobasen als

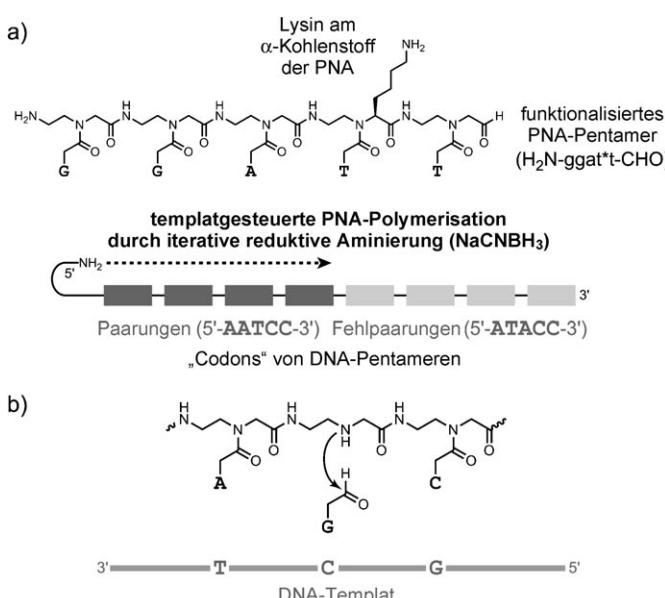


Abbildung 18. Anwendung der DTS zur Synthese von Peptidnukleinsäuren (PNAs). a) Synthese eines PNA-Polymers ausgehend von funktionisierten PNA-Pentamer-Bausteinen.^[85] b) Synthese von PNA mittels einer Templat-gesteuerten Basenergänzung.^[86] Sowohl die reduktive Aminierung (hier gezeigt mit NaCNBH_3) als auch die Aminacylierung verliefen erfolgreich.

Grundlage für DNA-gesteuerte „Basenergänzungsreaktionen“ zum Aufbau sequenzdefinierter PNA-Produkte verwendet (Abbildung 18b).^[88] Kürzlich beschrieb die Gruppe von Liu auch die erste In-vitro-Selektion von PNA-Sequenzen, bei der PNA-Polymeren mithilfe von DTS und PNA-Pentameren aufgebaut wurden.^[89] Die Arbeiten zeigen eine gewisse Verwandtschaft zu den jüngsten Arbeiten von Ghadiri und Mitarbeitern über Thioester-Peptidnukleinsäuren (tPNAs), die selbstorganisierende Eigenschaften mit Bedeutung für Selbstreparaturprozesse und Replikation haben.^[90]

Oberhuber und Joyce beschrieben eine DNA-gesteuerte Aldolreaktion zur Bildung eines Pentosezuckers (Abbildung 19).^[91] Ein 5'-Glycolaldehyd-funktionalisiertes Oligonukleotid wurde an einem DNA-Templat mit einem 3'-Glyceraldehyd-funktionalisierten Oligonukleotid in Kontakt gebracht. Bei Inkubation bei schwach alkalischerem pH-Wert (um 8.5) in Gegenwart von 10 mM Mg^{2+} entstand langsam das

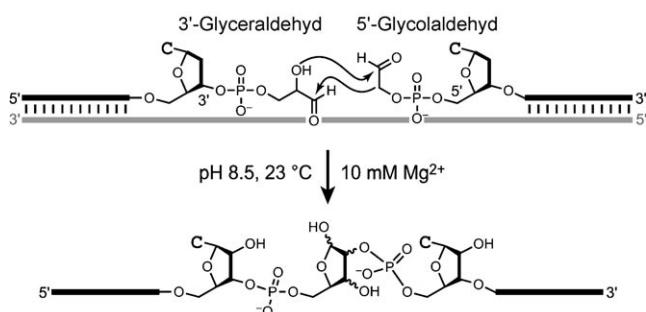


Abbildung 19. DNA-gesteuerte Aldolkondensation zur Bildung eines Pentosezuckers.^[91]

Produkt der Aldolkondensation mit $t_{1/2}$ von ca. 120 Tagen. Durch Zugabe von 50 bis 500 mM Lysin wurde die Reaktionsgeschwindigkeit um mindestens eine Größenordnung erhöht. Diese Beobachtungen deuten an, dass Nukleinsäure-Katalysatoren in Reaktionen mit potentieller Bedeutung für die präbiotische Chemie effektiv sein können.

Mehrere Arbeitsgruppen beschrieben Ansätze zum Nachweis von Nukleinsäuren, die auf einer Signalgebung (meist Fluoreszenz) durch Templat-gesteuerte Reaktionen beruhen.^[92] Cai und Mitarbeiter nutzten eine Staudinger-Reduktion, um die Fluoreszenz eines Fluorescein-Chromophors zu aktivieren (Abbildung 20).^[93] Franzini und Kool

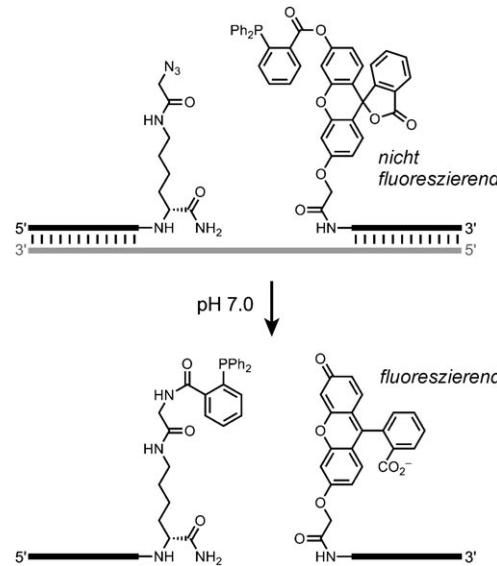


Abbildung 20. Staudinger-Reduktion zur Aktivierung eines Fluorescein-Chromophors als Beispiel für den Nachweis einer Nukleinsäure durch DTS.^[93]

verwendeten ebenfalls eine Staudinger-Reduktion zur Aktivierung der Cumarin-Fluoreszenz,^[94] während Abe und Mitarbeiter auf die reduktive Aktivierung eines Rhodamin setzten^[95] und Shibata und Mitarbeiter eine $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ -Reaktion zur Entschützung eines Aminocumarins nutzten.^[96] Pianowski und Winssinger beschrieben ähnliche Versuche mit PNA-Substraten an einem DNA-Templat,^[97] und Cai und Mitarbeiter verwendeten farbstoffderivatisierte PNA-Substrate.^[98] Grossmann und Seitz beschrieben einen DNA-gesteuerten Transfer einer Markierung von einer DNA-Sonde zu einer anderen^[99] und untersuchten in Folgearbeiten den Einfluss von Parametern wie der Reaktivität der Sonde auf die Effektivität dieser Methode.^[100] Huang und Cuoll beschrieben die DTS eines Hemicyanin-Farbstoffs in Gegenwart eines zusätzlichen niedermolekularen Diamin-Katalysator.^[101] Insgesamt scheint der Nachweis von DNA- oder RNA-Oligonukleotiden mittels ihrer Verwendung als Templat zur Signalerzeugung ein vielversprechender experimenteller Ansatz zu sein.

Weitere Forschungen gingen über die Anwendung des DTS-Ansatzes im Zusammenhang mit linearen Architekturen hinaus. Zunächst untersuchten Herrmann und Mitarbei-

ter amphiphile DNA-Blockcopolymer-Micellen.^[102] Die Hybridisierung einzelsträngiger DNA-Oligonukleotide mit der micellaren DNA platziert die Reaktanten entweder auf der Oberfläche der Micellen oder in ihrem Kern, je nachdem, an welchem Terminus die ssDNA kovalent modifiziert wurde. Erfolgreiche Reaktionen umfassten die Bildung von Isoindolen (Thiol-Oligo + Amin-Oligo + *o*-Phthalaldehyd), die Bildung von Amiden (COOH-Oligo + Amin-Oligo + EDC/Sulfo-NHS) und die Michael-Addition (Thiol-Oligo + Maleimid-Oligo). Reaktionen im Kern der Micelle sind besonders faszinierend, da die chemische Umgebung sich wesentlich von Wasser unterscheidet, was Perspektiven analog zur Anwendung von DTS-Verfahren in organischen Lösungsmitteln bietet. Weitere Anwendungen dieses Micellenbasierten Ansatzes zur DTS wurden noch nicht beschrieben.

Des Weiteren beschrieben Hansen und Mitarbeiter einen „Yoktoliter-Reaktor“, der unter Verwendung einer dreiarmligen DNA-Struktur konstruiert wurde (Abbildung 21).^[103]

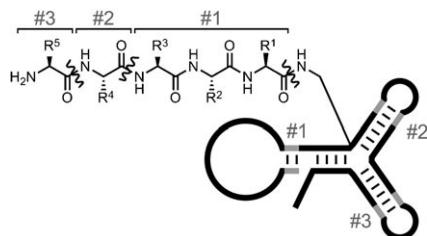


Abbildung 21. Verwendung einer dreiarmligen DNA-Struktur als „Yoktoliter-Reaktor“.^[103] Abgebildet ist eine schematische Struktur des Reaktors nach der Kupplung der dritten von drei Komponenten (Nr. 1 bis 3) am Reaktionszentrum in einer 21-stufigen Synthese. Die drei gekennzeichneten Amidbindungen sind während der DNA-kodierten Reaktionsschritte entstanden. Die Anzahl der Basenpaare ist nicht quantitativ abgebildet.

Dieser Ansatz wurde gewählt, um mehrere praktische Probleme, die mit einer linearen DTS-Architektur einhergehen, zu vermeiden; z. B. kann bei einer linearen Architektur der Abstand zwischen dem angehängten Reaktanten und dem Reaktionszentrum im Laufe des DTS-Prozesses stark variieren. Das Konstrukt ist nach Lesart der Autoren eher als ein Selbstorganisat denn eine Templat-basierte Struktur zu beschreiben. Jedes niedermolekulare Reaktionsprodukt – im beschriebenen Fall ein Pentapeptid – bleibt an den kodierenden DNA-Reaktor gebunden. Somit entspricht die synthetisierte Sammlung an Verbindungen einer DNA-kodierten Verbindungsbibliothek, wie sie ganz ähnlich in nachstehenden Abschnitten diskutiert werden.

3.2. DNA-gelenkte Katalyse

Eine DNA-gelenkte Katalyse läuft dann ab, wenn DNA als eine Matrize dient, an die ein anderes Reagens gebunden ist, das als Katalysator wirken kann. Demzufolge kann die DNA-gelenkte Katalyse als eine Variante der DTS angesehen werden. Ein frühes Beispiel der DNA-gelenkten Katalyse

wurde von Czaplinski und Sheppard berichtet, die eine Schädigung der DNA durch ein Metallosalen-DNA-Konjugat und ein zugefügtes Oxidationsmittel beschrieben (Abbildung 22).^[104] Die beschädigte DNA-Stelle konnte nachfolgend durch Reaktion mit Piperidin gespalten werden. Das Ni-Salen-Konjugat ordnet den Ni-Salen-Katalysator in der Nähe der Spaltstelle des DNA-Substrats an, bei der es sich bevorzugt um ein Guanosin-Nukleotid handelt.

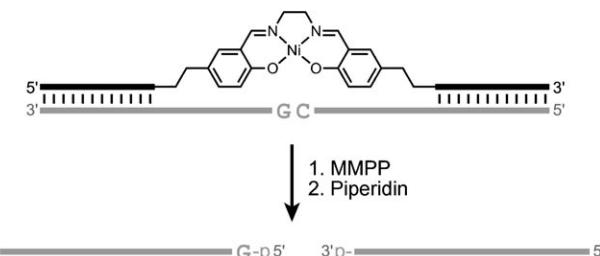


Abbildung 22. Beispiel einer DNA-gelenkten Katalyse: Ortspezifische oxidative Beschädigung der DNA durch ein Metallosalen-DNA-Konjugat und Magnesiummonoperoxyphthalat (MMPP) als Oxidationsmittel.^[104] Die Behandlung der beschädigten DNA mit Piperidin führt zur Spaltung des DNA-Strangs.

Erst kürzlich konnte durch die Arbeiten von Tang und Marx^[105] sowie von Marx, Hartig und Mitarbeitern^[106] gezeigt werden, dass die DNA-gelenkte Katalyse in mehreren interessanten Kontexten angewendet werden kann. In einem Fall dirigierte ein Prolinamid-derivatisiertes DNA-Oligonukleotid eine Aldolkondensation mit Aceton oder anderen Ketonen und DNA-gebundenen Benzaldehyd-Derivaten (Abbildung 23 a).^[105] Ein simples DNA-verknüpftes primäres Amin erwies sich als ein 170-fach weniger effektiver Katalysator, und das Prolinamid war weitgehend ineffektiv, wenn es nicht an die DNA gebunden war. Durch zyklischen Temperaturwechsel konnte sogar mit nur 5 Mol-% des Katalysators ein mehrfacher Umsatz erreicht werden. Die Stereokonfiguration am β -Kohlenstoff des Aldolprodukts wurde nicht beschrieben.

In einer zweiten Studie zeigten die Autoren, dass ein niedermolekulares Porphyrin-Aldehyd-Substrat mit einer G-Quadruplex-DNA wechselwirken kann, wodurch ebenfalls eine Prolinamid-katalysierte Aldoladdition stattfindet (Abbildung 23 b).^[106] In diesem Fall wechselwirkt der Porphyrinaldehyd nicht über Watson-Crick-Basenpaare mit der DNA (was in der ersten Studie für den DNA-gebundenen Benzaldehyd der Fall war), sondern stattdessen über nicht-kanonische Kontakte zwischen dem Porphyrin und der G-Quadruplex-DNA. Demzufolge katalysiert das DNA-gebundene Prolinamid eine Aldolreaktion zwischen zwei Substraten – dem Porphyrinaldehyd und Aceton –, von denen keines für eine Templat-gesteuerte Synthese an ein DNA-Oligonukleotid gebunden ist. Die Position der Verknüpfung für das Prolin am G-Komplex beeinflusste die Katalyse signifikant, was auf eine spezifische Wechselwirkung zwischen dem Porphyrinaldehyd und der G-Quadruplex-DNA hindeutet.

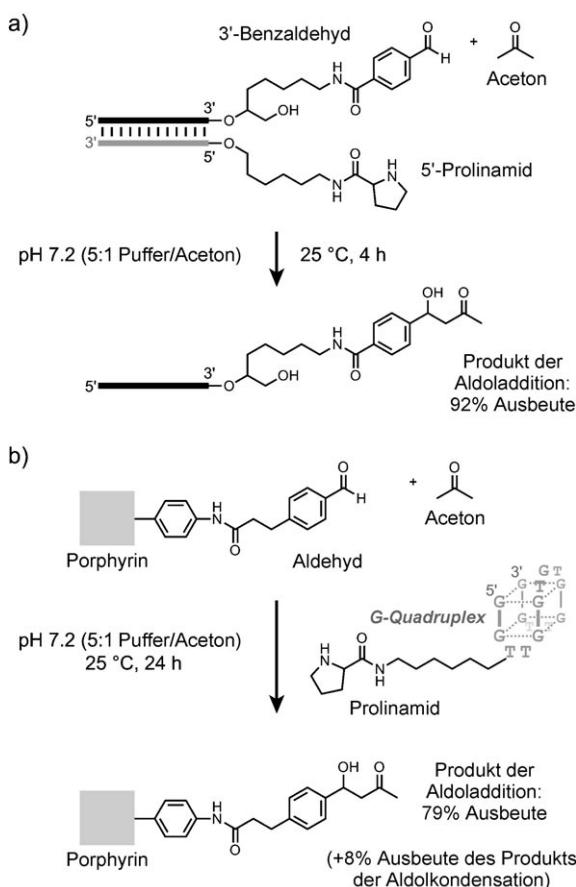


Abbildung 23. DNA-gelenkte Katalyse mit einem DNA-gebundenen Prolinderivat: a) Durch Prolinamid-DNA-Konjugate katalysierte Aldoladdition, in der ein Aldehyd an DNA gebunden ist und mit freiem Aceton reagiert.^[105] b) Durch Prolinamid-DNA-Konjugate katalysierte Aldoladdition, in der ein Porphyrin-Aldehyd-Substrat mit der G-Quadruplex-DNA über nicht-kanonische Wechselwirkungen interagiert.^[106]

3.3. DNA-gelenkte Synthese von Verbindungsbibliotheken (DNA-Display)

Das Konzept einer DNA-kodierten Verbindungsbibliothek wurde von Brenner und Lerner im Jahr 1992 vorgeschlagen.^[107] Die Schlüsselidee ist, dass eine Sammlung von Verbindungen – kleine Moleküle, Peptide usw. – durch eine von mehreren verschiedenen Methoden mit DNA-kodierten Oligonukleotiden verbunden ist. Zunächst werden die Verbindungen mit relevanter Bindungsaffinität isoliert, dann durch PCR amplifiziert und durch Analyse der DNA-Sequenz identifiziert. Die Methode wurde zum Aufbau einer Bibliothek von ca. 10^6 Heptapeptiden durch alternierende Peptid-/DNA-Festphasensynthese verwendet, die anschließend auf die Bindung von Antikörpern durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) untersucht wurde.^[108] Es sind allerdings keine weiteren Veröffentlichungen bekannt, in denen dieser spezielle Zugang zu DNA-kodierten Bibliotheken genutzt wurde. Elegante Experimente mit Bibliotheken aus PNA-kodierten Verbindungen wurden beschrieben, die räumlich adressierbare Anordnungen verwenden.^[109] Die

PNA kann allerdings nicht durch PCR vervielfältigt werden, was bestimmte Anwendungen verhindert, die mit DNA möglich sind.

Harbury und Mitarbeiter beschrieben einen als „DNA-Display“ bezeichneten Ansatz zum Aufbau DNA-kodierter Bibliotheken.^[110] Beim DNA-Display werden DNA-Sequenzmarkierungen verwendet, um die schrittweise Split-und-Pool-Synthese von Bibliotheksmitgliedern zu dirigieren (Abbildung 24). Dieser Zugang könnte auch als „sequenz-

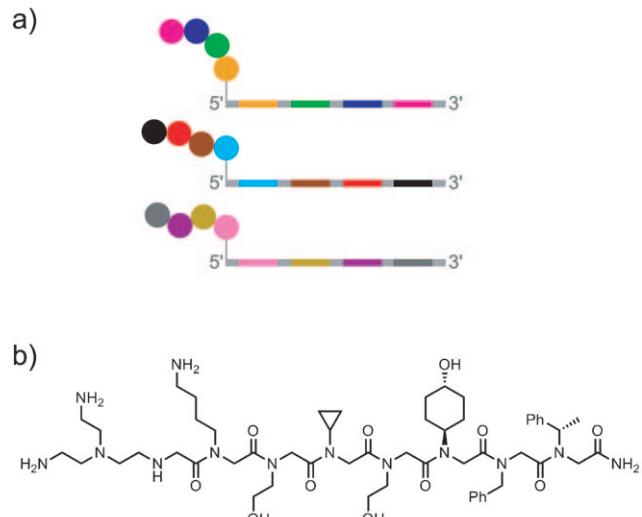


Abbildung 24. Prinzip des DNA-Display: Spezifische DNA-Sequenzen werden genutzt, um Verbindungen durch den Prozess der kombinatorischen Synthese zu lenken.^[110] a) Schematische Darstellung dreier translatierter Molekül-DNA-Konjugate, die unter Verwendung von vier DNA-Codons hergestellt wurden. Der Split-und-Pool-Ansatz, der für jeden Schritt des Aufbaus verwendet wurde, ist nicht abgebildet. b) Ein octamerer Peptoidligand mit $K_d = 16 \mu\text{M}$, identifiziert durch DNA-Display.^[111]

kodiertes Routing“ bezeichnet werden, da die DNA-Markierungen dazu verwendet werden, die wachsenden niedermolekularen Verbindungen durch den Prozess der kombinatorischen Synthese zu leiten. Anders als bei der DTS findet beim DNA-Display eine echte In-vitro-Selektion statt, d.h. mit iterativen Zyklen von Translation, Selektion und Amplifikation, die nach jeder Selektionsrunde zur Wiederherstellung der Populationsgröße führen.^[110b] Mithilfe von DNA-Display identifizierten Harbury und Mitarbeiter aus einer Bibliothek von 10^6 synthetischen Peptiden ein bekanntes Antikörper-Epitop.^[110a] In Folgearbeiten synthetisierten sie 10^8 verschiedene octamere Peptoide und entdeckten neue Liganden an der N-terminalen c-Crk-SH3-Domäne, wobei die höchste Bindungsaffinität einen Wert von $K_d = 16 \mu\text{M}$ erreichte.^[111]

3.4. DNA-kodierte selbstorganisierte Bibliotheken

Beginnend im Jahr 2004 beschrieben Neri und Mitarbeiter eine Serie von Experimenten mit DNA-kodierten selbstor-

ganisierten Bibliotheken. Diese Vorgehensweise beinhaltet den Aufbau von Bindungskandidaten ausgehend von zwei (oder potenziell mehr) Fragmenten von Verbindungen unter der Steuerung durch wechselwirkende DNA-Oligonukleotide. Die Ligandenfragmente der Kandidaten sind jedes für sich an ein spezifisches DNA-Oligonukleotid gebunden, das mit einer Hybridisierungsregion und einem kodierten Bereich ausgestattet ist (Abbildung 25).^[112] Es werden zwei

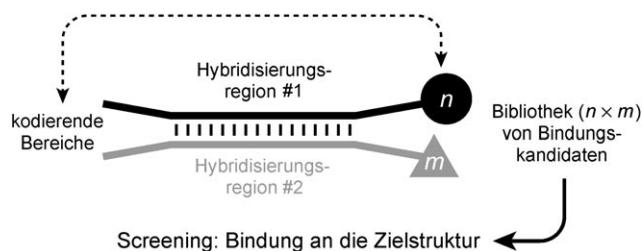


Abbildung 25. Aufbau einer DNA-kodierten selbstorganisierten Bibliothek mit $n \times m$ Verbindungen als Bindungskandidaten.

komplementäre Sequenzen für die Hybridisierungsregionen verwendet, wodurch der Aufbau einer $n \times m$ -Bibliothek resultiert, indem n verschiedene modifizierte Oligonukleotide gemischt werden, die eine Hybridisierungsregion 1 mit m modifizierten Oligonukleotiden haben, die wiederum die Hybridisierungsregion 2 aufweisen. Die erhaltene Bibliothek wurde im Hinblick auf die Bindung der zusammengefügten Ligandenfragmente an eine gewünschte Zielverbindung untersucht, und die DNA-kodierten Bereiche wurden dann durch lineare PCR-Amplifikation und anschließende Sequenzierung oder Mikroarray-Analysen identifiziert. Ähnlich den konventionelleren Herangehensweisen an die Fragmentbasierte Ligandensuche^[113] muss jeder „Treffer“, der mithilfe DNA-kodierter selbstorganisierter Bibliotheken identifiziert wurde, weiterentwickelt werden, indem die funktionellen Fragmente auf geeignete Weise kovalent verknüpft und die erhaltenen niedermolekularen Verbindungen optimiert werden.

In ihrem ursprünglichen Bericht^[114] etablierten Neri und Mitarbeiter die Grundlagen der Methodik und wendeten eine Variante des Verfahrens zur Affinitätsreifung von Verbindungen für eine starke Bindung an Serumalbumin und Carboanhydrasen an. Bei dieser Variante wird ein bekannter Ligand eingesetzt, der mit einem DNA-Oligonukleotid verknüpft ist, das nur eine Hybridisierungsregion aufweist (da kein kodierter Bereich benötigt wird). Das so erzeugte Konjugat wird mit einem Satz von Verbindungen gepaart, die mit DNA-Oligonukleotiden verknüpft sind, die die komplementäre Hybridisierungsregion zusammen mit geeigneten Kodierungsbereichen enthalten. Durch Verwendung einer Bibliothek aus 137 Verbindungen für den zweiten Strang konnte der K_d -Wert um das 40-fache verbessert werden.

Später nutzten Neri und Mitarbeiter DNA-kodierte selbstorganisierte Bibliotheken zur Identifizierung Streptavidin-bindender Verbindungen (bester K_d 1.9 nm)^[115] und zur Suche nach neuen Albumin-bindenden Verbindungen.^[116]

Die Methode der Affinitätsreifung wurde außerdem verwendet, um verbesserte Liganden zu identifizieren. In einem Beispiel wurde eine Leitstruktur mit $K_d = 100 \mu\text{M}$ für Trypsin verwendet, um eine neue Verbindung mit $K_d = 100 \text{ nm}$ zu identifizieren, was einer 10^3 -fachen Verbesserung entspricht.^[117] In einem anderen Fall wurde aus einer ssDNA-kodierten Bibliothek eine Leitstruktur zur Bindung an eine Matrixmetalloproteinase identifiziert und dann in einem zweiten DNA-kodierten Experiment einer Affinitätsreifung unterworfen, um einen Liganden mit $K_d = 10 \mu\text{M}$ zu identifizieren.^[118] Außerdem wurden wichtige technische Fortschritte sowohl im Aufbau DNA-kodierter Bibliotheken^[119] als auch bei der Hochdurchsatz-Sequenzierung erfolgreicher Liganden erzielt.^[120] Mit diesen beiden Fortschritten gelang es kürzlich, neue Inhibitoren des Tumornekrosefaktors (TNF) mit einem besten K_d -Wert von $10 \mu\text{M}$ aus einer 4000 Verbindungen umfassenden Bibliothek zu identifizieren.^[121]

Hamilton und Mitarbeiter trugen ebenfalls zur Entwicklung DNA-kodierter selbstorganisierter Bibliotheken bei. Sie beschrieben eine Untersuchung mit doppelsträngigen DNA-Matrizen^[122] und außerdem Versuche mit Quadruplex-DNA-Matrizen.^[123] Es wurden sogar Pentaplex-DNA-Matrizen vorgestellt, wenn auch nicht in einem Bibliotheksformat.^[124]

3.5. DNA-kodierte Bibliotheken mit doppelsträngigen DNA-Tags

Clark et al. beschrieben vor kurzem einen neuen Zugang zu Bibliotheken von DNA-kodierten Verbindungen.^[125] Bei dieser Methode wird ein doppelsträngiges DNA-Tag an jede niedermolekulare Verbindung der Bibliothek konjugiert (Abbildung 26). Die Überlegung war, dass durch die Verwendung doppelsträngiger DNA Probleme wie die chemische Zersetzung einzelsträngiger DNA-Tags oder die aktive Teilnahme einzelsträngiger DNA an ungewollten Bindungsergebnissen vermieden werden können. Durch Anwendung eines Split-und-Pool-Verfahrens, bei dem sich die chemische Funktionalisierung mit der enzymatischen Ligation eines

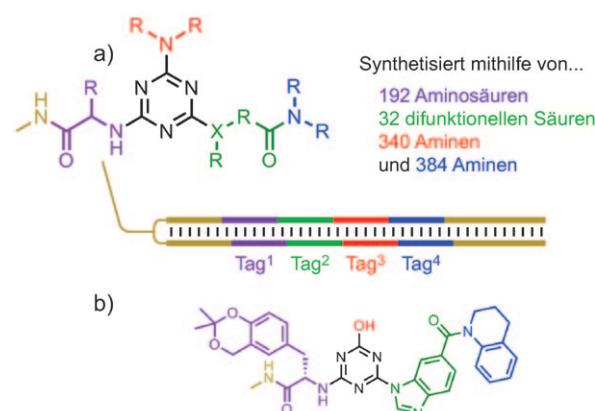


Abbildung 26. DNA-kodierte Bibliotheken, die doppelsträngige DNA-Tags verwenden. a) Prinzip einer Bibliothek, die mithilfe von Vier-Komponenten-Tags etwa 8×10^8 Verbindung differenziert.^[125] Die Zahl an Basenpaaren ist nicht quantitativ abgebildet. b) Aus der Bibliothek identifizierter MAPK-Inhibitor mit $\text{EC}_{50} \leq 7 \text{ nm}$ nach Strukturomoptimierung (Tag³ ist überflüssig) und Abspaltung von der kodierenden DNA.

geeigneten doppelsträngigen DNA-Tags abwechselt, stellten die Autoren in vier Aufbauzyklen die bemerkenswerte Zahl von 800 Millionen Verbindungen her. Analog der DTS – aber im Unterschied zum DNA-Display – ermöglicht dieser Zugang keine echte In-vitro-Selektion, da eine Amplifikation zur Wiederherstellung der Populationsgröße nicht möglich ist. Demzufolge war nach einer schon geringen Anzahl von Runden eine Hochdurchsatz-Sequenzierung der angereichten Populationen zur Identifizierung der bindenden Komponenten erforderlich. Zum Beispiel wurden nach drei Runden typischerweise zehntausende von DNA-Sequenzen in Einzelexperimenten analysiert. Der beste EC₅₀-Wert für die Inhibition von p38-MAPK (MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase) betrug ≤ 7 nm (nach separater Synthese der Verbindung ohne DNA). Mit einer Größe von 800 Millionen Verbindungen übersteigt die Bibliothek bei weitem die Größe typischer kombinatorischer Bibliotheken, sodass dieser Ansatz ein beträchtliches Potential aufweist. Darüber hinaus konnten die Autoren zeigen, dass aus ihren Daten wichtige Trends in Bezug auf die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) der Komponenten abgeleitet werden können.

3.6. Zukünftige Richtungen

Alle fünf DNA-basierten Kodierungsansätze, die wir in diesem Abschnitt beschrieben haben, haben ein gemeinsames Merkmal: Sie nutzen Watson-Crick-Basenpaarungen willkürlich gewählter DNA-Sequenzen, um ein gewünschtes Ergebnis zu erzielen. Die DNA selbst spielt keine direkte chemische Rolle, sondern wirkt indirekt als Templat oder Baustein in der DTS, der DNA-gelenkten Katalyse und beim Aufbau DNA-kodierter selbstorganisierter Bibliotheken. Jede dieser Methoden bietet einen vielversprechenden Weg zur Identifizierung neuer Liganden ebenso wie neuer chemischer Reaktionen im Falle der DTS. Für die Zukunft ist anzunehmen, dass neue Wege zur Anwendung von DNA für die Kodierung von Strukturen und Funktionen entwickelt werden.

4. DNA als stereochemisches Kontrollelement

Die letzte Anwendung der DNA, die in diesem Aufsatz vorgestellt wird, ist die Verwendung von doppelsträngiger DNA als stereochemisches Kontrollelement. In dieser Rolle übt die DNA einen chemischen Einfluss aus – aber nicht, indem sie direkt als Katalysator wirkt (wie in Abschnitt 2) oder indirekt als Templat (wie in Abschnitt 3), sondern indem sie im Verbund mit einem geeignet koordinierten Metallion eine chirale Umgebung für die asymmetrische Synthese herstellt („Hybridkatalyse“). Eine derartige Verwendung der DNA hat sich in konzeptionell analogen Studien mit Protein-basierten Hybridekatalysatoren angekündigt.^[126,127] Jedoch hat DNA für solche Anwendungen viele praktische und vielleicht auch chemische Vorteile gegenüber Proteinen.

4.1. Der erste Bericht einer DNA-basierten asymmetrischen Katalyse der Diels-Alder-Reaktion

Natürliche doppelsträngige DNA (dsDNA) wurde für eine Vielzahl von Anwendungen genutzt, z. B. zur Herstellung von Nanodrähten und photonischen Materialien.^[128] Diese Anwendungen beruhen im Allgemeinen auf Wechselwirkungen anderer Moleküle mit leicht erhältlichen dsDNA-Sorten, z. B. Lachsspermien-DNA (Lachshoden-DNA), die von kommerziellen Fischereien bezogen werden kann. Im Jahr 2005 beschrieben Roelfes und Feringa die Verwendung von Lachsspermien-DNA als chiraler Ligand in der asymmetrischen Katalyse (Abbildung 27).^[129] Das Metallion Cu²⁺

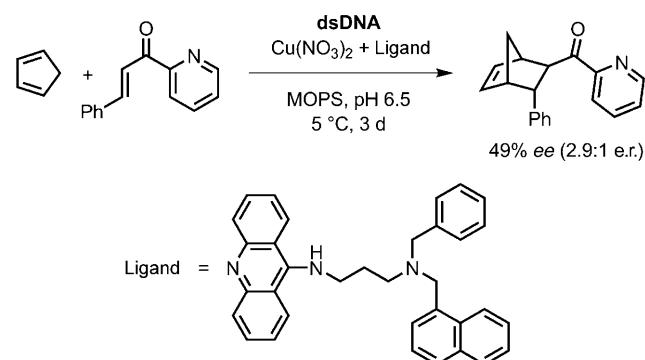


Abbildung 27. DNA-basierte asymmetrische Katalyse der Diels-Alder-Reaktion mit einem Liganden der ersten Generation nach Roelfes und Feringa.^[129]

wurde im Komplex mit einer Reihe von zweizähnigen Aminoacridinaminomethylpyridin-Liganden verwendet, die in die dsDNA interkalieren können, um eine chirale Umgebung in der Nähe des Cu²⁺ zu bilden. Mit diesem Katalysator verlief die Diels-Alder-Reaktion zwischen einem α,β -ungesättigten 2-Acylpyridin (Azachalkon) und Cyclopentadien (3 d, 5 °C, 5 Mol-% Katalysator) mit bis zu 49% Enantiomerenüberschuss (ee) für das Hauptisomer (98% *endo*, 2% *exo*), was einem Enantiomerenverhältnis (e.r.) von 2.9:1 entspricht. Der Abstandhalter zwischen den 9-Aminoacridin- und den 2-Aminomethylpyridin-Einheiten erwies sich als überaus entscheidend, da das Enantiomerenverhältnis schon bei kleinsten Veränderungen, z. B. beim Austausch des 1-Naphthylmethyl-Substituenten durch eine 2-Naphthylmethyl-Gruppe, auf ungefähr 1:1 abfiel. Welches Produkt-Enantiomer überwog, hing davon ab, welcher Ligand verwendet wurde; nahezu gleiche oder entgegengesetzte Enantioselektivitäten konnten durch einfachen Wechsel des Liganden erzielt werden.

4.2. Entwicklung der zweiten Generation an Katalysatoren für die Diels-Alder-Reaktion

In baldigen Folgestudien wurde eine zweite Generation der DNA-basierten asymmetrischen Katalyse beschrieben.^[130] In einem überarbeiteten Ansatz (Abbildung 28)

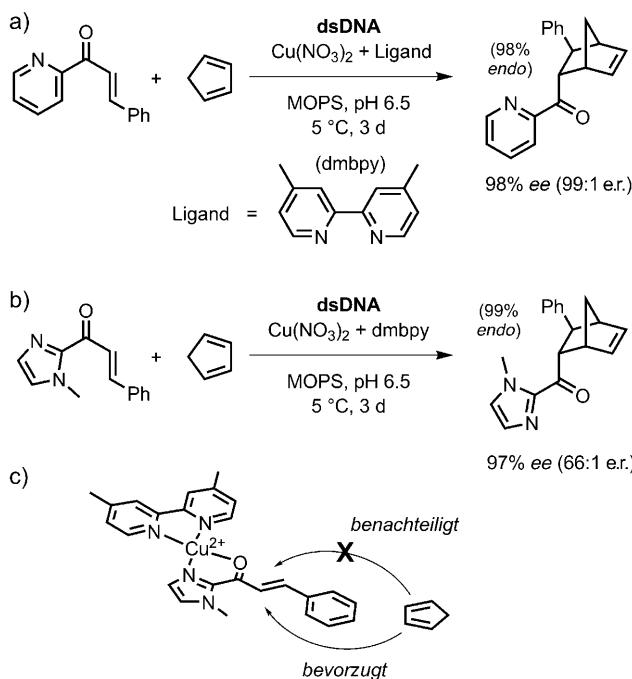


Abbildung 28. DNA-basierte asymmetrische Katalyse der Diels-Alder-Reaktion mit einem Liganden der zweiten Generation. a) Umsetzung der gleichen α,β -ungesättigten 2-Acylpyridine, die schon mit der ersten Ligandengeneration behandelt wurden (Abbildung 27).^[130] b) Umsetzung α,β -ungesättigter 2-Acylimidazole.^[131] c) Modell für die zweizähnige Bindung an Cu^{2+} durch das Dienophil in (b). Die Chiralität des dsDNA-Doppelstrangs induziert bei der Annäherung des Dienos an die beiden konkurrierenden Seiten des Dienophils die Diastereoselektivität.

wählten die Autoren einfache Cu^{2+} -Liganden, die direkt in die DNA interkalieren oder in eine DNA-Furche binden können, wohingegen in der ersten Generation noch die Liganden die DNA-Interkalation räumlich von der Metallkoordination trennen. Damit erlaubt die Methode der zweiten Generation einen „direkten“ Chiralitätstransfer von der DNA auf das Substrat der Reaktion.

Die Liganden der zweiten Generation, bei denen es sich um Derivate von Phenanthrolin (phen) oder 2,2'-Bipyridin (bpy) handelt, erwiesen sich als besonders effektiv in der enantioselektiven Katalyse. Das beste Beispiel war 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin (dmbpy; Abbildung 28a), das einen Satz von drei Dienophilen mit einer *endo*-Selektivität von $\geq 99:1$ und $\geq 97\% ee$ (32:1 e.r.) mit Cyclopentadien umsetzte.^[130] In einigen Fällen wurden sogar Enantioselektivitäten von $> 99\% ee$ ($> 199:1$ e.r.) erreicht. Ein α,β -ungesättigtes 2-Acylimidazol anstelle des zuvor eingesetzten α,β -ungesättigten 2-Acylpyridins wurde ebenfalls effektiv umgesetzt (Abbildung 28b).^[131] Sowohl das ursprüngliche 2-Acylpyridin als auch das neue 2-Acylimidazol können über das N- und das O-Atom zweizähnig an Cu^{2+} koordinieren, wodurch eine starre Ebene zur Differenzierung der zwei möglichen Angriffsseiten am Substrat gebildet wird (Abbildung 28c). Wieder erwies sich der dmbpy-Ligand als optimal, da er bei sehr hohem Umsatz (90%) ebenso hohe Enantioselektivitäten lieferte. Diese hohen Enantioselektivitäten konnten über eine Reihe

von Dienophilen aufrechterhalten werden; z.B. erzielte ein Vinyl-substituiertes 2-Acylimidazol 83% *ee* (11:1 e.r.). Die Imidazolgruppe konnte nachfolgend abgespalten werden (MeOTf ; MeOH/DBU) unter Bildung einer Methylesterfunktion.

Ebenfalls Roelfes et al. berichteten über eine modulare Methode, bei der ein Cu^{2+} -bpy-Komplex an den 3'-Terminus eines DNA-Oligonukleotids konjugiert und das Konjugat mit zwei weiteren DNA-Oligonukleotiden zu einem doppelsträngigen Komplex hybridisiert wurde, der für die asymmetrische Synthese geeignet ist (Abbildung 29).^[132] Je nach

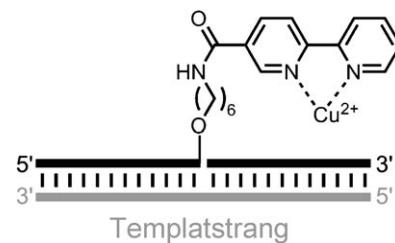


Abbildung 29. Modularer Aufbau des Cu^{2+} -bpy-Katalysators für die DNA-basierte asymmetrische Katalyse.^[132]

DNA-Sequenz und Aufbau des Abstandhalter zwischen der DNA und Cu^{2+} -bpy wurden hohe Enantioselektivitäten von bis zu 93% *ee* (28:1 e.r.) erzielt. Aufgrund des modularen Designs konnten die Parameter effizient optimiert werden.

4.3. DNA-basierte asymmetrische Katalyse anderer Reaktionen

In einer Reihe von Fällen wurde das Konzept der DNA-basierten asymmetrischen Katalyse auf andere Reaktionen als die Diels-Alder-Reaktion übertragen. Das erste solcher Beispiele wurde von Shibata und Mitarbeitern vorgestellt (Abbildung 30a), die Lachsspermien-DNA, Cu^{2+} und einen

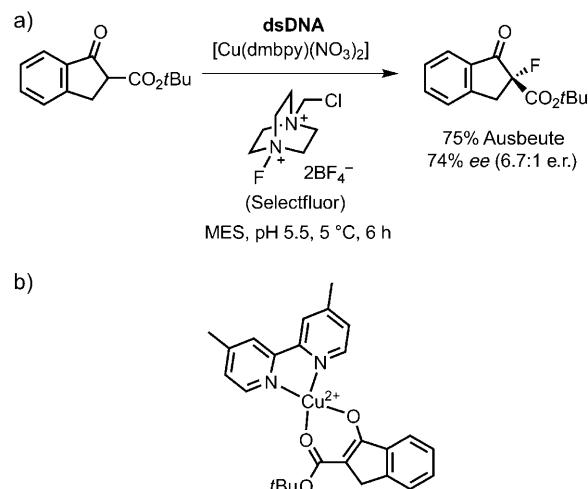


Abbildung 30. DNA-basierte asymmetrische Katalyse zur Bildung von C-F-Bindungen.^[133] a) Bestes Beispiel im Hinblick auf Enantioselektivität. b) Zweiwähniges Bindungsmodell für die Wechselwirkung zwischen dem Substrat mit Cu^{2+} und dem dmbpy-Liganden.

Liganden wie dmpipy sowie eine elektrophile Fluorquelle einsetzen, um Indanon-2-carbonsäureester mit bis zu 74 % *ee* (6.7:1 *e.r.*) zu fluorieren.^[133] Indanon-2-carboxylat kann zweizähnig an $[\text{Cu}^{2+}(\text{dmbipy})]$ koordinieren (Abbildung 30b; man vergleiche mit Abbildung 28c), wodurch sich eine starre Struktur zur DNA-Interkalation ergibt.

Die DNA-basierte asymmetrische Katalyse wurde auch auf Michael-Reaktionen angewendet (Abbildung 31).^[134]

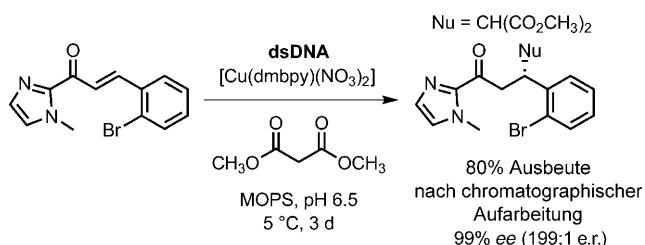


Abbildung 31. DNA-basierte asymmetrische Katalyse der Michael-Reaktion.^[134]

Hierbei wurde das gleiche α,β -ungesättigte 2-Acylimidazol, das schon in der Diels-Alder-Reaktion eingesetzt wurde, für die Michael-Reaktion mit dem Dimethylmalonat-Anion oder Nitromethan als Nucleophil verwendet (bis 99 % *ee*; 199:1 *e.r.*). Die Richtung der Enantioselektivität kann auf die gleiche Weise wie im Fall der Diels-Alder-Reaktion (Abbildung 28c) mit einer faciellen Selektivität erklärt werden. In einem Beispiel wurde die Michael-Reaktion im 1-mmol-Maßstab (entsprechend ca. 300 mg des Elektrophils) in 80 % Ausbeute und mit 99 % *ee* nach säulenchromatographischer Reinigung durchgeführt. Die Katalysatorlösung konnte außerdem für einen weiteren Reaktionszyklus wiederverwendet werden. Bemerkenswert ist, dass die Katalyse in Wasser ablief, was für enantioselektive Katalysen von Michael-Reaktionen ungewöhnlich ist.

Die gleiche Arbeitsgruppe erforschte auch die DNA-basierte asymmetrische Katalyse der Friedel-Crafts-Reaktion (Abbildung 32).^[135] Als elektrophile Komponente wurde α,β -ungesättigtes 2-Acylimidazol verwendet, das mit einem substituierten Indol – ebenfalls ungewöhnlich – in Wasser reagierte. Die Enantioselektivität betrug 93 % *ee* (28:1 *e.r.*), und es wurde die gleiche faciale Selektivität wie im Fall der Diels-Alder- und Michael-Reaktionen beobachtet.

Kraemer und Mitarbeiter beschrieben eine Cu^{2+} -katalysierte Hydrolyse von Picolinsäureester mit PNA-konjugierten

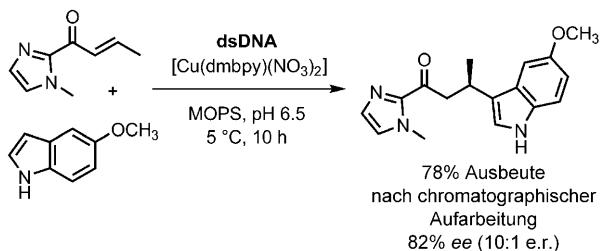


Abbildung 32. DNA-basierte asymmetrische Katalyse der Friedel-Crafts-Reaktion.^[135]

Metallkomplexen und Estern im Verbund mit einem komplementären DNA-Strang.^[136] Im Großen und Ganzen ähnelt die Vorgehensweise dem modularen Ansatz von Abbildung 29, außer dass PNA statt DNA verwendet wurde.

4.4. Was ist die Rolle der DNA in der DNA-basierten asymmetrischen Katalyse?

Die Idee, helicale dsDNA als großen chiralen Liganden einzusetzen, scheint instinktiv reizvoll. Wahrscheinlich besteht die Rolle der DNA einfach darin, eine chirale Umgebung zur Verfügung zu stellen, die die Symmetriebeziehung zweier konkurrierender Übergangszustände aufhebt, die in Abwesenheit der DNA enantiomer sind. Darüber hinaus könnte die DNA aber auch die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflussen, und funktionelle Gruppen der DNA könnten direkt an der Katalyse teilnehmen. In mehreren Fällen wurden Experimente durchgeführt, um zu ermitteln, welche dieser Rollen dsDNA in der DNA-basierten asymmetrischen Katalyse spielt. Einzelsträngige DNA erwies sich in diesen Tests als unfähig, eine Stereoselektivität zu induzieren.^[137]

Mit den in Abschnitt 4.1 beschriebenen Liganden der ersten Generation kann die dsDNA als chiraler Baustein fungieren, eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit wurde in diesen Fällen jedoch nicht beobachtet.^[138] Mit den Liganden der zweiten Generation aus Abschnitt 4.2 wird dagegen die Rolle der DNA schon vielseitiger. Die bloße Anwesenheit von dsDNA führt hier zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit um bis zu zwei Größenordnungen sowohl bei Diels-Alder-^[137] als auch bei Friedel-Crafts-Reaktionen.^[135] Das hat zur Folge, dass nicht alle Liganden zu jedem Zeitpunkt vollständig an die DNA gebunden sein müssen, damit eine effektive Stereokontrolle gewährleistet ist, weil die ungebundenen Liganden eine geringere Reaktionsbeschleunigung bewirken.

Die Nukleotidsequenz könnte ebenfalls wichtig für die DNA-basierte asymmetrische Katalyse sein. Falls die dsDNA nur als großer chiraler Ligand dient, sollte man nicht erwarten, dass die Sequenz relevant wäre. Dennoch ist ein gewisser Grad an Sequenzabhängigkeit möglich, da sich die DNA-Nukleobasen in der Nähe des katalytischen Metalls befinden und weil die Struktur eines DNA-Doppelstrangs nicht völlig unabhängig von der Sequenz ist. Tatsächlich konnte in einigen Fällen ein eindeutiger Beitrag der DNA-Sequenz zur Stereoselektivität ausgemacht werden.^[135, 137] Aus Gründen, die bislang nicht völlig klar sind, führen GC-reiche Sequenzen (insbesondere solche mit mehreren G in Folge) zu einer höheren Stereoselektivität als AT-reiche Sequenzen (zumindest in Diels-Alder-Reaktionen).

Um ein vollständiges Verständnis der Rolle der DNA in der DNA-basierten asymmetrischen Katalyse zu gewinnen, bedarf es letztendlich dreidimensionaler Modelle des DNA-Substrat-Komplexes im Verlauf der Reaktion. Solche Modelle wurden zwar vorgeschlagen,^[131] allerdings wären Strukturdaten zur Bestätigung dieser Vorschläge hilfreich – idealerweise mit hoher Auflösung, wie sie bislang nicht zur Verfügung steht.

4.5. Weitere Beispiele für DNA-basierte Stereoselektivität

Neben den oben beschriebenen Arbeiten wurde DNA (oder einzelne Komponenten der DNA) auch noch auf andere Weise in stereoselektiven Reaktionen eingesetzt. Abbildung 33 fasst die bislang bekannten Beispiele zusammen. Die Selektivitäten, die hier erzielt wurden, sind relativ gering, und es sind sicher weitere Anstrengungen nötig.

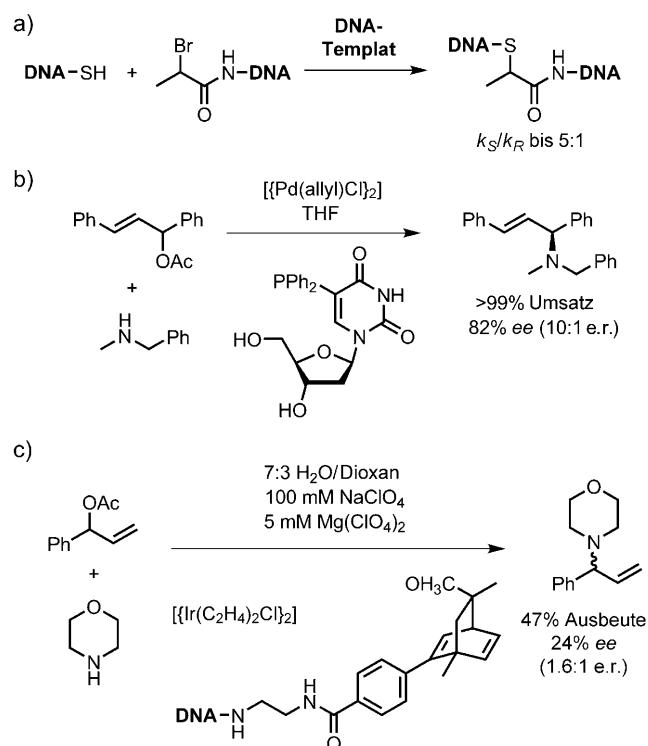


Abbildung 33. Weitere Beispiele für DNA-basierte Enantioselektivität.
a) Addition eines Thiols an ein α -Bromamid im Kontext einer DTS.^[139]
b) Pd-katalysierte allylische Aminierung in Gegenwart eines Ph_2P -modifizierten Uridin-DNA-Nukleosids.^[140] c) Ir-katalysierte allylische Aminierung in Gegenwart eines Dien-modifizierten DNA-Oligonukleotids.^[142]

In einer DTS (Abschnitt 3.1) wurde für die $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion eines DNA-konjugierten Thiols mit einem DNA-konjugierten α -Bromamid Stereoselektivität beobachtet (Abbildung 33a).^[139] Das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten der beiden α -Bromamid-Enantiomere war relativ gering (maximales Verhältnis 5). Die zwei enantiomeren α -Bromamide verhalten sich im Kontext der DTS diastereomer, was zu unterschiedlichen Aktivierungsenergien ihrer Reaktionen mit DNA-bundenen Thiolgruppen führt.

Kamer und Mitarbeiter führten einen Ph_2P -Substituenten an die 5-Position des monomeren Uridin-DNA-Nukleosids sowie in mehrere DNA-Trimere ein^[140] und untersuchten diese Liganden in Pd-katalysierten asymmetrischen allylischen Amidierungen (Abbildung 33b). Mit dem funktionalisierten Uridin-Monomer wurden in THF bis zu 82 % ee (10:1 e.r.) erzielt, wobei ein erheblicher Lösungsmittelleffekt festgestellt wurde; z.B. wurde in DMF das entgegengesetzte Enantiomer mit 14 % ee (1.3:1 e.r.) erhalten. Die modifizier-

ten DNA-Trimere ergaben nur niedrige Enantioselektivitäten ($\leq 12\% \text{ ee}$). Trotz der bislang mäßigen Resultate gibt dieser Bericht einen wichtigen Fingerzeig für weitere Studien an chemisch modifizierten DNA-Monomeren oder -Oligomeren als asymmetrische Katalysatoren. Jäschke und Mitarbeiter beschrieben mehrere DNA-basierte Phosphanliganden,^[141] über deren Anwendung in der Katalyse aber noch nicht berichtet wurde.

Ebenfalls Jäschke und Mitarbeiter synthetisierten DNA-Oligonukleotide, die eines von mehreren Dien-modifizierten Cytosin-Monomeren enthielten (Abbildung 33c).^[142] Die DNA-Moleküle wurden mit einer Iridiumverbindung zu einem Satz von (DNA-Dien)-Iridium(I)-Hybridkatalysatoren kombiniert, die in allylischen Aminierungen getestet wurden. Die höchste Enantioselektivität, die in dieser ersten Studie erreicht wurde, war 24 % ee (1.6:1 e.r.). Die Richtung der Enantioselektivität ließ sich durch die Art des zur Dien-DNA komplementären DNA- oder RNA-Oligonukleotids signifikant beeinflussen, was eine klare Perspektive für die Feinabstimmung des Katalysators in Bezug auf die Stereoselektivität bietet.

Vogel und Mitarbeiter führten einen Aza-Kronenether als Cu^{2+} -Bindungsstelle in die DNA ein.^[143] Die höchste Enantioselektivität, die in der Diels-Alder-Reaktion zwischen 2-Acylpyridin und Cyclopentadien erzielt wurde, betrug nur 10 % (1.2:1 e.r.).

4.6. Zukünftige Richtungen

Die bisherigen Ergebnisse auf dem Gebiet der DNA-basierten asymmetrischen Katalyse erscheinen sehr vielversprechend, insbesondere was die in Abschnitt 4.2 beschriebenen Liganden der zweiten Generation betrifft. Eine Ausdehnung der Konzepte auf möglichst viele chemische Reaktionen (Abschnitt 4.3) wird wichtig sein, um den präparativen Wert der Methode zu belegen. Die entscheidende Herausforderung wird ein strukturell basiertes Verständnis der Katalyse sein (Abschnitt 4.4).

Ein logischer Schritt dürfte darin bestehen, den an das Metall koordinierenden Liganden direkt an das DNA-Nukleotid zu binden, anstatt auf nichtkovalente Wechselwirkungen des Liganden mit der dsDNA (durch Interkalation) zurückzugreifen. Einige der in Abschnitt 4.5 beschriebenen Arbeiten gehen in diese Richtung. Wie Roelfes anmerkte,^[127] war in der Protein-basierten asymmetrischen Katalyse dieser Ansatz der direkten Anbindung wenig erfolgreich, was wohl teilweise daran lag, dass der Ansatz nicht modular ist und jede einzelne Kombination aus Substrat und Katalysator einen erheblichen Arbeitsaufwand zur Optimierung der Enantioselektivität erfordert. Dessen ungeachtet können sich solche Methoden für die DNA-basierte Katalyse als erfolgreich herausstellen.

Eine Hauptmotivation für die weitere Erforschung der DNA-basierten asymmetrischen Katalyse besteht in der Aussicht, gezielte Enantiomere eines gewünschten Produkts in präparativ nützlichem Maßstab synthetisieren zu können (wie es selbstredend für die gesamte asymmetrischen Katalyse gilt). Im Hinblick darauf sollte eine verstärkte Auf-

merksamkeit der Suche nach praktischen Anwendungen der DNA-basierten asymmetrischen Katalyse in „echten“ Synthesen gelten. Die verfügbaren Daten (siehe etwa Abbildung 31) sind in diesem Zusammenhang vielversprechend.

5. Zusammenfassung

Dieser Aufsatz beschreibt drei verschiedene Möglichkeiten, die Chemiker für eine „künstliche“ Anwendung von DNA entwickelt haben: als Katalysator, als Kodierungselement und als Stereokontrollelement. In jedem dieser Fälle, die gänzlich verschiedenen Prinzipien unterliegen, wurden die chemischen Eigenschaften der DNA strategisch genutzt, um neue konzeptionelle und praktische Fortschritte zu ermöglichen. Für die Anwendung der DNA als Katalysator ist die Fähigkeit eines DNA-Einzelstrangs zur Bildung komplexer dreidimensionaler Strukturen eine Grundvoraussetzung. Die funktionellen Gruppen der DNA (im Verbund mit den koordinierten Metallionen) sind in diesem Fall aktiv beteiligt, was konzeptionell, wenn auch nicht immer mechanistisch, den Funktionsweisen von Protein-Enzymen analog ist. In Anwendungen als Kodierungselement wird die Sequenzinformation der DNA dazu verwendet, ein gewünschtes chemisches Ergebnis zu erzielen. Die DNA bewirkt hier nicht direkt eine chemische Reaktion, sondern dient vielmehr als Templat oder Matrize. Als Element zur Stereokontrolle schließlich übt der DNA-Doppelstrang die entscheidende asymmetrische Induktion aus, die eine chemische Reaktion auf einen bestimmten von mehreren konkurrierenden Wegen lenkt.

Die Rolle der DNA als genetisches Material ist nur eine Möglichkeit für die Verwendung dieses faszinierenden Moleküls, das vor mehr als 140 Jahren aus einer biologischen Quelle isoliert wurde. Das Vorstellungsvermögen der Chemiker wird in Zukunft sicher weit über die Grenzen der in diesem Aufsatz beschriebenen Arbeiten hinausgehen, um weitere interessante und nützliche Anwendung der DNA zu entdecken.

Mein Dank gilt allen Doktoranden, Postdoktoranden und Studenten, die zu unseren Forschungen über DNA-Katalyse beigetragen haben. Ich danke Claudia Höbartner für Anmerkungen und Vorschläge zum Manuskript. Den folgenden Institutionen danke ich für die Finanzierung unserer Forschungsarbeiten: National Institutes of Health, National Science Foundation, David and Lucile Packard Foundation, Defense Threat Reduction Agency, Burroughs Wellcome Fund, March of Dimes, ACS Petroleum Research Fund und University of Illinois.

Eingegangen am 11. November 2009,
veränderte Fassung am 22. Januar 2010
Online veröffentlicht am 28. Juli 2010

Übersetzt von Dr. Farina Schill, Göttingen

[1] R. Dahm, *Am. Sci.* **2008**, 96, 320–327.

- [2] a) O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1944**, 79, 137–158; b) M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1994**, 179, 385–394; c) M. McCarty, *Nature* **2003**, 421, 406.
- [3] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737–738.
- [4] M. H. Wilkins, A. R. Stokes, H. R. Wilson, *Nature* **1953**, 171, 738–740.
- [5] R. E. Franklin, R. G. Gosling, *Nature* **1953**, 171, 740–741.
- [6] R. L. Strausberg, S. Levy, Y. H. Rogers, *Drug Discovery Today* **2008**, 13, 569–577.
- [7] a) S. Klussmann, *The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 2006; b) Y. Li, Y. Lu, *Functional Nucleic Acids for Analytical Applications*, Springer, New York, 2009.
- [8] a) J. Liu, Z. Cao, Y. Lu, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 1948–1998; b) I. Willner, M. Zayats, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 6528–6538; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 6408–6418.
- [9] a) J. Macdonald, D. Stefanovic, M. N. Stojanovic, *Sci. Am.* **2008**, 299, 84–91; b) M. N. Stojanovic, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2008**, 82, 199–217; c) Y. Benenson, *Mol. BioSyst.* **2009**, 5, 675–685.
- [10] D. Y. Zhang, A. J. Turberfield, B. Yurke, E. Winfree, *Science* **2007**, 318, 1121–1125.
- [11] a) H. Liu, D. Liu, *Chem. Commun.* **2009**, 2625–2636; b) M. Endo, H. Sugiyama, *ChemBioChem* **2009**, 10, 2420–2443; c) P. W. Rothemund, *Nature* **2006**, 440, 297–302; d) S. M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Hogberg, F. Graf, W. M. Shih, *Nature* **2009**, 459, 414–418; e) H. Dietz, S. M. Douglas, W. M. Shih, *Science* **2009**, 325, 725–730; f) J. Zheng, J. J. Birktoft, Y. Chen, T. Wang, R. Sha, P. E. Constantinou, S. L. Ginell, C. Mao, N. C. Seeman, *Nature* **2009**, 461, 74–77.
- [12] a) S. K. Silverman, *Mol. BioSyst.* **2007**, 3, 24–29; b) G. Zocchi, *Annu. Rev. Biophys.* **2009**, 38, 75–88.
- [13] T. Hermann, D. J. Patel, *Science* **2000**, 287, 820–825.
- [14] S. K. Silverman in *Functional Nucleic Acids for Analytical Applications* (Hrsg.: Y. Li, Y. Lu), Springer, New York, 2009, S. 47–108.
- [15] G. F. Joyce, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, 73, 791–836.
- [16] G. F. Joyce, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 6540–6557; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 6420–6436.
- [17] S. K. Silverman in *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology* (Hrsg.: T. P. Begley), Wiley, Hoboken, 2009.
- [18] R. R. Breaker, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **1994**, 1, 223–229.
- [19] S. K. Silverman, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 6151–6163.
- [20] S. K. Silverman, D. A. Baum, *Methods Enzymol.* **2009**, 469, 95–117.
- [21] S. W. Santoro, G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 4262–4266.
- [22] S. K. Silverman, *Chem. Commun.* **2008**, 3467–3485.
- [23] a) D. S. Tawfik, A. D. Griffiths, *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16, 652–656; b) O. J. Miller, K. Bernath, J. J. Agresti, G. Amitai, B. T. Kelly, E. Mastrobattista, V. Taly, S. Magdassi, D. S. Tawfik, A. D. Griffiths, *Nat. Methods* **2006**, 3, 561–570.
- [24] a) M. Levy, K. E. Griswold, A. D. Ellington, *RNA* **2005**, 11, 1555–1562; b) H. S. Zaher, P. J. Unrau, *RNA* **2007**, 13, 1017–1026.
- [25] J. J. Agresti, B. T. Kelly, A. Jaschke, A. D. Griffiths, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 16170–16175.
- [26] D. L. Robertson, G. F. Joyce, *Nature* **1990**, 344, 467–468.
- [27] M. Chandra, S. K. Silverman, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 2936–2937.
- [28] a) D. A. Baum, S. K. Silverman, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, 65, 2156–2174; b) K. Schlosser, Y. Li, *Chem. Biol.* **2009**, 16, 311–322.
- [29] a) R. L. Coppins, S. K. Silverman, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 16426–16432; b) Y. Wang, S. K. Silverman, *Biochemistry* **2005**, 44, 3017–3023; c) W. E. Purtha, R. L. Coppins, M. K. Smalley, S. K. Silverman, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 13124–13125.

- [30] S. K. Silverman, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1521–1531.
- [31] a) Y. Wang, S. K. Silverman, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6880–6881; b) Y. Wang, S. K. Silverman, *Biochemistry* **2003**, *42*, 15252–15263; c) R. L. Coppins, S. K. Silverman, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 270–274; d) R. L. Coppins, S. K. Silverman, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2900–2907; e) E. D. Pratico, Y. Wang, S. K. Silverman, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 3503–3512; f) Y. Wang, S. K. Silverman, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6013–6016; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5863–5866.
- [32] M. C. Wahl, C. L. Will, R. Lührmann, *Cell* **2009**, *136*, 701–718.
- [33] a) F. Michel, J. L. Ferat, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 435–461; b) H. Nielsen, E. Westhof, S. Johansen, *Science* **2005**, *309*, 1584–1587.
- [34] P. I. Pradeepkumar, C. Höbartner, D. A. Baum, S. K. Silverman, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1777–1781; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1753–1757.
- [35] T. P. Mui, S. K. Silverman, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4417–4420.
- [36] D. A. Baum, S. K. Silverman, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3572–3574; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3502–3504.
- [37] B. Cuenoud, J. W. Szostak, *Nature* **1995**, *375*, 611–614.
- [38] a) Y. Li, R. R. Breaker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 2746–2751; b) Y. Li, Y. Liu, R. R. Breaker, *Biochemistry* **2000**, *39*, 3106–3114; c) A. Sreedhara, Y. Li, R. R. Breaker, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3454–3460.
- [39] a) D. J. Chinnapan, D. Sen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 65–69; b) D. J. Chinnapan, D. Sen, *J. Mol. Biol.* **2007**, *365*, 1326–1336.
- [40] R. E. Thorne, D. J. Chinnapan, G. S. Sekhon, D. Sen, *J. Mol. Biol.* **2009**, *388*, 21–29.
- [41] a) N. Carmi, L. A. Shultz, R. R. Breaker, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 1039–1046; b) N. Carmi, S. R. Balkhi, R. R. Breaker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 2233–2237; c) N. Carmi, R. R. Breaker, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2589–2600.
- [42] S. A. Kazakov, T. G. Astashkina, S. V. Mamaev, V. V. Vlassov, *Nature* **1988**, *335*, 186–188.
- [43] T. L. Sheppard, P. Ordoukhalian, G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 7802–7807.
- [44] C. Höbartner, P. I. Pradeepkumar, S. K. Silverman, *Chem. Commun.* **2007**, 2255–2257.
- [45] O. Amosova, R. Coulter, J. R. Fresco, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 4392–4397.
- [46] M. Chandra, A. Sachdeva, S. K. Silverman, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 718–720.
- [47] M. I. Fekry, K. S. Gates, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 710–711.
- [48] G. K. Schroeder, C. Lad, P. Wyman, N. H. Williams, R. Woldfenden, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 4052–4055.
- [49] a) M. Levy, A. D. Ellington, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 417–426; b) Y. Shen, W. Chiuman, J. D. Brennan, Y. Li, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1343–1348; c) M. M. Ali, Y. Li, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3564–3567; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3512–3515.
- [50] a) M. N. Stojanovic, T. E. Mitchell, D. Stefanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3555–3561; b) J. J. Tabor, M. Levy, A. D. Ellington, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2166–2172; c) J. Liu, Y. Lu, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7731–7734; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7587–7590.
- [51] M. Famulok, J. S. Hartig, G. Mayer, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3715–3743.
- [52] a) Y. Li, D. Sen, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 743–747; b) Y. Li, D. Sen, *Biochemistry* **1997**, *36*, 5589–5599; c) Y. Li, D. Sen, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 1–12; d) C. R. Geyer, D. Sen, *J. Mol. Biol.* **2000**, *299*, 1387–1398.
- [53] a) J. R. Prudent, T. Uno, P. G. Schultz, *Science* **1994**, *264*, 1924–1927; b) M. M. Conn, J. R. Prudent, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7012–7013; c) S.-M. Chun, S. Jeong, J.-M. Kim, B.-O. Chong, Y.-K. Park, K. Park, J. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10844–10845.
- [54] K. N. Morris, T. M. Tarasow, C. M. Julin, S. L. Simons, D. Hilvert, L. Gold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 13028–13032.
- [55] a) P. Travascio, Y. Li, D. Sen, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 505–517; b) P. Travascio, A. J. Bennet, D. Y. Wang, D. Sen, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 779–787.
- [56] C. Höbartner, S. K. Silverman, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7564–7568; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7420–7424.
- [57] a) B. Seelig, A. Jäschke, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 167–176; b) B. Seelig, S. Keiper, F. Stuhlmann, A. Jäschke, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4764–4768; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4576–4579; c) F. Stuhlmann, A. Jäschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3238–3244; d) J. C. Schlatterer, F. Stuhlmann, A. Jäschke, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1089–1092; e) S. Keiper, D. Bebenroth, B. Seelig, E. Westhof, A. Jäschke, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1217–1227; f) A. Serganov, S. Keiper, L. Malinina, V. Tereshko, E. Skripkin, C. Höbartner, A. Polonskaia, A. T. Phan, R. Wombacher, R. Micura, Z. Dauter, A. Jäschke, D. J. Patel, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 218–224; g) M. Helm, M. Petermeier, B. Ge, R. Fiammengo, A. Jäschke, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10492–10493; h) R. Wombacher, S. Keiper, S. Suhm, A. Serganov, D. J. Patel, A. Jäschke, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2529–2533; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2469–2472; i) S. Amontov, A. Jäschke, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5032–5038; j) A. Y. Kobitski, A. Nierth, M. Helm, A. Jäschke, G. U. Niemehaus, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 2047–2059.
- [58] a) G. Sun, J. Fan, Z. Wang, Y. Li, *Synlett* **2008**, *16*, 2491–2494; b) J. Fan, G. Sun, C. Wan, Z. Wang, Y. Li, *Chem. Commun.* **2008**, 3792–3794.
- [59] a) J. Nowakowski, P. J. Shim, G. F. Joyce, C. D. Stout, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1999**, *55*, 1885–1892; b) J. Nowakowski, P. J. Shim, G. S. Prasad, C. D. Stout, G. F. Joyce, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 151–156.
- [60] a) J. A. Gerlt, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 454–455; b) M. C. Ho, J. F. Menetret, H. Tsuruta, K. N. Allen, *Nature* **2009**, *459*, 393–397.
- [61] P. C. Bevilacqua, R. Yajima, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 455–464.
- [62] A. M. Pyle, *Science* **1993**, *261*, 709–714.
- [63] a) J. B. Murray, A. A. Seyhan, N. G. Walter, J. M. Burke, W. G. Scott, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 587–595; b) A. T. Perrotta, M. D. Been, *Biochemistry* **2006**, *45*, 11357–11365; c) A. Roth, A. Nahvi, M. Lee, I. Jona, R. R. Breaker, *RNA* **2006**, *12*, 607–619.
- [64] a) D. M. J. Lilley, *Biol. Chem.* **2007**, *388*, 699–704; b) A. T. Perrotta, I. Shih, M. D. Been, *Science* **1999**, *286*, 123–126; c) A. Ke, K. Zhou, F. Ding, J. H. Cate, J. A. Doudna, *Nature* **2004**, *429*, 201–205; d) S. R. Das, J. A. Piccirilli, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 45–52; e) Z. Y. Zhao, A. McLeod, S. Harusawa, L. Araki, M. Yamaguchi, T. Kurihara, D. M. J. Lilley, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5026–5027; f) Y. I. Kuzmin, C. P. Da Costa, J. W. Cottrell, M. J. Fedor, *J. Mol. Biol.* **2005**, *349*, 989–1010; g) J. Han, J. M. Burke, *Biochemistry* **2005**, *44*, 7864–7870; h) A. T. Perrotta, T. S. Watkins, M. D. Been, *RNA* **2006**, *12*, 1282–1291; i) T. J. Wilson, J. Ouellet, Z. Y. Zhao, S. Harusawa, L. Araki, T. Kurihara, D. M. Lilley, *RNA* **2006**, *12*, 980–987; j) M. Martick, W. G. Scott, *Cell* **2006**, *126*, 309–320; k) D. J. Klein, M. D. Been, A. R. Ferré-D'Amaré, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14858–14859; l) T. J. Wilson, A. C. McLeod, D. M. Lilley, *EMBO J.* **2007**, *26*, 2489–2500; m) A. L. Cerrone-Szakal, N. A. Siegfried, P. C. Bevilacqua, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14504–14520.
- [65] a) A. V. Sidorov, J. A. Grasby, D. M. Williams, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1591–1601; b) K. Sakhivel, C. F. Barbas III, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2998–3002; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2872–2875.
- [66] a) D. M. Perrin, T. Garestier, C. Hélène, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1556–1563; b) L. Lermer, Y. Roupioz, R. Ting, D. M.

- Perrin, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9960–9961; c) R. Ting, J. M. Thomas, L. Lermer, D. M. Perrin, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 6660–6672; d) M. Hollenstein, C. J. Hipolito, C. H. Lam, D. M. Perrin, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1638–1649; e) M. Hollenstein, C. J. Hipolito, C. H. Lam, D. M. Perrin, *Chem-BioChem* **2009**, *10*, 1988–1992.
- [67] M. Hollenstein, C. Hipolito, C. Lam, D. Dietrich, D. M. Perrin, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4418–4422; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4346–4350.
- [68] A. Roth, R. R. Breaker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6027–6031.
- [69] a) W. C. Winkler, A. Nahvi, A. Roth, J. A. Collins, R. R. Breaker, *Nature* **2004**, *428*, 281–286; b) M. J. Fedor, *Annu. Rev. Biophys.* **2009**, *38*, 271–299.
- [70] A. M. Pyle, V. T. Chu, E. Jankowsky, M. Boudvillain, *Methods Enzymol.* **2000**, *317*, 140–146.
- [71] Y. Brudno, D. R. Liu, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 265–276.
- [72] L. E. Orgel, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 109–118.
- [73] X. Li, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4956; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4848.
- [74] Z. J. Gartner, R. Grubina, C. T. Calderone, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1408–1413; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1370–1375.
- [75] T. M. Snyder, B. N. Tse, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1392–1401.
- [76] M. W. Kanan, M. M. Rozenman, K. Sakurai, T. M. Snyder, D. R. Liu, *Nature* **2004**, *431*, 545–549.
- [77] N. Momiyama, M. W. Kanan, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2230–2231.
- [78] M. M. Rozenman, M. W. Kanan, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14933–14938.
- [79] a) K. Ijiro, Y. Okahata, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 1339–1441; b) K. Tanaka, Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10679–10683.
- [80] M. M. Rozenman, D. R. Liu, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 253–256.
- [81] Z. J. Gartner, B. N. Tse, R. Grubina, J. B. Doyon, T. M. Snyder, D. R. Liu, *Science* **2004**, *305*, 1601–1605.
- [82] B. N. Tse, T. M. Snyder, Y. Shen, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15611–15626.
- [83] T. M. Snyder, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7545–7548; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7379–7382.
- [84] K. Sakurai, T. M. Snyder, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1660–1661.
- [85] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497–1500.
- [86] D. M. Rosenbaum, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13924–13925.
- [87] R. E. Kleiner, Y. Brudno, M. E. Birnbaum, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4646–4659.
- [88] J. M. Heemstra, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11347–11349.
- [89] a) Y. Brudno, M. E. Birnbaum, R. E. Kleiner, D. R. Liu, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 148–155; b) D. H. Appella, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 87–88.
- [90] a) Y. Ura, J. M. Beierle, L. J. Leman, L. E. Orgel, M. R. Ghandi, *Science* **2009**, *325*, 73–77; b) P. E. Nielsen, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 689–690.
- [91] M. Oberhuber, G. F. Joyce, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7752–7755; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7580–7583.
- [92] A. P. Silverman, E. T. Kool, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3775–3789.
- [93] J. Cai, X. Li, X. Yue, J. S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16324–16325.
- [94] R. M. Franzini, E. T. Kool, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2981–2988.
- [95] H. Abe, J. Wang, K. Furukawa, K. Oki, M. Uda, S. Tsuneda, Y. Ito, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1219–1226.
- [96] A. Shibata, H. Abe, M. Ito, Y. Kondo, S. Shimizu, K. Aikawa, Y. Ito, *Chem. Commun.* **2009**, 6586–6588.
- [97] Z. L. Pianowski, N. Winssinger, *Chem. Commun.* **2007**, 3820–3822.
- [98] J. Cai, X. Li, J. S. Taylor, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 751–754.
- [99] T. N. Grossmann, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15596–15597.
- [100] T. N. Grossmann, O. Seitz, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 6723–6730.
- [101] Y. Huang, J. M. Coull, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3238–3239.
- [102] F. E. Alemdaroglu, K. Ding, R. Berger, A. Herrmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4313–4317; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4206–4210.
- [103] M. H. Hansen, P. Blakskjaer, L. K. Petersen, T. H. Hansen, J. W. Hojfeldt, K. V. Gothelf, N. J. Hansen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1322–1327.
- [104] J. L. Czapinski, T. L. Sheppard, *Chem. Commun.* **2004**, 2468–2469.
- [105] Z. Tang, A. Marx, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7436–7439; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7297–7300.
- [106] Z. Tang, D. P. Goncalves, M. Wieland, A. Marx, J. S. Hartig, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1061–1064.
- [107] S. Brenner, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5381–5383.
- [108] a) J. Nielsen, S. Brenner, K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9812–9813; b) M. C. Needels, D. G. Jones, E. H. Tate, G. L. Heinkel, L. M. Kochersperger, W. J. Dower, R. W. Barrett, M. A. Gallop, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10700–10704.
- [109] a) N. Winssinger, J. L. Harris, B. J. Backes, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3254–3258; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3152–3155; b) N. Winssinger, S. Ficarro, P. G. Schultz, J. L. Harris, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11139–11144; c) J. Harris, D. E. Mason, J. Li, K. W. Burdick, B. J. Backes, T. Chen, A. Shipway, G. Van Heeke, L. Gough, A. Ghaemmaghami, F. Shakib, F. Debaene, N. Winssinger, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1361–1372; d) N. Winssinger, R. Damoiseaux, D. C. Tully, B. H. Geierstanger, K. Burdick, J. L. Harris, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1351–1360; e) J. L. Harris, N. Winssinger, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 6792–6801; f) H. D. Urbina, F. Debaene, B. Jost, C. Bole-Feyot, D. E. Mason, P. Kuzmic, J. L. Harris, N. Winssinger, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1790–1797; g) Z. L. Pianowski, N. Winssinger, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1330–1336; h) F. Debaene, N. Winssinger, *Methods Mol. Biol.* **2009**, *570*, 299–307.
- [110] a) D. R. Halpin, P. B. Harbury, *PLoS Biol.* **2004**, *2*, e173; b) D. R. Halpin, P. B. Harbury, *PLoS Biol.* **2004**, *2*, e174; c) D. R. Halpin, J. A. Lee, S. J. Wrenn, P. B. Harbury, *PLoS Biol.* **2004**, *2*, e175; d) S. J. Wrenn, P. B. Harbury, *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 331–349.
- [111] S. J. Wrenn, R. M. Weisinger, D. R. Halpin, P. B. Harbury, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13137–13143.
- [112] a) J. Scheuermann, C. E. Dumelin, S. Melkko, D. Neri, *J. Biotechnol.* **2006**, *126*, 568–581; b) C. E. Dumelin, J. Scheuermann, S. Melkko, D. Neri, *QSAR Comb. Sci.* **2006**, *25*, 1081–1087; c) S. Melkko, C. E. Dumelin, J. Scheuermann, D. Neri, *Drug Discovery Today* **2007**, *12*, 465–471.
- [113] M. N. Schulz, R. E. Hubbard, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2009**, *9*, 615–621.
- [114] S. Melkko, J. Scheuermann, C. E. Dumelin, D. Neri, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 568–574.
- [115] C. E. Dumelin, J. Scheuermann, S. Melkko, D. Neri, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 366–370.
- [116] C. E. Dumelin, S. Trussel, F. Buller, E. Trachsel, F. Bootz, Y. Zhang, L. Mannocci, S. C. Beck, M. Drumea-Mirancea, M. W. Seeliger, C. Baltes, T. Muggler, F. Kranz, M. Rudin, S. Melkko, J. Scheuermann, D. Neri, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3240–3245; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3196–3201.
- [117] S. Melkko, Y. Zhang, C. E. Dumelin, J. Scheuermann, D. Neri, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4755–4758; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4671–4674.

- [118] J. Scheuermann, C. E. Dumelin, S. Melkko, Y. Zhang, L. Mannocci, M. Jaggi, J. Sobek, D. Neri, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 778–785.
- [119] F. Buller, L. Mannocci, Y. Zhang, C. E. Dumelin, J. Scheuermann, D. Neri, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5926–5931.
- [120] L. Mannocci, Y. Zhang, J. Scheuermann, M. Leimbacher, G. De Bellis, E. Rizzi, C. Dumelin, S. Melkko, D. Neri, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 17670–17675.
- [121] F. Buller, Y. Zhang, J. Scheuermann, J. Schafer, P. Buhlmann, D. Neri, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1075–1086.
- [122] K. I. Sprinz, D. M. Tagore, A. D. Hamilton, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3908–3911.
- [123] a) D. M. Tagore, K. I. Sprinz, S. Fletcher, J. Jayawickramarajah, A. D. Hamilton, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 227–229; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 223–225; b) J. Cai, B. A. Rosenzweig, A. D. Hamilton, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 328–332.
- [124] B. A. Rosenzweig, N. T. Ross, D. M. Tagore, J. Jayawickramarajah, I. Saraogi, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5020–5021.
- [125] M. A. Clark, R. A. Acharya, C. C. Arico-Muendel, S. L. Belyanskaya, D. R. Benjamin, N. R. Carlson, P. A. Centrella, C. H. Chiu, S. P. Creaser, J. W. Cuozzo, C. P. Davie, Y. Ding, G. J. Franklin, K. D. Franzen, M. L. Gefter, S. P. Hale, N. J. Hansen, D. I. Israel, J. Jiang, M. J. Kavarana, M. S. Kelley, C. S. Kollmann, F. Li, K. Lind, S. Mataruse, P. F. Medeiros, J. A. Messer, P. Myers, H. O'Keefe, M. C. Oliff, C. E. Rise, A. L. Satz, S. R. Skinner, J. L. Svendsen, L. Tang, K. van Vloten, R. W. Wagner, G. Yao, B. Zhao, B. A. Morgan, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 647–654.
- [126] a) M. E. Wilson, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 306–307; b) M. T. Reetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5716–5722; c) A. Mahammed, Z. Gross, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2883–2887; d) T. Ueno, T. Koshiyama, M. Ohashi, K. Kondo, M. Kono, A. Suzuki, T. Yamane, Y. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6556–6562; e) J. Pierron, C. Malan, M. Creus, J. Grdinaru, I. Hafner, A. Ivanova, A. Sardo, T. R. Ward, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 713–717; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 701–705; f) D. Coquière, J. Bos, J. Beld, G. Roelfes, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5261–5264; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5159–5162; g) Y. Lu, N. Yeung, N. Sieracki, N. M. Marshall, *Nature* **2009**, *460*, 855–862.
- [127] G. Roelfes, *Mol. BioSyst.* **2007**, *3*, 126–135.
- [128] X. Liu, H. Diao, N. Nishi, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 2745–2757.
- [129] G. Roelfes, B. L. Feringa, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3294–3296; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3230–3232.
- [130] G. Roelfes, A. J. Boersma, B. L. Feringa, *Chem. Commun.* **2006**, 635–637.
- [131] A. J. Boersma, B. L. Feringa, G. Roelfes, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3647–3650.
- [132] N. Sancho Oltra, G. Roelfes, *Chem. Commun.* **2008**, 6039–6041.
- [133] N. Shibata, H. Yasui, S. Nakamura, T. Toru, *Synlett* **2007**, 1153–1157.
- [134] D. Coquière, B. L. Feringa, G. Roelfes, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9468–9471; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9308–9311.
- [135] A. J. Boersma, B. L. Feringa, G. Roelfes, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3396–3398; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3346–3348.
- [136] J. Brunner, A. Mokhir, R. Kraemer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12410–12411.
- [137] A. J. Boersma, J. E. Klijn, B. L. Feringa, G. Roelfes, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11783–11790.
- [138] F. Rosati, A. J. Boersma, J. E. Klijn, A. Meetsma, B. L. Feringa, G. Roelfes, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9596–9605.
- [139] X. Li, D. R. Liu, J. Am. Chem. Soc. **2003**, *125*, 10188–10189.
- [140] L. Ropartz, N. J. Meeuwenoord, G. A. van der Marel, P. W. van Leeuwen, A. M. Slawin, P. C. Kamer, *Chem. Commun.* **2007**, 1556–1558.
- [141] M. Caprioara, R. Fiammengo, M. Engeser, A. Jäschke, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 2089–2095.
- [142] P. Fournier, R. Fiammengo, A. Jäschke, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4490–4493; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4426–4429.
- [143] U. Jakobsen, K. Rohr, S. Vogel, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 1419–1422.