

Kombinatorische Mutationsinterferenz-Analyse zur Untersuchung funktioneller Nucleotide in Desoxyribozymen**

Falk Wachowius, Fatemeh Javadi-Zarnaghi und Claudia Höbartner*

Desoxyribozyme, die auch als DNA-Katalysatoren oder DNA-Enzyme bezeichnet werden, sind synthetische, einzelsträngige DNA-Moleküle, die chemische Umwandlungen mit hoher Selektivität katalysieren. Seit dem ersten Bericht über eine DNA-katalysierte Spaltung von RNA-Phosphodiesterbindungen^[1] wurde eine Vielzahl von Desoxyribozymen für unterschiedlichste Reaktionen mittels In-vitro-Selektion identifiziert.^[2] Die praktischen Anwendungen von DNA-Enzymen reichen von der Verwendung als Analyse- und Synthesewerkzeuge bis zur Entwicklung von molekularen Schaltelementen und therapeutischen Wirkstoffen.^[3] Die DNA-katalysierte Ligation von RNA ist eine attraktive Alternative zur RNA-Ligation mit Protein-Enzymen.^[4] Eine wichtige Anwendung von Desoxyribozymen ist die Synthese von 2',5'-verzweigter RNA, bei der eine spezifische interne 2'-Hydroxygruppe eines RNA-Substrats (L-RNA) aktiviert wird und als Nucleophil an einem 5'-Triphosphatrest eines zweiten RNA-Substrats (R-RNA) angreift. Das erste Beispiel aus dieser Klasse der RNA-Ligasen ist das 7S11-Desoxyribozym^[5] (Abbildung 1a). Es ermöglicht den Zugang zur 2',5'-verzweigten Untereinheit von Lariat-RNA, einem wichtigen Intermediat des RNA-Spleißens,^[6] das auf anderen Wegen schwer herstellbar ist.^[7] Desoxyribozyme können aber auch zur linearen Ligation zweier RNA-Fragmente eingesetzt werden. Das 9DB1-Desoxyribozym^[8] (Abbildung 1b) katalysiert die Bildung einer nativen 3'-5'-Phosphodiesterbindung zwischen zwei RNA-Substraten, indem die 3'-OH-Gruppe der L-RNA als Nucleophil mit dem 5'-Triphosphatrest der R-RNA reagiert.

Der detaillierte chemische Mechanismus der DNA-katalysierten RNA-Ligation ist noch nicht bekannt. Desoxyribozyme binden ihre RNA-Substrate über Watson-Crick-Basenpaarung, wobei die Bindungsarme über einen oder mehrere einzelsträngige Abschnitte verbunden sind (Abbildung 1). Diese zentralen Bereiche bilden das aktive Zentrum für die Katalyse. Für die einzelsträngigen Bereiche A und B von 7S11 sind erste Informationen über funktionelle Nucleotide aus Mutationsexperimenten bekannt.^[5b] Die katalyti-

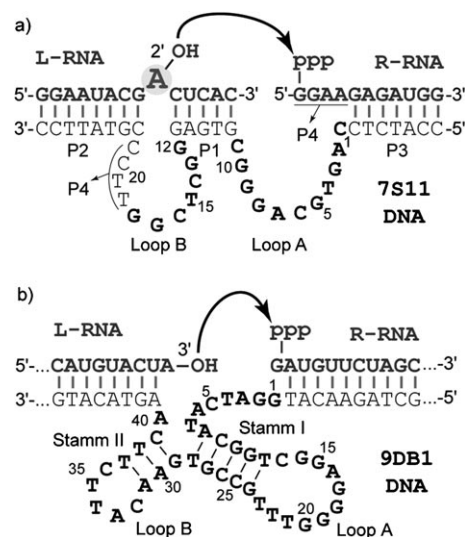


Abbildung 1. DNA-katalysierte RNA-Ligation. a) 7S11 ermöglicht die Synthese von 2',5'-verzweigter RNA.^[5] b) 9DB1 verknüpft zwei RNA-Substrate über eine lineare 3'-5'-Phosphodiesterbindung.^[8] Die Sekundärstrukturvorhersage (mfold^[11]) schlägt zwei Stamm-Loop-Domänen für 9DB1 vor. Beide Desoxyribozyme benötigen Mg^{2+} als Metallionen-Cofaktor.

sche Sequenz von 9DB1 wurde jedoch noch nicht näher untersucht.

Für das Verständnis des Mechanismus der Katalyse durch DNA-Enzyme ist es notwendig, die funktionellen Nucleotide zu identifizieren, die zur Katalyse beitragen. Eine detaillierte Untersuchung der DNA-Sequenz kann darüber hinaus wichtige Beiträge zur praktischen Weiterentwicklung von DNA-Katalysatoren liefern. Da die dreidimensionale Struktur eines DNA-Enzyms in der aktiven Konformation unbekannt ist,^[9] kommt der Identifizierung der für die Aktivität erforderlichen funktionellen Gruppen fundamentale Bedeutung zu. Traditionelle Charakterisierungsmethoden basieren auf der systematischen Deletion und Substitution individueller Nucleotide und der sorgfältigen Analyse der Ligation-kinetik vieler separater Desoxyribozym-Mutanten.^[10] Innovative Alternativen zu diesen zeit- und arbeitsintensiven Methoden sollten möglichst schnell vollständige und verlässliche Datensätze liefern, welche die Beiträge individueller Nucleotide zur katalytischen Aktivität offenlegen. Die Ergebnisse solcher umfangreichen Mutationsanalysen sollten neue Einblicke in die molekularen Details DNA-katalysierter Reaktionen ermöglichen.

In dieser Arbeit berichten wir über einen kombinatorischen Ansatz zur Mutationsinterferenz-Analyse, der als ge-

[*] F. Wachowius, F. Javadi-Zarnaghi, Dr. C. Höbartner
Arbeitsgruppe Nucleinsäurechemie
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)
Fax: (+49) 551-201-1680
E-Mail: claudia.hoebartner@mpibpc.mpg.de

[**] Wir danken der Max-Planck-Gesellschaft für die finanzielle Unterstützung und Prof. S. K. Silverman, Prof. R. Micura und Prof. P. I. Pradeepkumar für hilfreiche Diskussionen und Kommentare.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201003940> zu finden.

nerelle Methode für die Charakterisierung funktioneller einzelsträngiger DNA eingesetzt werden kann und sich besonders für die Identifizierung essenzieller Nucleotide in DNA-Enzymen eignet. Die kombinatorische Mutationsinterferenz-Analyse, die wir CoMA nennen, erlaubt die gleichzeitige Beurteilung der katalytischen Aktivität aller möglichen Punktmutanten eines Desoxyribozyms (z.B. 120 Mutanten für ein Desoxyribozym mit einer 40 Nucleotide langen katalytischen Region). Hierfür werden die Desoxyribozym-Mutanten über Festphasensynthese in vier kombinatorischen Bibliotheken hergestellt. Für die Kodierung der Nucleobasenmutation in der Bibliothek werden die 2'-OH-Gruppen von Ribonucleotiden als chemische Markierung verwendet. Jede Bibliothek besitzt daher eines der vier Standard-Ribonucleotide statistisch verteilt im katalytischen Bereich. Der CoMA-Arbeitsablauf besteht aus vier Schritten (Abbildung 2): A) Festphasensynthese der vier 2'-OH-kodierten kombinatorischen Mutationsbibliotheken, B) Trennung aktiver und inaktiver Individuen der Bibliothek,

C) spezifische Spaltung des Rückgrats an mutierten Stellen durch alkalische Hydrolyse und D) Analyse des Interferenzmusters durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).

Für die Festphasensynthese in Schritt A wurden gewöhnliche DNA-Synthesebedingungen verwendet, mit der Ausnahme, dass Mischungen von Phosphoramidtlösungen eingesetzt wurden (Abbildung 2 A). Die vier 2'-O-TOM-geschützten (TOM = 2'-O-Triisopropylsilyloxymethyl) Ribonucleotidphosphoramidite (rN) wurden einzeln mit jedem der vier Desoxyribonucleotidphosphoramidite (dN) in einem Verhältnis gemischt, das im Idealfall zu durchschnittlich einer Ribonucleotid-Mutation pro DNA-Molekül führt. Die Effizienz des rN-Einbaus wurde für alle 16 rN/dN-Kombinationen anhand der Synthese und Analyse kurzer pentamerer Oligonucleotide untersucht. Der Anteil an rN-haltigem Pentamer wurde mittels Anionenaustauscher-HPLC analysiert, basierend auf der Trennung von originalem und mutiertem (d.h. 2'-O-TOM-rN-haltigem) Pentamer. Der experimentell

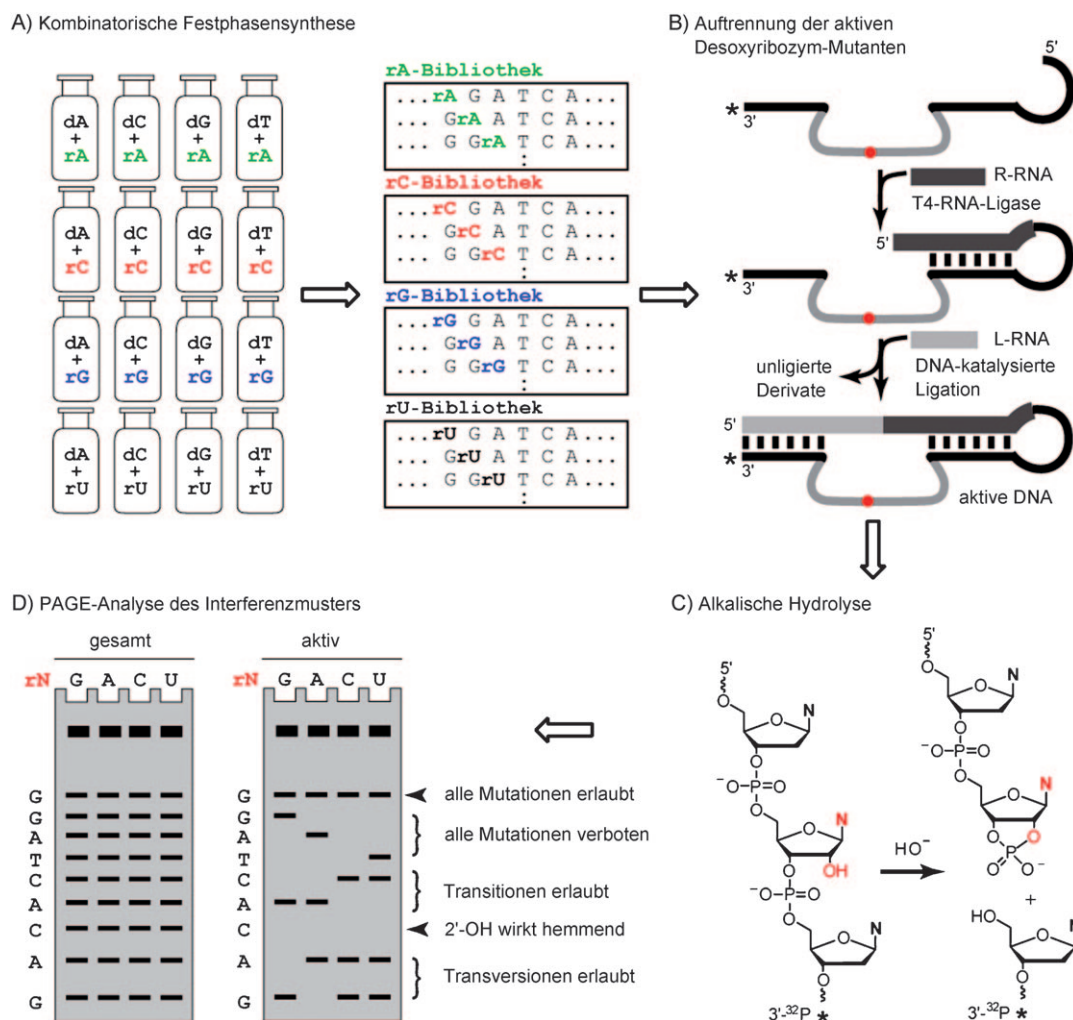


Abbildung 2. Die vier Schritte A–D der CoMA. A) Mischungen von DNA- und RNA-Phosphoramiditen werden zur Festphasensynthese der Mutationsbibliotheken eingesetzt. B) Trennung aktiver und inaktiver Derivate. C) Die 2'-OH-Gruppe erlaubt die spezifische Spaltung des DNA-Rückgrats an mutierten Positionen. D) PAGE zur Analyse der Mutationseffekte. Transitionen sind $\text{G} \leftrightarrow \text{A}$, $\text{C} \leftrightarrow \text{U}$, Transversionen sind $\text{G} \leftrightarrow \text{U}$, $\text{A} \leftrightarrow \text{C}$ und $\text{G} \leftrightarrow \text{C}$, $\text{A} \leftrightarrow \text{U}$.

bestimmte rN-Gehalt lag im Bereich von 40–70% des rN-Anteils im Phosphoramiditmisch.^[12]

Im Schritt B wurden die Desoxyribozym-Mutanten in aktive und inaktive RNA-Ligasen getrennt. Dies erfolgte über die DNA-katalysierte RNA-Ligation im bimolekularen Format. Dabei wurde das R-RNA-Substrat kovalent an die 3'-³²P-markierte DNA-Bibliothek geknüpft, und die aktiven DNA-RNA-Konjugate wurden an die L-RNA ligiert. Die aktive und die inaktive DNA-Fraktion wurden über denaturierende PAGE getrennt und isoliert (Abbildung 2B). In Schritt C wurden die gesamte (nicht getrennte) Bibliothek sowie die aktiven und inaktiven Fraktionen separat unter alkalischen Bedingungen hydrolysiert (Abbildung 2C). Im Schritt D wurden die Spaltprodukte auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und das Interferenzmuster analysiert.

Die An- oder Abwesenheit von Hydrolysebanden in den verschiedenen Gel-Spuren lässt Rückschlüsse auf die Effekte der Mutationen zu (siehe schematische Darstellung in Abbildung 2D). Für eine bestimmte Nucleotidposition gibt die Anwesenheit der Hydrolyseprodukte in allen vier Bibliotheken an, dass alle Mutationen an diesen Positionen toleriert sind und die 2'-OH-Gruppe keinen negativen Einfluss auf die Katalyse ausübt. Im Gegensatz dazu zeigt die Abwesenheit von Hydrolyseprodukten in allen vier Bibliotheken, dass die 2'-OH-Gruppe an dieser Position nicht toleriert wird, was auf eine konformativ empfindliche Riboseeinheit hindeutet. In diesem Fall kann der Einfluss von Nucleobasenmutationen nicht bestimmt werden. Die Anwesenheit von Hydrolysebanden für eine bestimmte Position nur in der Stammbibliothek (d.h. Abwesenheit von Banden in den drei anderen Mutationsbibliotheken) zeigt an, dass jede Mutation zu einer der drei anderen Standardnucleobasen die katalytische Aktivität unterdrückt. An Positionen, an denen Transitionen und/oder Transversionen erlaubt sind, erscheinen Hydrolyseprodukte in mehr als einer Bibliothek. Numerische Werte für die Interferenzeffekte der Mutationen wurden durch quantitative Analyse der Bandenintensität erhalten (siehe unten).

Für die Entwicklung des CoMA-Konzepts untersuchten wir zuerst die katalytischen Bereiche des 7S11-Desoxyribozyms. Um herauszufinden, ob einzelne Ribonucleotide (d.h. die Anwesenheit von 2'-OH-Gruppen) die DNA-katalysierte RNA-Ligation verhindern, synthetisierten wir eine 7S11-Bibliothek, in der die neun 2'-Desoxyguanosinreste in den Loops A und B von 7S11 statistisch durch das entsprechende Guanosinribonucleotid ersetzt wurden. Die rG-haltige 7S11-Bibliothek wurde mittels T4-RNA-Ligase an die R-RNA geknüpft, und die Ligationsprodukte wurden am 3'-Ende radioaktiv markiert. Die 7S11-katalysierte Reaktion wurde in Gegenwart von 40 mM MgCl₂ durchgeführt, und die ligierten und unligierten Fraktionen wurden durch denaturierende PAGE getrennt. Beide Fraktionen wurden isoliert und jeweils mit 10 mM NaOH bei 95 °C 10 min hydrolysiert. Die erhaltenen Spaltprodukte wurden anschließend auf einem Sequenzier-Gel getrennt. Das Hydrolysemuster zeigte in beiden Fraktionen die erwarteten neun Banden. Das bedeutet, dass die katalytische Aktivität von 7S11 durch einzelne Guanosinribonucleotide nicht inhibiert wird.^[12] Ähnliche Resultate

wurden für die Bibliotheken mit rC-, rA- und rU-Nucleotiden an den ursprünglichen dC-, dA- bzw. dT-Positionen erhalten.^[12]

Aufbauend auf diesen Resultaten wurden vier vollständige 7S11-Mutationsbibliotheken synthetisiert, mit dem Ziel, eine vollständige Analyse der Interferenzeffekte an allen Nucleotidpositionen durchzuführen. Die Loops A und B (inklusive P4, siehe Abbildung 1a) wurden mit rN/dN-Mischungen synthetisiert, während die RNA-Bindungsarme P1–P3 mit gewöhnlichen DNA-Phosphoramiditen synthetisiert wurden. Die Hydrolysemuster der vier aktiven 7S11-Fraktionen und der nicht getrennten Bibliotheken sind in Abbildung 3 gezeigt.^[13] Die Intensität der einzelnen Banden wurde

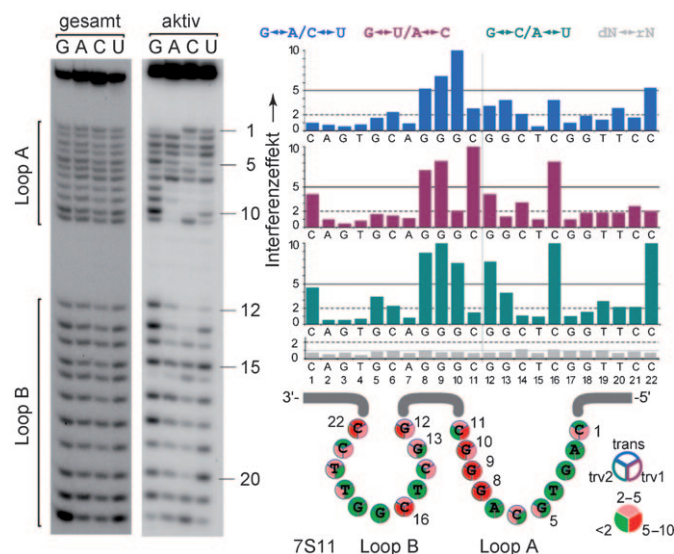


Abbildung 3. CoMA von 7S11. Die Gele zeigen die Hydrolysemuster der nicht separierten Bibliothek sowie der aktiven Fraktionen der 7S11-Mutanten. Die DNA ist am 3'-Ende ³²P-markiert; daher verläuft die Nummerierung vom 5'- zum 3'-Ende von oben nach unten. Die Interferenzwerte sind als Balkendiagramme für die Loops A und B (inklusive P4 als Teil von Loop B) angegeben. Die Darstellung der katalytischen DNA-Sequenz als farbige Dreiteilung fasst starke (rot), schwache (rosa) und vernachlässigbare Interferenzeffekte (grün) zusammen. Die Werte für Transitionen (trans) befinden sich im oberen Drittel, die für Transversionen 1 (trv1) im rechten und die für Transversionen 2 (trv2) im linken Drittel.

quantifiziert, und die Interferenzwerte wurden für jede Position aus dem Verhältnis der Bandenintensität in der nicht getrennten Bibliothek zu der in der aktiven Fraktion berechnet.^[12] Das führte zu einem Interferenzwert von 1, wenn die Modifikation (Nucleobasenmutation und 2'-OH-Gruppe zusammen) keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität hatte. Werte > 1 zeigten Positionen, an denen die Mutationen die Aktivität inhibieren, während Werte < 1 Positionen anzeigen würden, an denen die Mutationen die katalytische Aktivität verstärken (dieser Effekt wurde aber nicht beobachtet). Die Mutationen wurden in Transitionen (G↔A, C↔U; blau), Transversionen 1 (G↔U, A↔C; magenta) und Transversionen 2 (G↔C, A↔U; türkis) unterteilt, und die Interferenzwerte wurden als Balkendiagramme dargestellt.

Interferenzwerte zwischen 0.5 und 2 wurden als insignifikant betrachtet und grün gekennzeichnet (siehe Abbildung 3 unten rechts). Mittelgroße Interferenzwerte zwischen 2 und 5 wurden durch eine rosa Markierung gezeichnet, und Interferenzwerte >5 wurden rot hervorgehoben. Für die 2'-OH-Gruppen in den 7S11-Bibliotheken wurde kein Interferenz-effekt gefunden.

Die Analyse der CoMA-Daten ergab, dass jeder der drei Guanosinreste G8, G9 und G10 in Loop A nicht gegen eines der anderen Nucleotide ausgetauscht werden kann, ohne dass die katalytische Aktivität sehr stark beeinträchtigt wird. Die Interferenzwerte an diesen Positionen sind >5 , außer für G10U, für das der Wert 2.1 beträgt. Dieser kleine Effekt für die G10U-Mutation könnte bedeuten, dass die O6/N1-Lactam-Gruppe an der Position G10 zur Katalyse beiträgt und dass diese Funktion partiell durch O4/N3 von Uridin übernommen werden kann. Die sehr starken Effekte an den anderen beiden Guanosinpositionen führen hingegen zu der Interpretation, dass mehr als eine funktionelle Gruppe dieser Nucleobasen für die katalytische Aktivität verantwortlich ist. Ein starker Interferenzeffekt in Loop A wurde auch für die C11A-Mutation gefunden. Mittelstarke Effekte wurden für den Ersatz von C1 durch Purinbasen sowie für die C5G- und C11U-Mutationen erhalten. An Position 6 wurde die Mutation C6A gut toleriert, während durch die Mutation von C6 zu U oder G die Aktivität vermindert wurde. Dies könnte auf eine funktionelle Bedeutung der exocyclischen N4-Aminogruppe hindeuten, deren Funktion partiell von der N6-Aminogruppe von Adenosin übernommen werden kann. In Loop B sind die Nucleotide G12, C16 und C22 unempfindlich gegenüber Veränderungen. Mutationen an den Positionen G13 und C14 zeigten mittlere oder kleine Effekte, und an den Positionen T14, G17 und G18 wurden alle Substitutionsmutationen toleriert. Interessanterweise haben einzelne Nucleotidmutationen an den Positionen 19–21, die an der Basenpaarung mit dem R-RNA-Substrat beteiligt sind, auch einen eher geringen Einfluss auf die Aktivität. Das zeigt, dass einzelne Fehlpaarungen in der P4-Region mit Ausnahme der ersten Position toleriert werden können. Für einzelne Mutanten wurden die 7S11-CoMA-Ergebnisse durch Analyse der Ligationskinetik bestätigt (durch früher beschriebene Analysen^[5b] und unsere Daten^[12]). Diese Experimente zeigen, dass CoMA eine kompakte und verlässliche Analysenmethode zur Identifizierung katalytisch aktiver Nucleotide von 7S11 ist.^[14]

Anschließend verwendeten wir CoMA, um den 40 Nucleotide langen katalytischen Bereich des 9DB1-Desoxyribozyms zu untersuchen, das die lineare Ligation zweier RNA-Substrate katalysiert. Für dieses DNA-Enzym sind noch keine Mutationsdaten bekannt. Gemäß dem CoMA-Arbeitsablauf in Abbildung 2 wurden vier 9DB1-Mutationsbibliotheken mit jeweils 40 aufeinanderfolgenden Kopplungen der entsprechenden rN/dN-Phosphoramiditmischungen synthetisiert. Nach der Trennung aktiver und inaktiver DNA-Mutanten wurden die RNA-DNA-Hybride hydrolysiert und die Interferenzmuster analysiert. Die Hydrolysespuren der aktiven DNA-Fractionen, die Interferenzwerte und eine schematische Darstellung der Ergebnisse finden sich in Abbildung 4.^[13] Die 2'-OH-Gruppe wurde an fast allen 40 Positionen toleriert; nur an drei Stellen war der OH-Interfe-

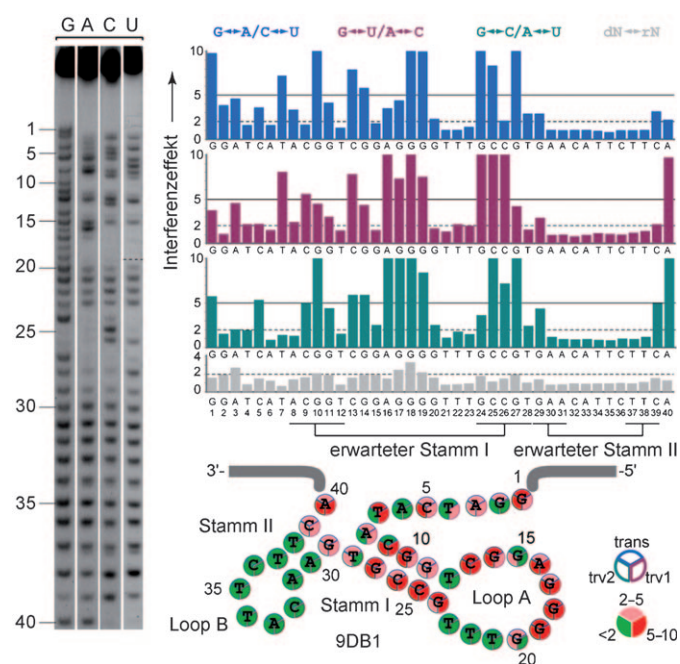


Abbildung 4. CoMA von 9DB1. Die Gelspuren zeigen die Hydrolyse-muster der aktiven 9DB1-Fractionen. Das vollständige Gel ist in den Hintergrundinformationen abgebildet. Die Darstellung der Interferenz-werte und die zusammenfassende Sekundärstrukturdarstellung sind analog zu den Darstellungen in Abbildung 3.

renzwert etwas größer als 2. Interessanterweise waren die drei aufeinanderfolgenden Guanosinreste G17–G19 in Loop A für die katalytische Aktivität essenziell, analog zu den funktionellen Guanosinresten G8–G10 in Loop A von 7S11. Darüber hinaus reagierten auch die Positionen C13, G14 und A16 sehr stark auf Veränderungen der Nucleobase. Die Nucleotide G15 und G20 zeigten kleine Interferenzeffekte, und T21–T23 konnten durch jedes andere Nucleotid ersetzt werden (grüne Positionen). Ein weiteres interessantes Ergebnis war die Häufung von grünen Positionen, d.h. von Interferenzwerten <2 , in Stamm II und Loop B. Dieses Ergebnis bedeutet, dass alle Mutationen zwischen den Positionen 30 und 38 erlaubt sind. Daraus ließ sich folgern, dass diese Stamm-Schleifenstruktur für die katalytische Aktivität nicht essenziell ist. Im Gegensatz dazu wurden in Stamm I große Interferenzeffekte für fast alle Positionen gefunden, was darauf hindeutet, dass Fehlpaarungen nicht toleriert werden. Das vorhergesagte Wobble-Basenpaar T12:G24 liegt vermutlich nicht vor, weil T12 durch jedes andere Nucleotid ersetzt werden kann, G24 jedoch essenziell ist. Auch einige Nucleotide im einzelsträngigen Abschnitt auf der 5'-Seite des Stamms konnten nicht mutiert werden, ohne die Ligationsaktivität negativ zu beeinflussen. Insbesondere G1, A3, C5 und T7 scheinen an der Bildung der aktiven Konformation beteiligt zu sein oder an der Katalyse teilzunehmen.

Um die 9DB1-CoMA-Daten zu validieren, synthetisierten wir einige definierte 9DB1-Mutanten und analysierten die Kinetik der DNA-katalysierten RNA-Ligation im trimolekularen Format (d.h., die R-RNA ist nicht kovalent an 9DB1 gebunden). Wie aus den Interferenzdaten erwartet, konnten Stamm II und Loop B entfernt werden, ohne die Ligations-

geschwindigkeit substanziell zu reduzieren (Abbildung 5). Mutationen, die in den Bibliotheken große Interferenzwerte zeigten, erwiesen sich auch als Einzelmутanten inaktiv. Als Beispiele seien die G18A- und G24A-Derivate erwähnt, die etwa 800- bzw. 1600-fach langsamer sind als das verkürzte

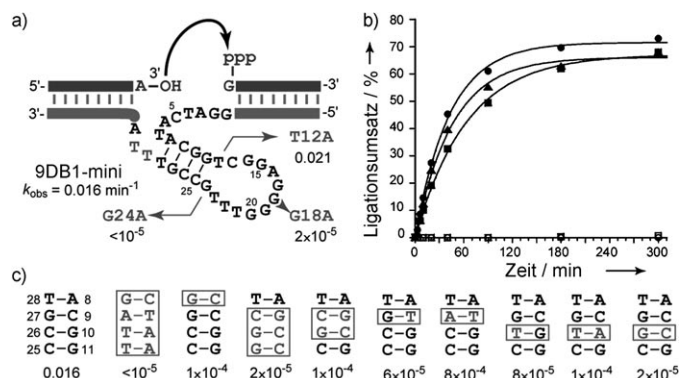


Abbildung 5. Analyse der Ligationsaktivität ausgewählter 9DB1-Desoxyribozym-Mutanten. a) Auf der Grundlage der CoMA-Ergebnisse minimiertes 9DB1-Desoxyribozym. Ausgewählte Mutationen und zugehörige k_{obs} -Werte sind angegeben. b) Ligationskinetik für ursprüngliches 9DB1 (●, $k_{\text{obs}} = 0.023 \text{ min}^{-1}$), minimiertes 9DB1 (■) und die Loop-Mutanten T12A (▲), G18A (□) und G24A (○). c) Auswahl untersuchter 9DB1-Stamm-Mutanten. Ursprüngliche Stammbasenpaare sind in schwarzer Schrift, Mutationen in grauer Schrift dargestellt. k_{obs} -Werte (in min^{-1}) sind unter den Stammbasenpaaren angegeben.

9DB1-DNA-Enzyms (9DB1-mini, Abbildung 5). Kompensatorische Mutationen in Stamm I, die die Stammlänge und die Basenpaarungsstärke beeinflussten, bewirkten ebenfalls eine verminderte Ligationsaktivität. Zum Beispiel führte die Stabilisierung des Stamms durch Änderung des A8:T28-Basenpaares zu C8:G28 zu einer 150-fach langsameren Reaktion. Der Austausch einzelner Basenpaare im Stamm führte zu 20- bis 800-fach langsameren Ligationen (Abbildung 5 und Hintergrundinformationen). Aus diesen Ergebnissen schließen wir, dass die Orientierung der Doppelhelix und eine exakte räumliche Anordnung der H-Brücken-Donor- und -Akzeptorgruppen für katalytische Interaktionen mit anderen Nucleotiden oder Metallionen unerlässlich sind.

Die kinetischen Analysen bestätigten, dass CoMA zur Identifikation funktioneller Nucleotide im aktiven Zentrum von DNA-Enzymen geeignet ist. Für beide untersuchten Desoxyribozyme wurden drei aufeinanderfolgende Guanosinnucleotide gefunden, die für die DNA-katalysierte RNA-Ligation einer Ribose-Hydroxygruppe an eine 5'-Triphosphatgruppe essenziell sind. Der Vergleich mit anderen bekannten Desoxyribozymen, die die Synthese 2',5'-verzweigter Nucleinsäuren ermöglichen,^[15] legt die Vermutung nahe, dass zumindest zwei aufeinanderfolgende Guanosinreste für die DNA-katalysierte RNA-Ligation einer 2'- oder 3'-Hydroxygruppe an eine 5'-Triphosphatgruppe benötigt werden. Aufgrund der Resultate für 7S11 und 9DB1 könnte diese Voraussetzung sogar unabhängig davon sein, ob das Ligationsprodukt verzweigt oder linear ist. Natürlich sind weitere genauere Untersuchungen notwendig, um die Interaktionspartner der funktionellen Nucleotide im aktiven Zentrum zu

identifizieren und ein mechanistisches Grundgerüst für die DNA-katalysierte RNA-Ligation vorzuschlagen.

In dieser Studie haben wir gezeigt, dass die kombinatorische Mutationsinterferenz-Analyse (CoMA) eine sehr effiziente Methode ist, um katalytisch essenzielle Nucleotide in Desoxyribozymen zu identifizieren. Darüber hinaus geben die CoMA-Ergebnisse Auskunft über nichtessenzielle Nucleotide und erleichtern so die rationale Verkleinerung der katalytischen Einheit. Die Möglichkeit, durch alkalische Hydrolyse speziell nur die 2'-OH-markierten Rückgratpositionen zu spalten, erlaubt die Identifizierung mutationsempfindlicher Positionen. Es zeigte sich, dass der Ersatz von Desoxyribose- durch Ribosereste an den meisten Stellen der katalytischen Bereiche der untersuchten RNA ligierenden Desoxyribozyme erlaubt ist. Die Festphasensynthese von vier Mutationsbibliotheken ermöglichte die gleichzeitige Beurteilung aller möglichen Mutanten, ohne dass gezielt Positionen für die Untersuchung ausgewählt werden mussten. Für lange funktionelle Nucleotidregionen, wie sie für DNA-Enzyme und -Aptamere charakteristisch sind, ist das ein besonders wichtiger praktischer Vorteil. Das kann durch Verwendung templatabhängiger Polymerase-Enzyme nicht erreicht werden, da diese nur Watson-Crick-komplementäre Nucleotide einbauen können. Die Verwendung der 2'-OH-Gruppe als chemische Sonde wird künftig auch die Analyse individueller funktioneller Gruppen an den essenziellen Nucleotiden ermöglichen. Diese Anwendung ist konzeptionell verwandt mit der für die Untersuchung von Ribozym-Mechanismen entwickelten Nucleotidanalogsinterferenz-Analyse (NAIM),^[16] welche auf dem enzymatischen Einbau von modifizierten Phosphorothioat-Nucleotidanaloga mittels In-vitro-Transkription basiert.^[17] Im Gegensatz dazu nutzt unser Ansatz den Einbau von modifizierten Ribonucleotiden mittels Festphasensynthese. Umfangreiche Mutationsdaten und Modifikationsanalysen werden somit detaillierte mechanistische Studien der DNA-Katalyse ermöglichen und zudem das rationale Design kleiner funktioneller Einheiten für komplexe DNA-Architekturen erleichtern.

Eingegangen am 29. Juni 2010

Online veröffentlicht am 24. September 2010

Stichwörter: Desoxyribozyme · Festphasensynthese · Katalytische DNA · Mutationsanalyse · RNA-Ligation

[1] R. R. Breaker, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 223.

[2] a) G. M. Emilsson, R. R. Breaker, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 596; b) A. Jäschke, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 321; c) A. Peracchi, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1316; d) C. Höbartner, S. K. Silverman, *Biopolymers* **2007**, *87*, 279; e) K. Schlosser, Y. Li, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 311.

[3] a) S. K. Silverman, *Chem. Commun.* **2008**, 3467; b) Y. Lu, J. W. Liu, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, *17*, 580; c) D. A. Baum, S. K. Silverman, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 2156; d) I. Willner, B. Shlyahovsky, M. Zayats, B. Willner, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1153; e) K. Schlosser, Y. Li, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 866.

[4] a) S. K. Silverman, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1521; b) S. K. Silverman, D. A. Baum, *Methods Enzymol.* **2009**, *469*, 95.

- [5] a) R. L. Coppins, S. K. Silverman, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 270; b) R. L. Coppins, S. K. Silverman, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2900.
- [6] R. A. Padgett, M. M. Konarska, P. J. Grabowski, S. F. Hardy, P. A. Sharp, *Science* **1984**, *225*, 898.
- [7] a) C. B. Reese, Q. Song, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 2672; b) D. Mitra, M. J. Damha, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9491.
- [8] W. E. Purtha, R. L. Coppins, M. K. Smalley, S. K. Silverman, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13124.
- [9] J. Nowakowski, P. J. Shim, G. S. Prasad, C. D. Stout, G. F. Joyce, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 151.
- [10] M. Zuker, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3406.
- [11] a) A. Peracchi, M. Bonaccio, M. Clerici, *J. Mol. Biol.* **2005**, *352*, 783; b) Z. Zaborowska, J. P. Furste, V. A. Erdmann, J. Kurreck, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 40617; c) Z. Zaborowska, S. Schubert, J. Kurreck, V. A. Erdmann, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 554.
- [12] Details sind in den Hintergrundinformationen enthalten.
- [13] Das vollständige Gelbild mit hydrolysierten nicht separierten und inaktiven Fraktionen sowie nicht hydrolysierten Kontrollspuren ist in den Hintergrundinformationen gezeigt.
- [14] CoMA verwendet die vier gewöhnlichen RNA-Nucleotide, inklusive rU. Wir haben keine Interferenzeffekte für rU an ursprünglichen dT-Positionen detektiert. Falls rU-Interferenz beobachtet wird, muss der Effekt der 2'-OH-Gruppe von dem der fehlenden 5-Methylgruppe unterschieden werden. Das kann durch die Verwendung von rT anstelle von rU zur Bibliotheks-synthese erreicht werden.
- [15] a) E. Zelin, Y. Wang, S. K. Silverman, *Biochemistry* **2006**, *45*, 2767; b) E. Zelin, S. K. Silverman, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1907; c) T. P. Mui, S. K. Silverman, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4417.
- [16] S. A. Strobel, K. Shetty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 2903.
- [17] J. C. Cochrane, S. A. Strobel, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2004**, Unit 6.9.