

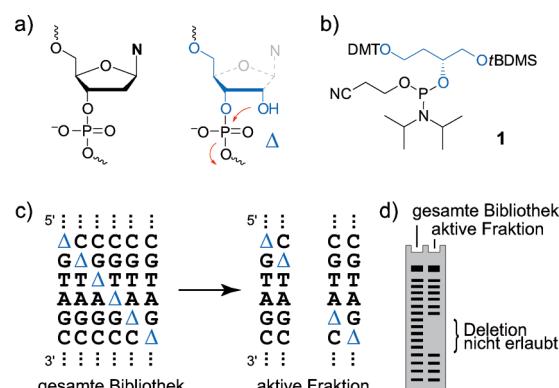
# Mutationsanalyse funktionaler DNA durch statistische Nucleosiddelletion\*\*

Biswajit Samanta und Claudia Höbartner\*

Desoxyribozyme und Aptamere sind künstliche funktionale DNAs, die in zahlreichen Forschungsgebieten, von der Biochemie und Nanotechnologie bis zur experimentellen Medizin, zunehmend Anwendung finden.<sup>[1]</sup> Funktionale einzelsträngige DNA-Moleküle werden durch In-vitro-Selektion aus DNA-Zufallsbibliotheken isoliert.<sup>[2]</sup> Die Länge der randomisierten DNA-Sequenz wird willkürlich gewählt und erstreckt sich über einen Bereich von 20 bis mehr als 200 Nukleotiden (Nt). DNA-Sequenzen mit den gewünschten Aktivitäten werden anfangs in Bibliotheken mit langen zufälligen Sequenzabschnitten gefunden, doch für praktische Anwendungen werden meist kurze Sequenzen bevorzugt. Wenn berichtete Sequenzen nicht durch partielle Randomisierung und erneute Selektion optimiert wurden, und daher nur wenig Sequenzdaten vorhanden sind, sind bioinformatische Verfahren häufig nur von eingeschränktem Nutzen zur verlässlichen Identifizierung funktioneller Motive, da Sequenzvergleiche und Strukturvorhersagen typischerweise große Datenmengen benötigen. Fortschritte auf diesem Gebiet sind insbesondere durch den vermehrten Einsatz neuer Sequenziertechniken zu erwarten.<sup>[3]</sup> Für die Untersuchung bekannter funktioneller Nucleinsäuren gibt es bisher jedoch keine experimentell einfache, schnelle und verlässliche Methode, die die Längen-Minimierung und Charakterisierung aktiver Sequenzen ermöglicht.

Hier stellen wir ein neues Mutagenese-Verfahren vor: das kombinatorische Nucleosid-Deletions-Scanning (NDS). Das Verfahren erlaubt es, unter Verwendung einer einzigen synthetischen DNA-Bibliothek, essentielle von nicht-essentiellen Nucleosiden in der katalytischen Region von Desoxyribozyten zu unterscheiden. Es ist zu erwarten, dass durch eine solche Analyse DNA-Konstrukte minimaler Länge erhalten werden, die praktische Anwendungsvorteile bieten und sich darüber hinaus auch für mechanistische Untersuchungen der DNA-Katalyse eignen sowie verbesserte Kris-

tallisationseigenschaften aufweisen sollten. Unsere Methode beruht auf der statistischen „Deletion“ einzelner Nucleoside in einer synthetischen DNA-Bibliothek, wobei ursprüngliche Desoxyribonucleoside durch ein nicht-nucleosidisches Brückenelement ersetzt werden. Die NDS-Methode ähnelt der Alanin-Scanning-Mutagenese von Proteinen, die für die Bestimmung der katalytischen oder funktionellen Rolle spezifischer Aminosäuren verwendet wird.<sup>[4]</sup> Indem man einzelne Aminosäuren durch Alanin ersetzt, wird die Seitenkette am β-Kohlenstoff entfernt, während das Peptid-Rückgrat nahezu unverändert bleibt. In Analogie hierzu entfernen wir Nucleoside aus der DNA, indem wir ein Nucleosid pro Molekül mit dem nicht-cyclischen Verbindungselement Δ ersetzen (Abbildung 1). Dieser Platzhalter ist formal ein Derivat von 1,2,4-



**Abbildung 1.** Konzept des kombinatorischen Nucleosid-Deletions-Scannings (NDS). a) Vergleich eines Desoxyribonucleosids mit dem spaltbaren nicht-nucleosidischen Brückenelement Δ (blau; der formal entfernte Teil des Nucleosids ist grau/gestrichelt dargestellt). Die roten Pfeile zeigen die bevorzugte Spaltung durch alkalische Hydrolyse. b) Struktur des Phosphoramidits 1 für den Einbau von Δ. c) Schematische Darstellung von NDS: Aus der DNA-Bibliothek, in der Δ statistisch verteilt ist, werden die inaktiven Varianten abgetrennt. Die aktive Fraktion enthält nur jene Derivate, in denen Δ nicht stört. d) Die Analyse des Interferenzmusters durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) zeigt unerlaubte Substitutionen als fehlende Banden. DMT = 4,4'-Dimethoxytrityl, tBDMS = *tert*-Butyldimethylsilyl, N = Nucleobase.

Butantriol, und erinnert strukturell an eine unvollständige Ribose. Die Länge der Verbindung zwischen den Nucleosiden (d.h. sechs Bindungen zwischen zwei Phosphoratomen) und die Polarität des 3',5'-verknüpften Phosphodiester-Rückgrats werden beibehalten. Die primäre Hydroxygruppe von Δ, die formal dem 2'-OH eines Ribonucleosids entspricht, ermöglicht die spezifische Spaltung der DNA-Kette durch alkalische Hydrolyse und dient dabei als chemische Markierung, um die Stelle der Nucleosiddelletion in der kombinatorischen

[\*] B. Samanta, Dr. C. Höbartner

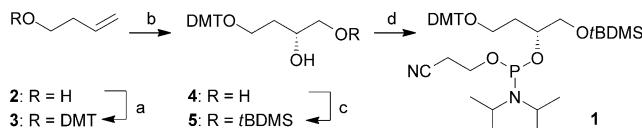
Max-Planck-Forschungsgruppe Nucleinsäurechemie  
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie  
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)  
E-Mail: claudia.hoebartner@mpibpc.mpg.de  
Homepage: <http://www.mpibpc.mpg.de/hoebartner>

[\*\*] Wir danken der Max-Planck-Gesellschaft und dem MPI für Biophysikalische Chemie für die finanzielle Unterstützung. Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Nucleinsäurechemie danken wir für hilfreiche Diskussionen. NMR- und MS-Spektren wurden von Uwe Plessmann und Jürgen Bienert am MPIBpc aufgenommen (Abteilungen für Bioanalytische Massenspektrometrie und Synthetische Chemie).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201208103> zu finden.

DNA-Bibliothek zu identifizieren. Durch die offenkettige Struktur von  $\Delta$  wird zwar die Flexibilität des Rückgrats erhöht, jedoch werden mögliche störende Effekte der 2'-OH-Gruppe, die im Fall eines cyclischen abasischen Analogs auftreten könnten, erfolgreich unterbunden.<sup>[5]</sup>

Das Verbindungselement  $\Delta$  wird mittels Festphasensynthese unter Verwendung des Phosphoramiditbausteins **1** in DNA eingebaut. Die Synthese von **1** erfolgte in vier Stufen ausgehend von 3-Buten-1-ol (**2**, Schema 1). Dabei wurde zuerst die primäre Hydroxygruppe als 4,4'-Dimethoxytrityl-

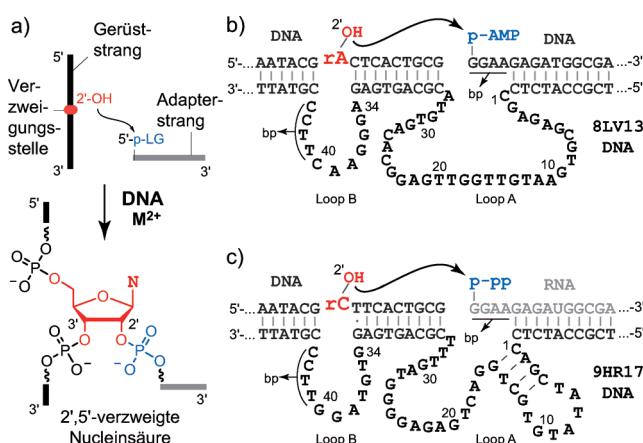


**Schema 1.** Synthese von Phosphoramidit **1** für den Einbau von  $\Delta$ . Reagenzien und Bedingungen: a) DMT-Cl, Pyridin, RT, 6 h, 99%; b) AD-mix- $\beta$ , tBuOH, H<sub>2</sub>O, 0°C, 24 h, 73%; c) tBDMS-Cl, Imidazol, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 16 h, 74%; d) (2-Cyanoethyl)-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit, Me<sub>2</sub>NEt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 45 min, 75%.

ether geschützt (**3**). Durch asymmetrische Dihydroxylierung nach Sharpless mit AD-mix- $\beta$  wurde ausgehend von Alken **3** das vicinale Diol **4** in der gewünschten *R*-Konfiguration erhalten.<sup>[6]</sup> Durch Silylierung der primären Hydroxygruppe entstand Verbindung **5**, die anschließend zum Phosphoramid **1** umgesetzt wurde.

Kombinatorische NDS-Bibliotheken von Desoxyribozymeren oder anderen funktionalen DNAs werden durch Festphasensynthese hergestellt, indem jeder der vier standardmäßig verwendeten DNA-Bausteine in einem bestimmten Verhältnis mit **1** gemischt wird. Die auf die Synthese folgenden Schritte der Analysemethode ähneln den bei anderen Interferenzmethoden durchzuführenden Arbeitsschritten, wie wir kürzlich für die Analyse von funktionaler DNA mittels CoMA und dNAIM beschrieben haben.<sup>[7]</sup> Zuerst werden aktive und inaktive Fraktionen der Bibliothek durch Elektrophorese oder Affinitätschromatographie getrennt, z.B. basierend auf der Produktbildung infolge einer DNA-katalysierten Reaktion, oder durch Bindung eines Liganden im Fall von Aptameren (Abbildung 1 c). Im anschließenden alkalischen Hydrolyseschritt werden die DNA-Stränge nur an den Stellen gespalten, an denen der Baustein  $\Delta$  vorhanden ist. Die Bruchstücke werden dann mittels PAGE aufgetrennt und die Hydrolysemuster analysiert und quantifiziert (Abbildung 1 d). Fehlende Hydrolysebanden in der aktiven Fraktion deuten darauf hin, dass Nucleoside an diesen Stellen für die Funktion der DNA essentiell sind und erhalten bleiben müssen. Andererseits geben alle vorhandenen Banden in der aktiven Fraktion an, welche Nucleoside für die Aktivität der DNA prinzipiell entbehrlich sind. Auf diesen Ergebnissen aufbauend werden dann verkürzte DNA-Sequenzen hergestellt und deren Aktivität überprüft. Erlaubte Veränderungen werden dann fallweise kombiniert, um zur minimalen funktionalen DNA zu gelangen.

Um das Prinzip der kombinatorischen NDS-Mutagenese funktionaler DNA zu zeigen, wählten wir zwei Desoxyribozyme, welche die Synthese kovalent verzweigter Nucleinsäuren ermöglichen.



**Abbildung 2.** a) DNA-katalysierte Synthese von 2',5'-verzweigten Nucleinsäuren. b) Das 8LV13-Desoxyribozym synthetisiert 2',5'-verzweigte DNA mit 5'-adenylierter DNA als Adaptorsubstrat.<sup>[8]</sup> c) Das 9HR17-Desoxyribozym verknüpft einen RNA-Adaptorstrang mit einem DNA-Gerüststrang.<sup>[12]</sup> Die ersten vier Nt jedes Adaptors bilden Watson-Crick-Basenpaare (bp) mit den markierten Nt in Loop B; dies führt zur Ausbildung einer Drei-Helix-Verzweigungsstruktur. LG = Abgangsgruppe.

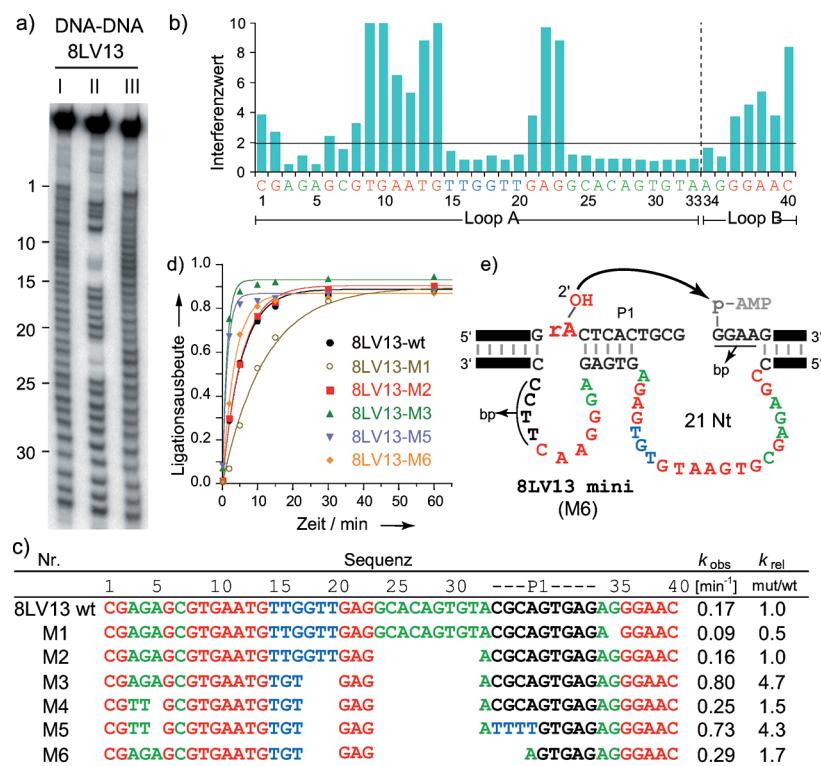
säuren katalysieren. Diese DNA-Enzyme aktivieren die 2'-OH-Gruppe eines internen Verzweigungsnucleotids im Gerüststrang für die Knüpfung einer neuen Phosphodiesterbindung mit dem 5'-Ende des Adapterstrangs (Abbildung 2a).<sup>[8]</sup> Sowohl Gerüststrang wie auch Adapterstrang können entweder DNA oder RNA sein, was zu vier verschiedenen Kombinationen führt (das Verzweigungsnucleotid ist in allen Fällen ein Ribonucleotid; d. h. ein DNA-Gerüststrang ist ein DNA-RNA-Hybrid, das mindestens ein Ribonucleotid enthält). Für jede der vier möglichen Kombinationen gibt es DNA-Enzyme, welche die Synthese verzweigter Nucleinsäuren für verschiedenste Anwendungen ermöglichen.<sup>[9]</sup> Der bekannteste Vertreter kovalent verzweigter Nucleinsäuren ist 2',5'-verzweigte RNA, die das zentrale Strukturelement der Lariat-RNA (Produkt beim Spleißen von mRNA) enthält.<sup>[10]</sup> DNA-Adaptoren wurden mithilfe von DNA-Enzymen an RNA-Gerüststränge geknüpft, um die Aktivität von Ribozymen durch DNA-Klammern zu regulieren. 2',5'-Verzweigte DNA wurde als Konstruktionselement für die DNA-Nanotechnologie vorgeschlagen.<sup>[11]</sup> Die beiden hier untersuchten DNA-Enzyme dienen der Verknüpfung eines DNA-Gerüststrangs mit verschiedenen Adaptersträngen. Das 8LV13-Desoxyribozym ligitert 5'-adenylierte DNA an das Verzweigungsnucleotid (Abbildung 2b),<sup>[8]</sup> während das 9HR17-Desoxyribozym 5'-triphosphorylierte RNA verwendet, um einen RNA-Adapter an das DNA-Gerüst anzuknüpfen (Abbildung 2c).<sup>[12]</sup> Beide DNA-Enzyme wurden über eine Drei-Helix-Verzweigungsstruktur gefunden, die zwei einzelsträngige Loopbereiche einschließt. Loop A enthält 33 Nt, Loop B enthält 7 Nt, die in Summe den 40 zu Beginn randomisierten Nucleotiden des DNA-Pools entsprechen, der bei der In-vitro-Selektion eingesetzt wurde.

Mit der NDS-Mutagenese konnte sehr einfach festgestellt werden, welche der 40 Nt für die katalytische Aktivität notwendig, und welche nicht essentiell sind. Zunächst wurden die entsprechenden DNA-Bibliotheken mit statistisch verteilten

Verbindungselementen  $\Delta$  synthetisiert. Um durchschnittlich nur ein Nucleosid pro Molekül zu ersetzen, untersuchten wir zuerst die Effizienz der Kupplung von Phosphoramidit **1** in Kompetition mit jedem der vier Standardbausteine (dN). Dazu wurden pentamere Modell-Oligonucleotide hergestellt, wobei Phosphoramiditmischungen mit verschiedenen dN/**1**-Verhältnissen verwendet wurden. Nach Entfernen der Schutzgruppen wurden die Produkte mittels Anionenaustausch-HPLC analysiert, und die Produktverteilung wurde durch Integration der Peakflächen der UV-Absorptionskurve quantifiziert.<sup>[13]</sup> Die erwünschte Einbaurate wurde mit Phosphoramiditmischungen erzielt, die 30 % **1** enthielten, bei einer Phosphoramiditkonzentration von 100 mM und einer Kupplungszeit von 4 Minuten. Unter diesen optimierten Bedingungen wurden die Bibliotheken für die beiden DNA-Enzyme synthetisiert. Dabei wurden die Phosphoramiditmischungen nur für die Synthese der Loop-Regionen eingesetzt, während die Bindungsarme als gewöhnliche DNA synthetisiert wurden. Nach der Entschützung und Aufreinigung wurden die DNA-Bibliotheken an die entsprechenden Adaptersubstrate ligiert und dann am 3'-Ende radioaktiv markiert. Die DNA-katalysierte Ligationsreaktion erfolgte mit dem entsprechenden Gerüstsubstrat; anschließend wurden der aktive und der nicht-ligierte Anteil mittels Elektrophorese getrennt.

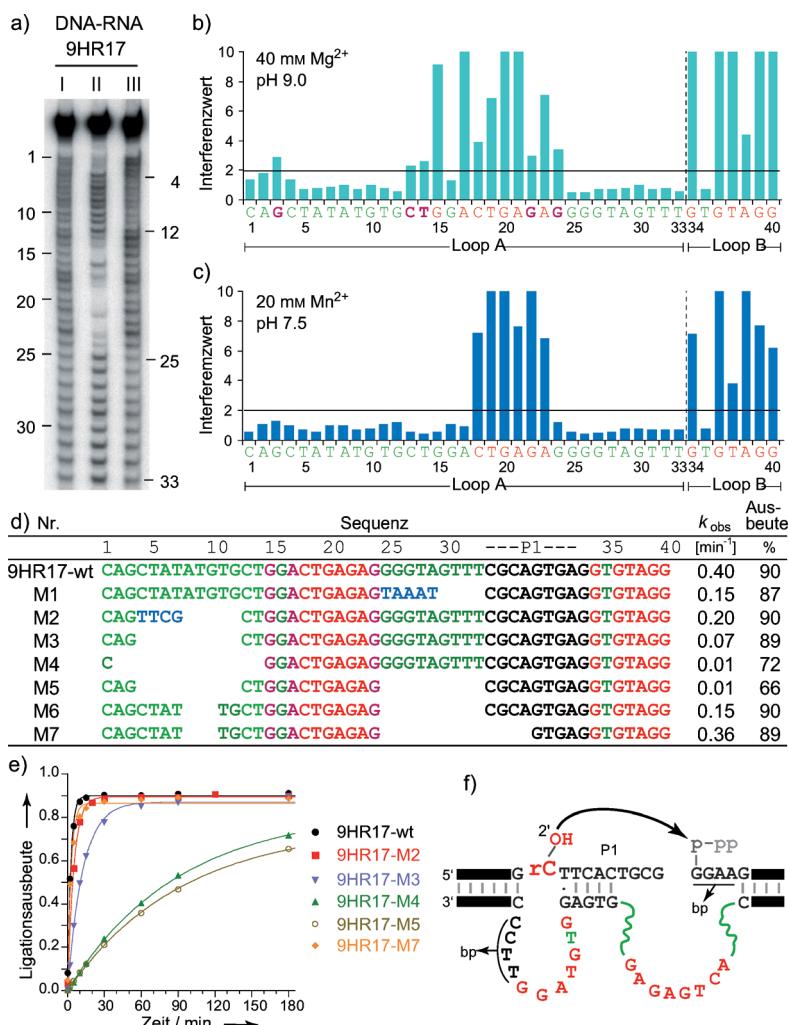
Beide Fraktionen wurden separat hydrolysiert. Die optimalen Hydrolysebedingungen (0.4 M NaOH, 95 °C, 15 min) wurden zuvor an einem 10 Nt langen Modellsubstrat ermittelt.<sup>[13]</sup> Aufgrund der höheren Flexibilität der primären Hydroxygruppe in  $\Delta$  waren hier stärkere Hydrolysebedingungen erforderlich als bei unseren CoMA- und dNAIM-Analysen verwendet werden.<sup>[7]</sup> Die Ergebnisse der NDS-Mutagenese von 8LV13 und 9HR17 sind in den Abbildungen 3 bzw. 4 zusammengefasst. Die Interferenzergebnisse sind als Balkendiagramme dargestellt, wobei die Nucleosidsequenz auf der x-Achse aufgetragen ist, und die Interferenzwerte [das Verhältnis der Bandenintensitäten an jeder Nucleosidposition in der kompletten Bibliothek (Spur I) und der aktiven Fraktion (Spur II)] auf der y-Achse aufgetragen sind. Große Interferenzwerte zeigen dabei an, dass  $\Delta$  die Aktivität unterbindet, während kleine Werte (<2) bedeuten, dass  $\Delta$  toleriert wird.

Die aktive Fraktion der 8LV13-Bibliothek zeigt ein markantes Hydrolysemuster (Abbildung 3a, Spur II): Das Fehlen einiger Banden ist deutlich zu erkennen für Nt 8–14 und 21–23 in Loop A. Diese Nt sind also für die Aktivität des DNA-Enzyms notwendig. In der 3'-Region von Loop A, von Nt 24 bis 33, sind alle Banden vorhanden, was darauf hindeutet, dass diese Nt nicht essentiell sind und diese Region somit verkürzt oder entfernt werden könnte; außerdem wird  $\Delta$  in Positionen 15 bis 20 toleriert. In Loop B hingegen zeigen alle



**Abbildung 3.** NDS-Mutagenese der 8LV13-katalysierten DNA-DNA-Ligation. a) Hydrolysegel für Loop A (vollständiges Gelbild in den Hintergrundinformationen): I. Bibliothek vor der Selektion, II. aktive Fraktion nach Ligation (20 mM Mn<sup>2+</sup>, pH 7.5, 37 °C, 1.5 h). III. unligierte Fraktion. b) Interferenzwerte für alle Nt in Loop A und B farblich markiert; <2: grün, mit Ausnahme von Nt 15–20 (siehe Text); >2: rot. c) Auswahl von 8LV13-Mutanten und deren Geschwindigkeitskonstanten der Ligation,  $k_{\text{obs}}$ . d) Ligationskinetik für ausgewählte 8LV13-Mutanten. e) Minimale 8LV13-DNA (M6). wt = Wildtyp.

Nt außer 34 und 35 hohe Interferenzwerte. Um herauszufinden, ob nicht-essentielle Nucleotide tatsächlich gänzlich entfernt werden können, wurden einige kürzere Derivate der 8LV13-Sequenz hergestellt und deren Ligationskinetik analysiert (Abbildung 3c,d). Loop A konnte durch Deletion des Sequenzabschnitts 24–32 (Derivat M2) deutlich verkürzt werden, ohne dass die Aktivität beeinträchtigt wurde. Interessante Effekte wurden für den Abschnitt von Nt 15–20 beobachtet. Dieser Bereich konnte weder vollständig entfernt noch durch eine zufällige Sequenz der gleichen Länge ersetzt werden (siehe Tabelle S2 in den Hintergrundinformationen), obwohl die NDS-Analyse ergab, dass der individuelle Austausch jedes dieser Nucleotide durch  $\Delta$  die Aktivität nicht störte. Die repetitive Sequenz TTGGTT ist ein auffälliges Merkmal des 8LV13-Desoxyribozyms und konnte erfolgreich zu TGT verkürzt werden, indem jedes zweite Nucleotid von TTGGTT entfernt wurde. Dieses Ergebnis zeigt, dass die NDS-Mutagenese kritische Nucleotide identifizieren kann, wenn der Sequenzkontext genau analysiert wird. Diese verkürzte Variante von 8LV13 zeichnet sich im Vergleich zur ursprünglichen Sequenz durch eine fünfmal höhere Ligationsrate aus. Der die Katalyse beschleunigende Effekt dieser Veränderung wurde auch in einer zweiten Mutante beobachtet (siehe Zusammenstellung aktiver 8LV13-Varianten in Abbildung S18 in den Hintergrundinformationen).<sup>[13]</sup> Außerdem konnte der DNA-Bindungsarm, der den Gerüststrang in



**Abbildung 4.** NDS-Mutagenese der 9HR17-katalysierten DNA-DNA-Ligation. a) Hydrolysegel für Loop A (vollständiges Gelbild in den Hintergrundinformationen): I. Bibliothek vor der Selektion, II. aktive Fraktion nach Ligation ( $40 \text{ mM Mg}^{2+}$ , pH 9.0,  $37^\circ\text{C}$ , 1.5 h), III. unligierte Fraktion. b, c) Interferenzwerte für Ligationsen mit  $\text{Mg}^{2+}$  (b) und  $\text{Mn}^{2+}$  (c); Nt mit Interferenzwerten  $< 2$  sind grün, solche  $> 2$  rot markiert; violett zeigt Unterschiede zwischen  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$ . d) Auswahl verkürzter 9HR17-Mutanten und deren  $k_{\text{obs}}$ -Werte sowie erzielte Ligationsausbeute. e) Ligationskinetik für ausgewählte 9HR17-Mutanten. f) Schematische Darstellung minimaler 9HR17-DNA mit 5 Nt in P1. Die essentiellen Nt in Loop A sind hervorgehoben. Die grünen Verbindungslinien zeigen an, dass mehrere Möglichkeiten bestehen, die zentralen Nt zu positionieren.<sup>[13]</sup>

3'-Richtung der Verzweigungsstelle hybridisiert (P1), von 9 auf 5 Nt verkürzt werden, indem die letzten vier Nt zufällig mutiert oder ganz entfernt wurden. Die kürzeste Variante von 8LV13 (M6), die den 5 Nt langen Bindungsarm und 21 Nt in Loop A enthält, hat immer noch eine doppelt so hohe Aktivität wie das ursprüngliche Enzym mit einem 9 Nt langen Bindungsarm und 33 Nt in Loop A. Dieses verkürzte 8LV13-DNA-Enzym ligiert die Substrate außerdem viel schneller als ein verwandtes kurzes DNA-Enzym, 15HA9, über das kürzlich berichtet wurde (dieses enthält ebenfalls eine 5 Nt lange P1-Bindungsregion und hat nur 15 Nt in Loop A).<sup>[11c]</sup>

Die kombinatorische NDS-Mutagenese kann zusätzlich Einblicke liefern in Anforderungen an bestimmte Nucleotide unter verschiedenen Reaktionsbedingungen, z.B. in Anwesenheit verschiedener Metallionen als Cofaktoren einer

DNA-katalysierten Reaktion. Dies lässt sich am Beispiel des 9HR17-Desoxyribozyms aufzeigen, welches ursprünglich in Anwesenheit von  $\text{Mg}^{2+}$  (40 mM) bei pH 9.0 für die Ligation eines RNA-Adapters an einen DNA-Gerüststrang selektiert wurde. Die Abhängigkeit der Ligationsaktivität von Metallionen wurde jedoch nicht analysiert.<sup>[12]</sup> Für eine Reihe anderer DNA-Enzyme, die RNA-Spaltung,<sup>[14]</sup> RNA-Ligation<sup>[15]</sup> oder die Bildung von Nucleopeptidbindungen katalysieren,<sup>[12]</sup> wurden höhere Ligationsraten mit  $\text{Mn}^{2+}$  anstelle von  $\text{Mg}^{2+}$  als Cofaktor berichtet. Wir fanden für 9HR17 eine 16-fach höhere Ligationsrate, wenn die Reaktion in Anwesenheit von  $\text{Mn}^{2+}$  (20 mM) bei pH 7.5 erfolgt (im Vergleich zu den ursprünglichen Bedingungen). Deshalb haben wir das NDS-Interferenzmuster von 9HR17 für die Ligationsreaktion unter beiden Bedingungen untersucht. Dabei zeigte sich, dass an beiden Enden von Loop A wenigstens 9 Nt nicht essentiell für die Ligationsaktivität mit  $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Mn}^{2+}$  waren (Abbildung 4b,c). Ein zentraler Bereich von sechs Nucleotiden (Nt 18–23) tolerierte die Deletion in Anwesenheit von  $\text{Mn}^{2+}$  jedoch nicht. Dieser kritische Bereich war um 3 Nt länger, wenn die Ligation mit  $\text{Mg}^{2+}$  durchgeführt wurde (violett in Abbildung 4d). Da nur wenige Nt im mittleren Bereich von Loop A essentiell waren, konnte nur eine der flankierenden Regionen entfernt werden, um die richtige Positionierung der kritischen Nucleotide zu gewährleisten. Darüber hinaus zeigen unsere Ergebnisse, dass die vorhergesagte Haarnadelstruktur in Loop A (Abbildung 2c) für die aktive Konformation der DNA-Sequenz keine Rolle spielt. Diese Schlussfolgerung wurde durch Messung der Aktivitäten mehrerer verkürzter Varianten bestätigt (Abbildung 4d,e). Einige der 9HR17-Varianten tolerierten die Verkürzung besser in Kombination mit  $\text{Mn}^{2+}$  anstelle von  $\text{Mg}^{2+}$  (siehe Tabelle S4 in den Hintergrundinformationen).<sup>[13]</sup> Wie schon im Falle der 8LV13-Varianten stellte sich auch für das verkürzte 9HR17-M6-Derivat heraus, dass die vollständige Interaktion über neun Basenpaare mit dem RNA-Substrat in der Region P1 nicht benötigt wird. Die Verkürzung auf 5 Basenpaare (in M7) führt zu einer Verdoppelung der Ligationsrate, vergleichbar zum ursprünglichen  $k_{\text{obs}}$ -Wert von 9HR17 (Abbildung 4d,e). Somit ist die minimierte 9HR17-DNA ein effizientes und für potentielle Anwendungen geeignetes DNA-Enzym.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die kombinatorische NDS-Mutagenese eine einfache und effektive Methode darstellt, um essentielle von nicht-essentiellen Nucleotiden in den Loop-Regionen von Desoxyribozymen zu unterscheiden. Diese neue Methode ist weit weniger aufwändig als die individuelle Synthese systematisch veränderter DNAs, denn die Untersuchung aller einzelnen Varianten ist

nur für kurze Loop-Bereiche praktikabel, wie z.B. kürzlich für die RNA spaltenden DNA-Enzyme 8–17 und 10–23 berichtet wurde.<sup>[16]</sup> Für die in dieser Arbeit untersuchten DNA-Enzyme fanden wir, dass eine signifikant kürzere als in der ursprünglichen Bibliothek zufällig gewählte Sequenz ausreicht, um effiziente Katalyse zu ermöglichen. Diese Erkenntnis ist insbesondere für zukünftige In-vitro-Selektionsexperimente von Bedeutung und sollte detaillierte Untersuchungen über die Korrelation von Katalyseaktivität und Länge der Zufallssequenz stimulieren.<sup>[17]</sup>

Die kombinatorische NDS-Mutagenese ist also eine neue, ressourcenschonende und zeiteffiziente Methode für die Charakterisierung und Veränderung von Desoxyribozymen, und kann sehr leicht auch für die Untersuchung anderer funktionaler DNAs angewendet werden, wie z.B. für Liganden bindende Aptamere. Der offensichtlich große praktische Vorteil von NDS im Vergleich zu CoMA<sup>[7a]</sup> liegt in der Geschwindigkeit der Datensammlung, da nur eine einzige synthetische Bibliothek erforderlich ist, und somit mehrere funktionale DNAs parallel oder/und unter verschiedenen Bedingungen analysiert werden können. Die Ergebnisse der NDS-Interferenzanalyse verringern erheblich die Anzahl der Nucleotide, die für strukturelle Untersuchungen genauer analysiert werden müssen. Kürzere Sequenzen sind außerdem weniger anfällig gegen Fehlfaltung, was die Chancen einer erfolgreichen Kristallisation verbessern sollte. Für NMR-spektroskopische Untersuchungen sind minimale Systeme ebenso von Vorteil, da die Signalaufspaltung verbessert und die Kosten für isotopenmarkierte Proben gesenkt werden können. Darüber hinaus weisen die Positionen, die nicht durch  $\Delta$  ersetzt werden können, direkt auf kritische Nucleotide hin, die durch weiterführende Analysen Einblicke in mechanistische Aspekte der DNA-Katalyse erlauben werden. Dazu bietet sich dann die Analyse mittels dNAIM an,<sup>[7b]</sup> wobei eine große Anzahl von Bibliotheken mit wertvollen Nucleotidanaloga synthetisiert wird. Aus praktischer Sicht vermitteln die NDS-Resultate gleichzeitig auch Einblicke in Abschnitte der DNA-Sequenz, in die regulatorische Elemente eingesetzt oder die durch weitere funktionale Einheiten ergänzt werden könnten. Die in ihrer Länge minimierten und in ihrer Sequenz optimierten DNA-Enzyme eröffnen damit eine Reihe von Möglichkeiten für weitergehendes Enzym-Design und für verschiedene Arten von Anwendungen, z.B. in Verbindung mit Aptameren zur Bildung von Aptazymen und für die Entwicklung von Sensoren und von Konstruktionselementen für die DNA-Nanotechnologie.

Eingegangen am 8. Oktober 2012,  
veränderte Fassung am 3. Januar 2013  
Online veröffentlicht am 1. Februar 2013

**Stichwörter:** Desoxyribozyme · DNA-Katalyse · Festphasensynthese · Interferenzanalyse · Mutagenese

- [1] a) I. Willner, B. Shlyahovsky, M. Zayats, B. Willner, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1153; b) M. Famulok, G. Mayer, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1349; c) B. Strehlitz, C. Reinemann, S. Linkorn, R. Stolttenburg, *Bioanal. Rev.* **2012**, *4*, 1; d) S. K. Silverman, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7336; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7180; e) M. Ye, J. Hu, M. Peng, J. Liu, H. Liu, X. Zhao, W. Tan, *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 3341.
- [2] a) K. Schlosser, Y. Li, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 311; b) G. F. Joyce, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 791; c) G. F. Joyce, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6540; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6420.
- [3] a) J. Hoinka, E. Zotenko, A. Friedman, Z. E. Sauna, T. M. Przytycka, *Bioinformatics* **2012**, *28*, i215; b) T. Schütze, B. Wilhelm, N. Greiner, H. Braun, F. Peter, M. Morl, V. A. Erdmann, H. Lehrach, Z. Konthur, M. Menger, P. F. Arndt, J. Glöckler, *PLoS One* **2011**, *6*, e29604.
- [4] a) B. C. Cunningham, J. A. Wells, *Science* **1989**, *244*, 1081; b) K. L. Morrison, G. A. Weiss, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 302.
- [5] Eine Erklärung zur Wahl des Butantriol-Derivats befindet sich in den Hintergrundinformationen.
- [6] a) K. B. Sharpless, W. Amberg, Y. L. Bennani, G. A. Crispino, J. Hartung, K. S. Jeong, H. L. Kwong, K. Morikawa, Z. M. Wang, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2768; b) H. C. Kolb, M. S. VanNieuwenhze, K. B. Sharpless, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2483.
- [7] a) F. Wachowius, F. Javadi-Zarnaghi, C. Höbartner, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 8682; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8504; b) F. Wachowius, C. Höbartner, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14888.
- [8] C. S. Lee, T. P. Mui, S. K. Silverman, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 269.
- [9] C. Höbartner, P. I. Pradeepkumar in *New Strategies in Chemical Synthesis and Catalysis* (Hrsg.: B. Pignataro), Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, S. 129.
- [10] a) R. L. Coppins, S. K. Silverman, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 270; b) S. K. Silverman, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1521.
- [11] a) E. Zelin, S. K. Silverman, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1907; b) E. Zelin, S. K. Silverman, *Chem. Commun.* **2009**, 767; c) T. P. Mui, S. K. Silverman, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4417.
- [12] P. I. Pradeepkumar, C. Höbartner, D. A. Baum, S. K. Silverman, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1777; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1753.
- [13] Details sind in den Hintergrundinformationen enthalten.
- [14] a) R. P. G. Cruz, J. B. Withers, Y. Li, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 57; b) A. R. Feldman, E. K. Leung, A. J. Bennet, D. Sen, *Chem. BioChem* **2006**, *7*, 98.
- [15] R. L. Coppins, S. K. Silverman, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2900.
- [16] B. Wang, L. Cao, W. Chiuman, Y. Li, Z. Xi, *Biochemistry* **2010**, *49*, 7553.
- [17] Eine experimentelle Studie zu diesem Thema wurde veröffentlicht, während dieses Manuskript in Begutachtung war: T. E. Velez, J. Singh, Y. Xiao, E. C. Allen, O. Y. Wong, M. Chandra, S. C. Kwon, S. K. Silverman, *ACS Comb. Sci.* **2012**, *14*, 680.