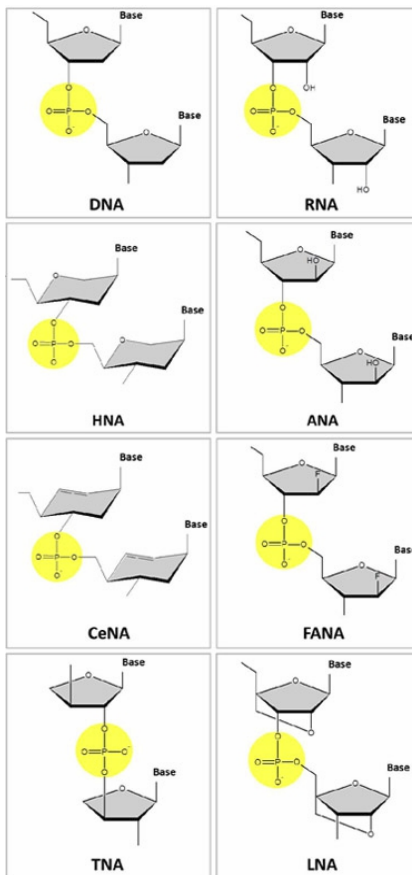
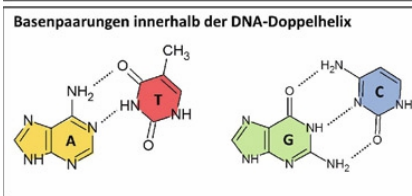
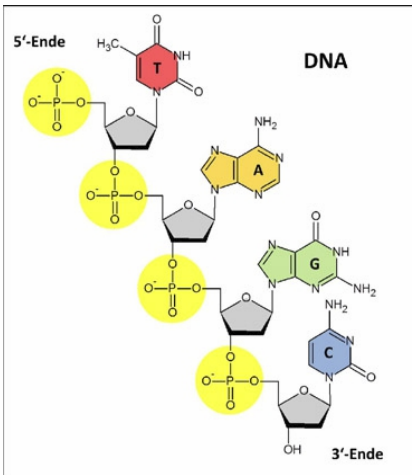


Stefan Dörsam, Sebastian Meister und Oliver Rauh



Xeno-Nukleinsäuren (XNAs) sind Biopolymere, die wie die Erbsubstanz DNA genetische Informationen speichern können. Mit Hilfe eines neuartigen Selektionsverfahrens ist es nun gelungen, Enzyme zu generieren, die Xeno-Nukleinsäuren synthetisieren können. Damit eröffnet sich den XNAs ein breites Anwendungsfeld, das unter anderem den Einsatz von XNA-haltigen Molekülen als Therapeutika im Kampf gegen Krebs in Aussicht stellt.

Im Inneren aller zellulären Organismen, die unseren Planeten bevölkern, findet sich eine hinsichtlich ihrer Eigenschaften verblüffende Substanz. Ohne Sie wäre das Leben in der uns bekannten Form nicht denkbar. Diese Substanz birgt die

Abbildung 1: Die Erbsubstanz DNA. **Oben:** Aufbau eines DNA-Einzelstranges. **Unten:** Darstellung der möglichen Basenpaarungen innerhalb der DNA-Doppelhelix. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind als gepunktete Linien dargestellt.

Abbildung 2: Ausschnitte der chemischen Strukturen von DNA, RNA und verschiedenen XNAs.

Bauanweisungen für eine Vielzahl von Proteinen, die für den Aufbau, die Entwicklung, sowie die Erhaltung eines Organismus von Bedeutung sind. Die Rede ist von der materiellen Grundlage der Vererbung, der Erbsubstanz DNA. Die DNA (*Deoxyribonucleic acid*) ist ein lineares Polymer, an dessen

Aufbau vier verschiedene Nucleotide beteiligt sind, die wiederum aus einer der vier Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) oder Thymin (T), dem Zucker Desoxyribose und einer Phosphatgruppe bestehen (siehe Abbildung 1). Die DNA-Moleküle werden von jeweils zwei Nucleinsäuresträngen gebildet, die sich antiparallel umeinander winden und so eine doppelhelikale Struktur bilden. Innerhalb dieser Doppelhelix liegen sich aufgrund spezifischer Wasserstoffbrückenbindungen stets die Basen A und T sowie C und G gegenüber. Aus diesem Grund verhalten sich die Nucleinsäurestränge eines DNA-Moleküls zueinander wie Negativ und Positiv einer fotografischen Aufnahme. Im Rahmen der Replikation kann daher jeder der beiden Stränge als Vorlage zur Konstruktion des Gegenstranges dienen. Die Informationen, die zur Herstellung der Proteine benötigt werden, sind in Form des *genetischen Codes* in den Genen gespeichert. Alle Lebewesen nutzen im Wesentlichen den gleichen genetischen Code. Auf der Erde existiert folglich nur eine Form des Lebens. Doch wieso ist das so? Ist die DNA so einzigartig, dass Leben nur auf dieser Basis möglich ist?

Vielleicht existiert irgendwo im Universum anderes, uns völlig fremdes Leben, das keine DNA kennt und eventuell nicht einmal auf dem Element Kohlenstoff basiert. Und vielleicht war auch das Leben auf der Erde einst von ganz anderer Beschaffenheit. Denn was wir heute als Leben bezeichnen, ist nur das vorzeitige Resultat einer unermesslich langen Ereigniskette. Wie das erste Leben auf der Erde aussah und auf welchen verschlungenen Wegen das uns bekannte Leben entstand, ist im Grunde noch unverstanden. Vielleicht spielten, wie von der RNA-Welt-Hypothese postuliert wird, in den Anfängen des Lebens die Ribonukleinsäuren (RNA) eine entscheidende Rolle. RNAs dienen im Zellgeschehen heutiger Lebewesen als Genabschriften und erfüllen als Bestandteile der Ribosomen eine bedeutende Aufgabe bei der Proteinbiosynthese. Es handelt sich um äußerst vielseitige Verbindungen, die die Eigenschaften von DNA-Molekülen und Enzymen in sich vereinen: sie können Informationen speichern und zugleich als Biokatalysatoren wirken.

Xenobiologie: Die Erschaffung neuartiger biologischer Systeme

Es ist mithin sehr wahrscheinlich, dass die DNA in den Anfängen des Lebens nicht die Hauptrolle spielte. Vielleicht wird in nicht allzu ferner Zukunft wieder Leben auf der Erde existieren, das nicht auf DNA basiert. Denn mit dem Aufkeimen der Synthetischen Biologie entstand eine wissenschaftliche Disziplin, die sich mit der Erschaffung fremdartiger lebender Systeme befasst: die *Xenobiologie* (altgriechisch: *xenos* "fremd"; *biologia* "Lebenskunde"). Im Mittelpunkt der Xenobiologie steht die Kreierung alternativer biochemischer Strukturen und Prozesse, die in der Natur nicht existieren. Dies umfasst unter anderem die Veränderung des genetischen Codes, die Einführung ungewöhnlicher Aminosäuren in die Proteinbiosynthese sowie die Erzeugung orthogonalen Lebens. In Experimenten ist es beispielsweise bereits gelungen, den natürlichen genetischen Code um ein Basenpaar (P und Z) zu erweitern. Darüber hinaus konnten jüngst synthetische Polymere, sogenannte Xeno-Nukleinsäuren (XNAs), generiert werden, die ebenso wie die Erbsubstanz DNA zur Speicherung genetischer Informationen fähig sind.

Xeno-Nukleinsäuren: Zeit für ein neues Rückgrat

Xeno-Nukleinsäuren sind Biopolymere, die ebenfalls die Nukleobasen A, T, G und C tragen und daher zur spezifischen Basenpaarung mit DNA imstande sind. XNAs unterscheiden sich jedoch von DNA und RNA hinsichtlich der Zuckerkomponente des Polymerrückgrats. Die Fähigkeit zur Speicherung von genetischen Informationen wäre jedoch recht wertlos, wenn es keine Maschinerie gäbe, die diese Informationen lesen und weitergeben könnte. Einer internationalen Forschungsgruppe um Vitor B. Pinheiro und Philipp Holliger vom Medical Research Council in Cambridge ist es nun mit Hilfe eines raffinierten Verfahrens gelungen, eine Reihe von Polymerasen zu generieren, die unter Verwendung einer DNA-Vorlage einen komplementären XNA-Strang synthetisieren können. Des Weiteren konnten sie auch solche Polymerasen erzeugen, die umgekehrt XNA in DNA umschreiben können. Die Molekularbiologen wählten für ihre Experimente sechs verschiedene Xeno-Nukleinsäuren (siehe Abbildung 2), die als HNAs (*1,5-anhydrohexitol nucleic acids*), CeNAs (*cyclohexenyl nucleic acids*), LNAs (*locked nucleic acids*), ANAs (*arabinonucleic acids*), FANAs (*2'-fluoro-arabinonucleic acids*) und TNAs (*α -l-threofuranosyl nucleic acids*) bezeichnet werden.

Zur Generierung geeigneter Polymerasen wählten die Wissenschaftler die TgoT-Polymerase als Ausgangsenzym. Dabei handelt es sich um eine Variante der Tgo-Polymerase aus dem Mikroorganismus *Thermococcus gorgonarius*. Als replikative Polymerase synthetisiert sie normalerweise bei der Zellteilung den komplementären DNA-Strang. Ausgehend von dieser Polymerase wurde durch zufällige Einführung von Aminosäureaustauschen eine TgoT-Mutagenese-Bibliothek von Enzymvarianten erzeugt,

aus der mit Hilfe des eigens entwickelten *Compartmentalized self-tagging* (CST) Selektionsverfahrens bestimmte Varianten herausgefiltert wurden.

Erzeugung geeigneter Polymerasen

Das CST ist eine Methode, um aus einer vorhandenen Sammlung von Polymerase-Varianten mit zufallsmäßig eingeführten Aminosäureaustauschen diejenige mit der gewünschten Aktivität herauszufiltern. Die Gene der Polymerase-Varianten werden dabei in Form von Plasmiden einzeln in *E. coli* Zellen eingebracht. Jede dieser Zellen produziert folglich eine andere Polymerase-Variante. Im nächsten Schritt werden zu den Zellen kurze Oligonukleotide (Primer) gegeben, die an ihrem 5'-Ende mit einem Biotinmolekül verknüpft sind. Bei diesen Primern handelt es sich um kurze Oligonukleotide, die an eine bestimmte Sequenz des Vektors binden können. Des Weiteren werden diesem Ansatz die Xeno-Nukleotide derjenigen Xeno-Nukleinsäure zugegeben, für deren Synthese eine geeignete Polymerase gefunden werden soll. Das resultierende Gemisch wird in feine Tröpfchen zerstäubt, die so klein sind, dass sich in jedem Tropfen nur eine Zelle und somit eine Polymerase-Variante befindet. Jeder Tropfen wird dann einer *Polymerasekettenreaktion* (PCR) unterzogen. Bei dieser Methode wird die Temperatur so eingestellt, dass sich der Primer ausschließlich an die komplementäre Sequenz auf dem Expressionsvektor anlagern kann. Die Polymerase kann im Anschluss den Primer zu einem Strang verlängern. Handelt es sich um eine DNA-Polymerase, benötigt sie dafür eigentlich die natürlichen Nukleinsäurebausteine (dNTP's). Da jedoch lediglich xNTP's zur Verfügung stehen, kann der Primer nur dann verlängert werden, wenn die vorhandene Polymerase-Variante diese xNTP's als Substrate akzeptiert.

Die Primer-Plasmid-Komplexe werden anschließend gefällt und an Streptavidin-gekoppelte Kügelchen gebunden. Streptavidin ist ein Protein, das mit hoher Affinität Biotin binden kann. Daraufhin werden die Kügelchen gewaschen. Bei diesem Waschschriff gilt: je länger der Primer verlängert wurde, desto schlechter lässt sich der an sie gebundene Vektor abwaschen. Somit haften am Ende nur noch solche Vektoren an den Kügelchen, die für eine aktive Polymerase-Variante kodieren. Nach der Vervielfältigung der selektierten Vektoren, können diese entweder für eine weitere Selektionsrunde oder einen Polymeraseaktivitätstest (*High throughput polymerase activity assay*, PAA) verwendet werden.

Polymeraseaktivitätstest

Die via CST gefundenen Polymerasen wurden anschließend noch einmal auf ihre Funktion getestet (siehe Abbildung 4). Auch für dieses Verfahren wird ein Biotin-gekoppelter Primer verwendet, der an einen Sequenzabschnitt eines vorgelegten DNA-Einzelstranges binden kann. Anschließend werden wieder xNTP's der entsprechenden Xeno-Nukleinsäure und die Polymerase zugegeben. In dem folgenden Reaktionsschritt werden die Primer von der Polymerase verlängert, wenn diese die xNTP's akzeptieren kann. Der Ansatz wird anschließend in ein Gefäß gegeben, das mit Streptavidin beschichtet ist. Dort bindet das Biotin an das Streptavidin und der verlängerte Primer wird immobilisiert. Die DNA-Matrize wird daraufhin durch Denaturierung entfernt, sodass nur noch der Primer gebunden ist. Im nächsten Schritt wird eine DNA-Sonde zugegeben. Diese ist mit Digoxigenin (DIG) chemisch verknüpft und kann an einen Bereich des verlängerten Primers binden. Durch die Zugabe eines Sonden-spezifischen Antikörpers, der an das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, lässt sich das Vorhandensein der Primerverlängerung und mithin die Aktivität der Polymerase anhand der Peroxidaseaktivität indirekt nachweisen. Mit diesem Verfahren ist es auch möglich, reverse

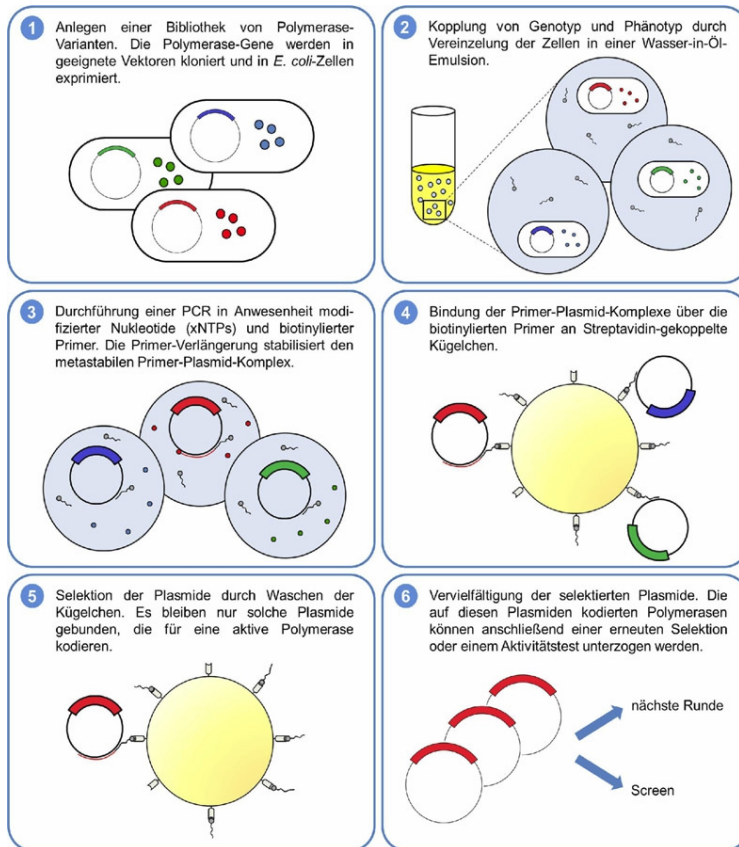


Abbildung 3: CST-Selektionsverfahren zur Auffindung solcher Polymerasen, die xNTP's als Substrate akzeptieren.

Transkriptasen zu finden, die unter Verwendung einer XNA-Vorlage einen komplementären DNA-Strang synthetisieren können.

Durch Einsatz dieser Verfahren konnten Polymerasen generiert werden, die in der Lage sind DNA in HNA, CeNA, LNA, ANA, FANA und TNA umzuschreiben und auch ausgehend von diesen wieder DNA zu synthetisieren. Der nächste Schritt besteht nun in der Generierung von Polymerasen, die unter Verwendung einer XNA-Vorlage einen komplementären XNA-Strang synthetisieren und damit potenziell ein XNA-Genom replizieren können.

XNA-Aptamere: Ein Anwendungsgebiet

Mit diesen neuen Polymerasen in der Hand steht einem Einsatz von XNAs in der Aptamertechnologie nichts mehr im Wege. Aptamere sind kurze Nucleinsäuresequenzen, die in der Lage sind unterschiedliche Zielstrukturen wie kleine Moleküle, Proteine und

Nucleinsäuren zu binden und deren biologische Funktion zu beeinflussen. Aptamere sind daher vielversprechende Kandidaten, um zum Beispiel als Therapeutika im Kampf gegen Krebs oder in der medizinischen Diagnostik eingesetzt zu werden. Gegenüber Antikörpern, die bereits seit Jahren zur Behandlung zahlreicher Erkrankungen eingesetzt werden, weisen Aptamere einige Vorteile auf. So können sie beispielsweise vollständig im Reagenzglas erzeugt und chemisch synthetisiert werden. Auf einen Einsatz in Pharmazie und Medizin wirkt sich jedoch die Tatsache negativ aus, dass Aptamere schnell aus dem Blutstrom entfernt werden. Typische Halbwertszeiten von DNA- und RNA-Aptameren bewegen sich zwischen Minuten und wenigen Stunden. Ursache dafür ist die Degradation der Aptamere durch Nucleasen. Dabei handelt es sich um Enzyme, die die Phosphodiesterbindung zwischen zwei Nucleotiden spalten können. Mit dem neuen Satz an Polymerasen ist es nun möglich, robustere Aptamere aus XNA zu erzeugen, die spezifisch bestimmte Zielstrukturen binden, aber nicht durch natürliche Nucleasen gespalten werden können. Der Forschungsgruppe um Vitor B. Pinheiro und Philipp Holliger ist diesbezüglich bereits der Nachweis gelungen, dass XNA-Aptamere ebenso wie DNA- und RNA-Aptamere durch *in vitro* Selektion erzeugt werden können.

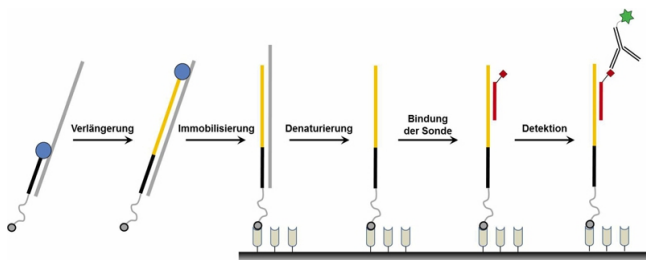





Abbildung 4: Schematische Darstellung des Polymeraseaktivitätstests.

Zusammenfassung

Xeno-Nucleinsäuren (XNAs) sind künstliche DNA-Alternativen, die zur Speicherung genetischer Informationen in der Lage sind. Mit

Hilfe des sogenannten CST-Selektionsverfahrens ist es nun erstmals einer internationalen Forschungsgruppe gelungen, Polymerasen zu erzeugen, die DNA in XNA und umgekehrt XNA in DNA umschreiben können. Dieses Verfahren eröffnet den XNAs eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten in Medizin und Biotechnologie. So erlauben die generierten XNA-Polymerasen die Herstellung spezifischer XNA-Aptamere, die beispielsweise als Therapeutika im Kampf gegen Krebs eingesetzt werden könnten.

Kontakt:	Schlauer Fuchs
 <p>Der Artikel wurde im Rahmen des Studienprojektes HighChem des Fachbereichs Chemie der Technischen Universität Darmstadt verfasst (s. Woche 2). Die Autoren, Stefan Dörsam, Sebastian Meister und Oliver Rauh sind Studierende des Faches Biomolecular Engineering (Master) an der TU Darmstadt</p> <p>E-Mail: stefandoersam@gmx.de, meister.dieburg@googlemail.com, oliver-rauh@gmx.de</p> <p>Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Harald Kolmar (E-Mail: kolmar@biochemie-tud.de).</p>  	<p>Unsere Schlaue-Fuchs-Frage zu diesem Beitrag lautete:</p> <p>Wofür steht CST, und was versteht man darunter?</p>
Literatur:	
<p>[1] M. Yarus, <i>Cold Spring Harb Perspect Biol</i> 2011, 3.</p>	
<p>[2] M. Schmidt, <i>Bioessays</i> 2010, 32, 322-331.</p>	
<p>[3] Z. Yang, F. Chen, J. B. Alvarado, S. A. Benner, <i>J Am Chem Soc</i> 2011, 133, 15105-15112.</p>	
<p>[4] V. Pinheiro, A. I. Taylor, C. Cozens, M. Abramov, M. Renders, S. Zhang, J. C. Chaput, J. Wengel, P.-C. S.-Y., S. H. McLaughlin, P. Herdewijn, P. Holliger, <i>Science</i> 2012, 336, 341-344.</p>	