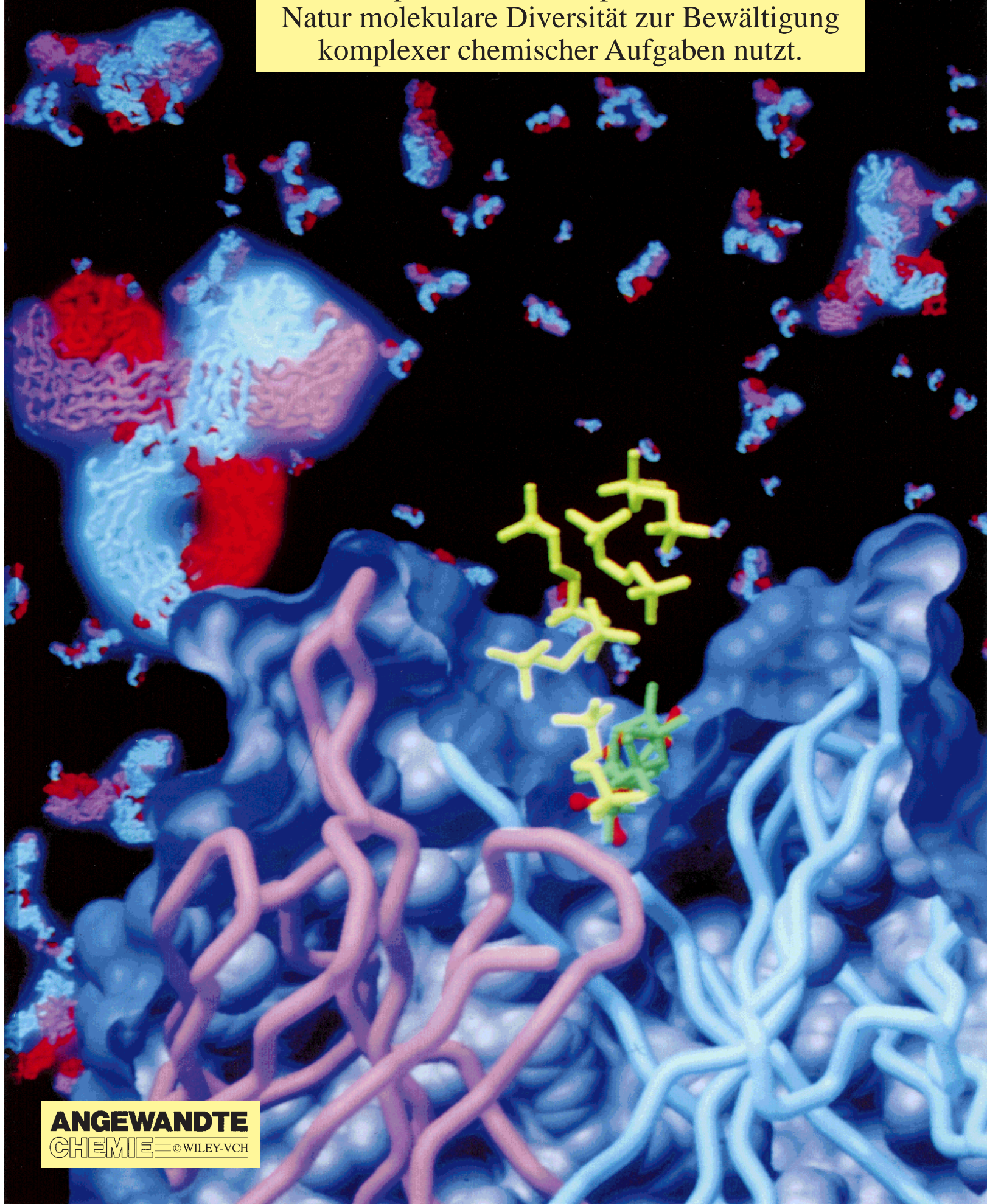


Antikörper sind ein Beispiel dafür, wie die Natur molekulare Diversität zur Bewältigung komplexer chemischer Aufgaben nutzt.



# Das Hervorbringen neuer molekularer Funktionen: ein Lehrstück der Natur

David R. Liu und Peter G. Schultz\*

Seit die Funktion zunehmend anstelle der Struktur ins Zentrum der Synthese von Molekülen rückt, müssen effizientere Strategien entwickelt werden, um Moleküle mit definierten biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften herzustellen. Die Natur hat Moleküle mit vielen komplexen biologischen Funktionen hervorgebracht, indem sie umfangreiche und unterschiedliche Sammlungen oder Bibliotheken chemischer Strukturen syn-

thetisiert hat und diese auf eine gewünschte Funktion durchmustert oder selektiert hat. Der gleiche Ansatz wird jetzt unter Anwendung von Methoden und Prinzipien aus Chemie, Biologie und Physik verfolgt, um synthetische Moleküle mit neuen oder erweiterten Eigenschaften herzustellen, die von biologischen Katalysatoren und kleinen bioaktiven Molekülen bis zu lumineszierenden Metalloxiden reichen. Die Analyse der Strukturen und Ei-

genschaften dieser Moleküle in Verbindung mit dem Reichtum an Informationen, die aus den entsprechenden Experimenten gewonnen wurden, führt zu einem vertieften Verständnis der Beziehung zwischen Struktur und Funktion auf molekularer Ebene.

**Stichwörter:** Kombinatorische Chemie • Materialwissenschaften • Nucleinsäuren • Proteine • Synthesemethoden

## 1. Einleitung

Unsere Fähigkeit, neue molekulare Strukturen mit neuartigen physikalischen, chemischen oder biologischen Eigenschaften herzustellen, hat einen großen Einfluß auf viele Wissenschaftsbereiche einschließlich der biomedizinischen Wissenschaften, der Chemie und der Festkörperphysik. Beispiele hierfür reichen von der Synthese von Antibiotika und Genen bis zu der von Photolacken und Hochtemperatur-Supraleitern. Mit zunehmender Komplexität von Struktur und Funktion der Zielmoleküle erweist sich unsere Fähigkeit als mehr und mehr begrenzt, die präzisen Strukturanforderungen, die in einem gewünschten Satz von Eigenschaften resultieren, zu definieren. Dies wiederum führt dazu, daß eine immer größere Zahl von Molekülen in einem iterativen Prozeß synthetisiert und getestet werden muß, um diejenigen zu identifizieren, die die gewünschte Struktur und Funktion haben – ein langwieriges und aufwendiges Verfahren. Unter den Strategien, die entwickelt wurden, um die Herausforderungen durch den ständig wachsenden Bedarf an Molekülen mit neuen oder erweiterten Eigenschaften zu bewältigen, befinden sich einige biologisch inspirierte Ansätze. Diese

leiten sich aus unserer Erkenntnis ab, daß die Natur eine beeindruckende Zahl komplexer Molekülstrukturen und Konjugate hervorgebracht hat, deren Funktion von der Genregulation und Signaltransduktion bis zur Photosynthese und Proteinbiosynthese reicht. In dem Maße, in dem wir beginnen, die Strukturprinzipien und molekularen Mechanismen, die an diesen Prozessen beteiligt sind, zu verstehen, können wir diese biologischen Erkenntnisse und auch die Prozesse selbst mit den Methoden der physikalischen Wissenschaften kombinieren, um neue Moleküle mit Funktionen herzustellen, die bisher weder in der Natur noch im Labor gefunden worden sind.

Ein Beispiel für eine solche Synergie zwischen Chemie und Biologie ist die Entwicklung und Anwendung kombinatorischer Strategien. Dieser Ansatz, bei dem umfangreiche diverse Sammlungen oder „Bibliotheken“ von Molekülen synthetisiert und dann nach neuartigen Funktionen durchmustert oder selektioniert werden („screening“), basiert auf den kombinatorischen Prozessen der Natur. Beispielsweise haben sich sowohl im humoralen als auch im zellulären Zweig des Immunsystems ausgefeilte kombinatorische genetische Mechanismen entwickelt, durch die molekulare Diversität geschaffen wird sowie Rezeptoren selektiert werden, die fremde Antigene mit hoher Affinität und Selektivität erkennen können. Die Mechanismen dieser Prozesse sind relativ gut bekannt.<sup>[1–3]</sup> Das dreidimensionale Gerüst eines Antikörpermoleküls besteht aus zwei Polypeptidketten (einer schweren (H, heavy) und einer leichten (L, light)), die sechs Schleifen (loops) auf einem achtsträngigen  $\beta$ -Faltblattgerüst

[\*] Prof. P. G. Schultz, D. R. Liu  
Howard Hughes Medical Institute und  
Department of Chemistry  
University of California, Berkeley  
Berkeley, CA 94720-1460 (USA)  
Fax: (+1) 510-643-6890  
E-mail: pgschultz@lbl.gov

enthalten.<sup>[4]</sup> Diese Struktur wird aus vier unterschiedlichen Gensegmenten zusammengesetzt, V (variable), D (diversity), C (constant) und J (joining), wobei jedes aus einer Anzahl verschiedener Gene ausgewählt werden kann. Das kombinatorische Zusammenfügen der Gensegmente V, D und J in Verbindung mit der zusätzlichen Diversität an den Verbindungsstellen  $V_L$ - $J_L$ ,  $V_H$ -D und D- $J_H$  liefert eine strukturell diverse Population von Keimbahn-Antikörpern (Abbildung 1). Nachdem eine „Leitstruktur“ für den Antikörper

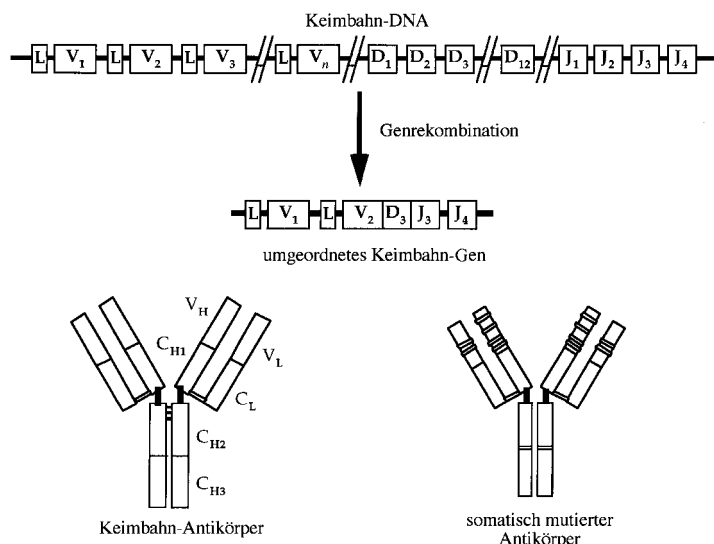


Abbildung 1. Kombinatorisches Verbinden der V-, D- und J-Gene zur Bildung eines Antikörpermoleküls.

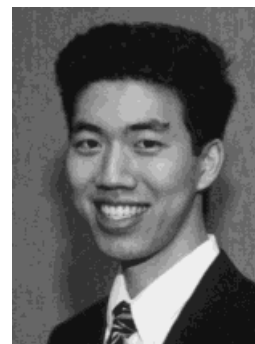
aus diesem Pool ausgewählt wurde, die auf seiner Fähigkeit beruht, eine fremde Substanz zu binden, wird diese Affinität im Verlauf der Immunantwort durch somatische Mutationen erhöht. Bei diesem Prozeß, bei dem Basen der DNA-Sequenzen für die variable Region ausgetauscht werden, entsteht zusätzliche Diversität. In seiner ursprünglichsten Form umfaßt der kombinatorische Prozeß also die Synthese sehr vieler individueller Strukturen aus Sätzen von Bausteinen ausgehend von einem zentralen Strukturmotiv. Die Auswahl des Strukturmotivs und der Bausteine erfolgt am besten anhand von verfügbaren empirischen und theoretischen Modellen. Die Moleküle, die die gewünschte Funktion haben, werden dann identifiziert und durch wiederholte Runden von Auswahl oder Selektion und Mutation optimiert.

Dieser kombinatorische Ansatz kann auf jede Molekülstruktur angewandt werden, die schrittweise oder konzertiert aus einem Satz von Molekülvorstufen zusammengesetzt werden kann und bei der es ein Auswahl- oder Selektionsverfahren für die gewünschte Funktion gibt. Dazu gehören oligomere Moleküle wie Nucleinsäuren und Peptide, nicht-polymere Moleküle wie Naturstoffe und sogar Festkörper wie Supraleiter oder Polymere. Um Nutzen und Anwendungsbreite dieser neuen Synthesestrategie ebenso zu verdeutlichen wie die noch existierenden experimentellen Herausforderungen, werden wir eine Reihe von Beispielen aus unserem und vielen anderen Labors beschreiben. Diese Anwendungen decken ein breites Spektrum ab, von der Biokatalyse und dem Nachweis von Drogen bis hin zur Materialwissenschaft.

Peter G. Schultz studierte am California Institute of Technology. Im Rahmen seiner Dissertation entwickelte er die ersten synthetischen Moleküle, die DNA sequenzspezifisch spalten können. Nach einem Postdoktorandenaufenthalt am Massachusetts Institute of Technology ging er 1985 an die University of California in Berkeley, wo er gegenwärtig Professor für Chemie ist. Außerdem bekleidet er die Positionen eines Principal Investigator am Lawrence Berkeley National Laboratory und eines Investigator des Howard Hughes Medical Institute. Seine Forschung, die an der Schnittstelle zwischen Biologie, Chemie und Materialforschung angesiedelt ist, befaßt sich a) mit der Entwicklung katalytischer Antikörper; b) mit der Anwendung molekularer Diversität auf Probleme der biomolekularen Erkennung und Katalyse, Wirkstoffentwicklung und Materialwissenschaften; c) mit der Entwicklung von Methoden für den selektiven Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren in Proteine und d) in jüngster Zeit mit der biologischen Sichtbarmachung von Einzelmolekülen. Er ist Mitbegründer des Affymax Research Institute und der Firma Symyx Technologies. Er wurde unter anderem mit dem Waterman Award der National Science Foundation, durch die Aufnahme als Mitglied in die National Academy of Sciences und 1994 mit dem Wolf-Preis für Chemie ausgezeichnet. Er ist seit kurzem Chemieprofessor am Scripps Research Institute, und er wird die Leitung des neuen Novartis Institute for Functional Genomics in San Diego übernehmen. Dieser Übersichtsartikel geht auf seinen Eröffnungsvortrag beim 36. IUPAC-Kongreß in Genf im Sommer 1997 zurück.



P. G. Schultz



D. R. Liu

David R. Liu, geboren 1973 in Riverside, Kalifornien, erhielt 1994 seinen B.A.-Abschluß in Chemie an der Harvard University, wo er unter Anleitung von Professor E. J. Corey über die Biosynthese von Steroiden forschte. Gegenwärtig ist er Doktorand in der Arbeitsgruppe von Professor Schultz an der University of California in Berkeley, wo er In-vitro- und In-vivo-Methoden für den ortsspezifischen Einbau von nichtnatürlichen Aminosäuren in Proteine untersucht.



## 2. Diversität von Proteinen und Polypeptiden

### 2.1 Immunologische Diversität und katalytische Antikörper

Die Idee, mit Hilfe der natürlichen immunologischen Diversität neue chemische Funktionen zu erzeugen, wurde zuerst bei der Herstellung katalytischer Antikörper umgesetzt.<sup>[5–7]</sup> Die Entstehung der immunologischen Diversität durch klonale Selektion spielt sich (im Unterschied zur Entstehung der evolutionären Diversität) innerhalb von Wochen ab und ist so unter Laborbedingungen „programmierbar“. Als Basis für die Antikörperselektion dient allerdings eher die Bindungsaffinität als die katalytische Aktivität; daher müssen mechanistische Prinzipien, z. B. selektive Bindung und Stabilisierung des Übergangszustands, für die Herstellung katalytischer Antikörper herangezogen werden. Um beispielsweise einen Antikörper herzustellen, der die Insertion eines Metallions in Porphyrin katalysiert (den letzten chemischen Schritt bei der Hämbiosynthese), wurden Antikörper gegen *N*-Methylprotoporphyrin **1** gesucht. Dieses Molekül imitiert den vermuteten Übergangszustand bei der Metallierungsreaktion, einen konformativ verzerrten Porphyrinring. Ein Antikörper, der für **1** spezifisch ist, katalysiert die Insertion des Metallions in das Mesoporphyrin mit einer Geschwindigkeit, die der des natürlichen Biosynthese-Enzyms, der Ferrochelatase, nahekommt.<sup>[8]</sup> Untersuchungen mit Resonanz-Raman-Spektroskopie zeigten, daß Enzym und Antikörper gleichermaßen die Reaktion dadurch erleichtern, daß sie das planare Porphyrinsubstrat verzerren, was mit dem vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus übereinstimmt. Diese Verzerrung geht beim Enzym mit einer Aufwölbung des Porphyrinrings einher; bei der Antikörper-katalysierten Reaktion wird dies durch eine auf- und abwärtsgerichtete Verzerrung nachgeahmt, die der in *N*-Methylmesoporphyrin entspricht<sup>[9]</sup> (Abbildung 2). Dies wurde auch durch eine kristallographische Analyse des Antikörper-*N*-Methylprotoporphyrin-Komplexes bestätigt,<sup>[10]</sup> die zeigte, daß durch **1** hervorgerufene somatische Mutationen eine wichtige Rolle für den Mechanismus spielen.

In einem zweiten Beispiel wird eine Umesterungsreaktion durch einen Antikörper katalysiert, der gegen einen Phosphonatdiester als Analogon des Übergangszustandes gerichtet ist.<sup>[11]</sup> Der Antikörper katalysiert die entsprechende Acyltransferreaktion zwischen Thymidin und einem Alaninester mit einer effektiven Molarität von  $3 \times 10^4 \text{ M}$  ( $(k_{\text{cat}}/K_{\text{M}})/k_{\text{uncat}} \approx 10^8$ ). Außerdem katalysiert der Antikörper keine Acylübertragungen auf Wassermoleküle. Aus NMR-Untersuchungen des Michaelis-Komplexes läßt sich schließen, daß die hohe katalytische Effizienz und Aktivität hauptsächlich durch die optimale Orientierung des Acyldonors und des Nucleophils im aktiven Zentrum des Antikörpers zustande kommen, die der Orientierung des Phosphonatrestes im Hapten entspricht.<sup>[12]</sup> Indem man den natürlichen diversen Pool des Immunsystems anhand von mechanistischen Kriterien (z. B. der Verzerrung des planaren Porphyrinringes oder der Nachbarschaft reaktiver Gruppen) durchmustert, ist es möglich, einerseits Antikörper mit enzymähnlichen Eigenschaften herzustellen und andererseits Grundprinzipien der Enzymkatalyse zu testen.

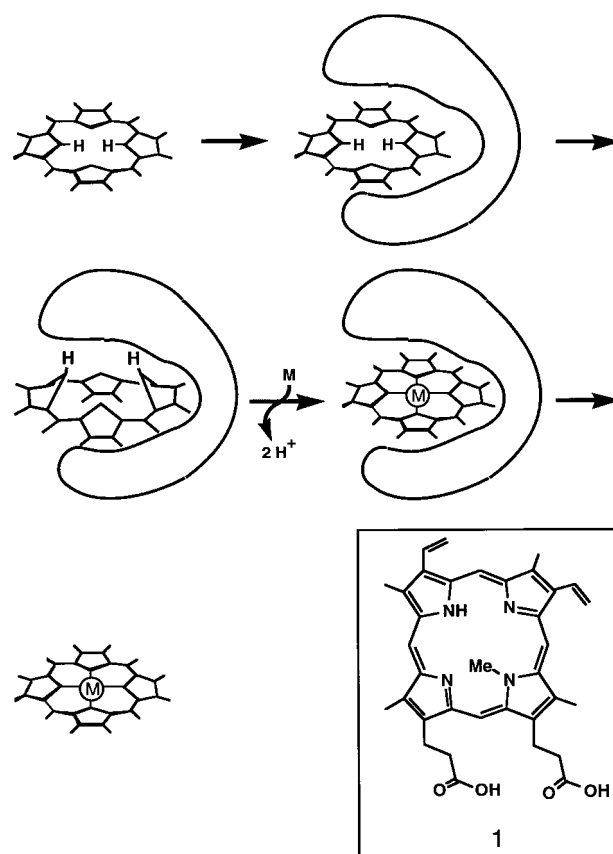


Abbildung 2. Verzerrung von *N*-Methylprotoporphyrin **1** durch einen Antikörper mit Ferrochelatase-Aktivität.<sup>[10]</sup>

Daneben wurden andere Ansätze für die Herstellung katalytischer Antikörper entwickelt, die kovalente Katalyse, Effekte aufgrund räumlicher Nähe und allgemeine Säure-Base-Katalyse berücksichtigen.<sup>[7]</sup> Außerdem wurden Strategien entwickelt, um den immunologisch diversen Pool direkt nach katalytischen Funktionen in vivo und auch in vitro zu durchsuchen. Auf diese Weise wurden Antikörper erhalten, die eine Vielzahl enzymatischer und nichtenzymatischer Reaktionen katalysieren. Dazu gehören stereoselektive Redoxreaktionen, pericyclische Reaktionen, Umlagerungs- und Acyltransferreaktionen und einige „schwierige“ chemische Transformationen einschließlich der kinetisch ungünstigen Exo-Diels-Alder-Reaktionen und Anti-Baldwin-Cyclisierungen.<sup>[13]</sup> In einem aktuellen Beispiel wurde durch die am Reaktionsmechanismus orientierte Selektion mit einem Hapten ein Aldolase-Antikörper gefunden, der mit Lysinseitenketten im aktiven Zentrum eine kovalente Bindung eingehen kann. Die katalytische Effizienz und die Stereoselektivität dieses Antikörpers gleichen bemerkenswerterweise denen der Klasse-I-Aldolasen.<sup>[14]</sup> Die katalysierte Reaktion verläuft über die Bildung eines Imins zwischen dem Substrat, einem Keton, und der  $\varepsilon$ -Aminogruppe einer Lysinseitenkette im aktiven Zentrum, die Umlagerung zum Enamin, die Kondensation mit einem Aldehyd und die abschließende Hydrolyse zum Aldol als dem Reaktionsprodukt – ein Mechanismus, der dem des Enzyms ähnlich ist. Gleichzeitig toleriert der Antikörper ein ungewöhnlich großes Substratspektrum (Abbildung 3) und ist gegenwärtig einer der am allgemeinsten

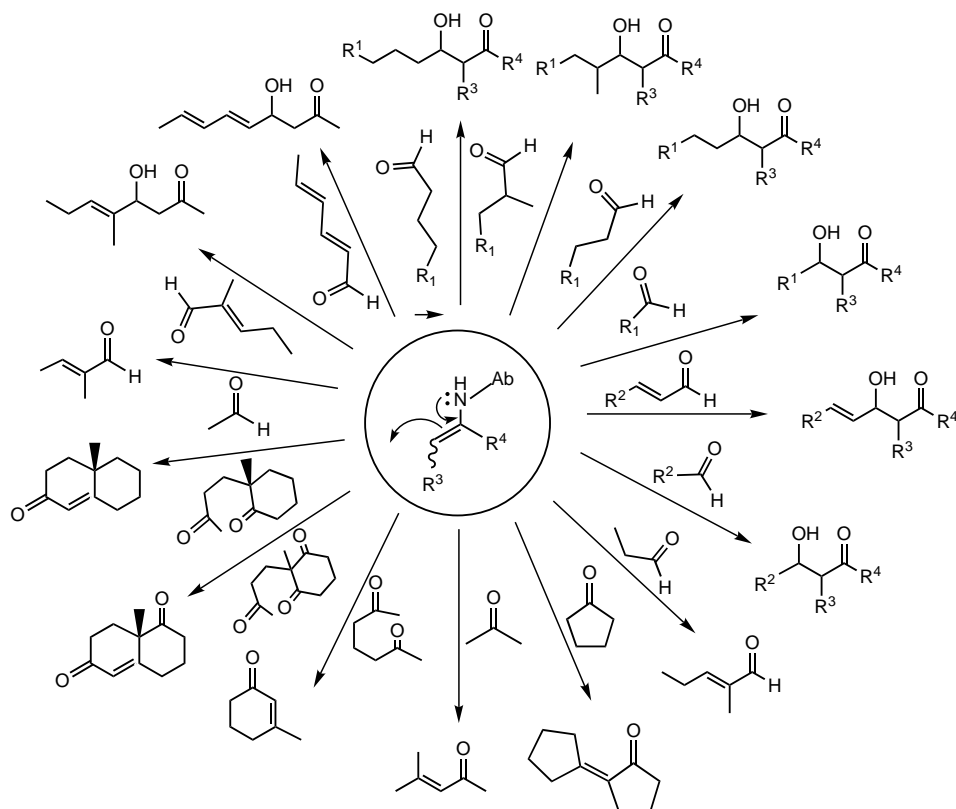


Abbildung 3. Schematische Darstellung eines Antikörpers (Ab) mit Aldolase-Aktivität und breitem Substratspektrum.<sup>[14]</sup> Der Kreis in der Mitte zeigt das kovalente Enamin-Intermediat, das aus dem Keton-Substrat und der  $\epsilon$ -Aminogruppe einer Lysinseitenkette im aktiven Zentrum des Antikörpers gebildet wurde.

einsetzbaren stereoselektiven Katalysatoren für C-C-Bindungsknüpfungen.<sup>[15]</sup> Dieses Beispiel illustriert auf elegante Weise das katalytische Potential der immunologischen Diversität, das mit klaren chemischen Zielvorgaben verknüpft werden kann.

Die Charakterisierung katalytischer Antikörper ermöglicht auch wichtige neue Einsichten in die Evolution von Bindung und Katalyse sowie in die kombinatorischen Prozesse des Immunsystems selbst. So konnten mit strukturellen und mechanistischen Untersuchungen an der antikörperkatalysierten Oxy-Cope-Umlagerung und an Diels-Alder-Reaktionen einige Mechanismen verdeutlicht werden, durch die Bindungsenergie dazu genutzt werden kann, die stereoelektronischen Verhältnisse pericyclischer Reaktionen zu beeinflussen.<sup>[16–18]</sup> Detaillierte biophysikalische und strukturelle Untersuchungen wurden auch durchgeführt, um die Reifung der Affinität eines Antikörpers mit Esterhydrolase-Aktivität zu verfolgen, der gegen das Nitrophenylphosphonat-Analogon einer Übergangszustandsstruktur gerichtet war. Nach neun somatischen Mutationen entstand ein katalytischer Antikörper, der das Hapten mit 35 000fach größerer Affinität bindet als die Keimbahnvorstufe. Im Unterschied zum affinitätsgereiften Antikörper, der das Hapten nach dem „Schlüssel-Schloß“-Prinzip bindet, kann die Bindungsstelle des Keimbahnantikörpers mehr als eine Konformation einnehmen; Antigenbindung und somatische Mutation stabilisieren dann die Konformation mit der optimalen Haptenkomplementarität (Abbildung 4). Daher ist zu erwarten, daß die Konformationsdiversität (ein Schlüsselement in

Paulings Modell von der chemischen Instruktion der Antikörperspezifität) eine wichtige Rolle bei der Ausweitung des Bindungspotentials im Vergleich zur primären Immunantwort spielt.<sup>[19–21]</sup> Die Untersuchung zeigte außerdem, daß die Bindungs- und Katalyseigenschaften des Antikörpers auch stark durch Mutationen beeinflusst werden, die weit entfernt vom gebundenen Liganden stattfinden, eine wichtige Lektion für diejenigen, die sich bemühen, Proteinfunktionen zu modifizieren. Durch die Untersuchung katalytischer Antikörper wurde auch die strukturelle Basis der Polyspezifität mancher Familien von Keimbahnantikörpern, einem weiteren Faktor, der wahrscheinlich zu dem bemerkenswerten Bindungspotential des primären Antikörperrepertoires beiträgt, besser verständlich.<sup>[17]</sup> Indem man neue Funktionalität aus der Diversität der Anti-

körper gewinnt, erhält man also auch weitere Einsichten in die Struktur-Wirkungs-Beziehungen im Immunsystem selbst.

Viele Wissenschaftler haben sich mit der natürlichen Diversität befaßt, die durch das Immunsystem erzeugt wird. 1989 wurde ein neues Vektorsystem benutzt, das auf dem Bakteriophagen Lambda basiert, um eine synthetische kombinatorische Bibliothek von Fab-Fragmenten des Maus-Antikörperrepertoires in *Escherichia coli* zu exprimieren.<sup>[22]</sup> Dieses System ermöglichte die schnelle und einfache Identifizierung monoklonaler Fab-Fragmente, die ein bestimmtes Antigen binden, in einer Form, die für genetische Manipulationen geeignet ist; beispielsweise wurden mit dieser Technik monoklonale Fab-Fragmente gegen ein Hapten hergestellt, das ein Übergangszustandsanalogon ist.

Die Phagen-Display-Technik,<sup>[23–26]</sup> mit der ein Peptid oder Protein auf der Oberfläche eines filamentösen Phagen exprimiert wird, hat sich ebenso als andere Methoden, die die Polypeptidkette mit der codierenden DNA verbinden,<sup>[27–29]</sup> als sehr leistungsfähig zur Erzeugung von Diversität in vitro erwiesen. Mutiert man Codons zufällig oder an spezifischen Stellen innerhalb eines Gens unter Verwendung synthetischer Oligonucleotide, können Bibliotheken von  $>10^8$  verschiedenen Polypeptidsequenzen hergestellt und auf der Phagenoberfläche präsentiert werden. Anschließendes affinitätsbasiertes Screening mit immobilisierten Liganden, Elution der gebundenen Phagen, Amplifikation und weitere Screening-Runden können schließlich zur Isolierung hochaffiner Rezeptoren oder Liganden führen. Die Identität einer speziellen Verbindung aus der Bibliothek wird durch die

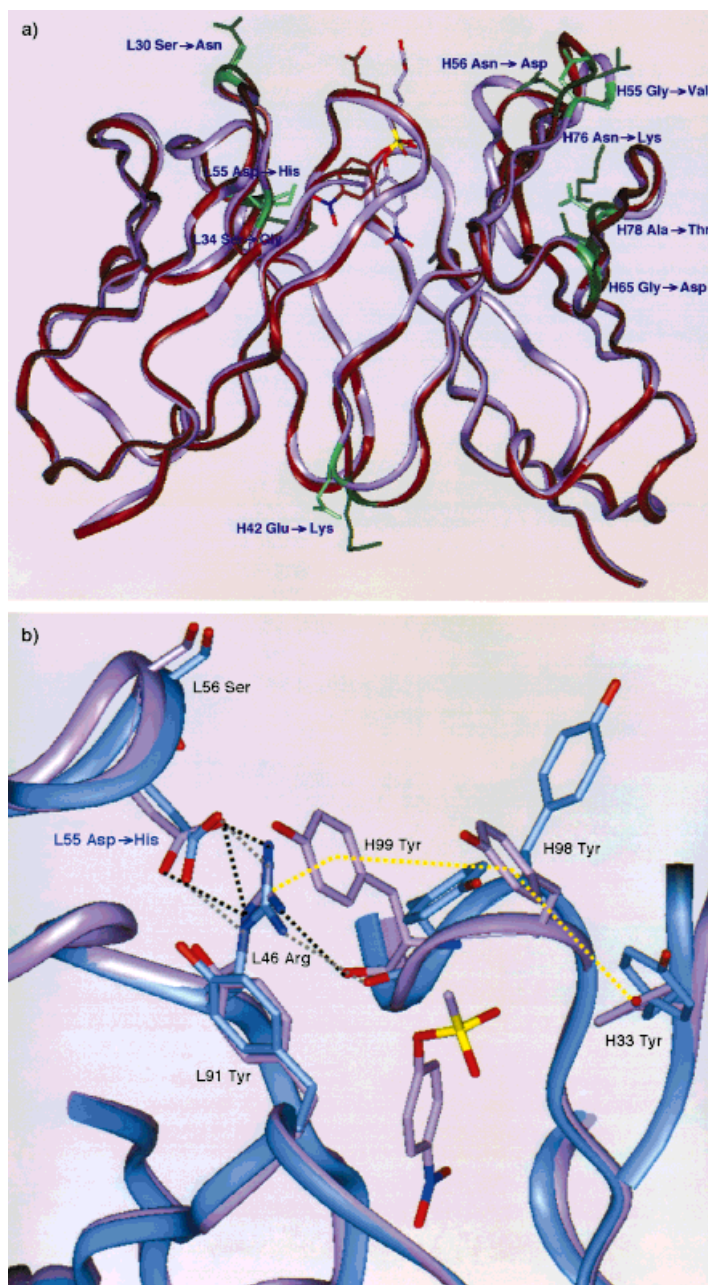


Abbildung 4. Konformative Diversität eines Antikörpers mit Esterase-Aktivität. Die Zugehörigkeit einer Aminosäure zur schweren oder leichten Kette ist durch die Buchstaben H bzw. L vor der Sequenznummer gekennzeichnet. a) Überlagerung der Strukturen des Keimbahn-Fab-Hapten-Komplexes (Fab = Antigen-bindendes Fragment eines Antikörpers; lila) und des affinitätsgerafften Fab-Hapten-Komplexes (rot). Somatic mutierte Aminosäurereste (X → Y) sind in Grün dargestellt. b) Überlagerung der Strukturen der Keimbahn-Fab-Domäne ohne Hapten (blau) und des Keimbahn-Fab-Hapten-Komplexes (lila). Graue gestrichelte Linien deuten die Wasserstoffbrückenbindungen in der Struktur der Keimbahn-Fab-Domäne ohne Hapten an, schwarze gestrichelte Linien die Wasserstoffbrückenbindungen im Keimbahn-Fab-Hapten-Komplex.<sup>[19]</sup> Die gelben gestrichelten Linien zeigen die Stapelwechselwirkung zwischen den Seitenketten dreier Tyrosinreste an („double T-stack“).

Sequenzierung der Phagen-DNA bestimmt. Mit Phagen-Display-Techniken wurden synthetische kombinatorische Bibliotheken von Antikörpergenen verschiedener Organismen (einschließlich des Menschen) oder von großen synthetischen Repertoires Antikörper-codierender Gene auf Phagenober-

flächen als einzelkettige F<sub>v</sub>- oder Fab-Fragmente exprimiert (Abbildung 5).<sup>[30, 31]</sup> Hochaffine Antikörper wurden isoliert, die viele unterschiedliche kleine Liganden und Makromoleküle einschließlich viraler Antigene und Tumorantigene binden sowie eine Reihe chemischer Reaktionen katalysieren.<sup>[24, 32]</sup> Ganz aktuell ist die Entwicklung von Methoden, die die direkte chemische Selektion von Katalysatoren aus Phagen-gebundenen Fab-Bibliotheken ermöglichen.<sup>[33]</sup> So wurde ein Antikörper mit Glycosidase-Aktivität mit einem auf den Mechanismus zugeschnittenen Inhibitor isoliert: Er produzierte ein reaktives Chinonmethid, das die Klone mit katalytischer Aktivität kovalent an eine Festphase knüpfte und so für weitere Amplifikations- und Selektionsrunden immobilisierte. In-vitro-Methoden zur Erzeugung von Antikörperdiversität werden vielleicht genauso wichtig werden wie die Hybridomatechnik zur Herstellung monoklonaler Antikörper für diagnostische, therapeutische und chemische Anwendungen. Phagen-Display-Techniken werden auch benutzt, um andere Proteingerüste zu identifizieren wie die Schleifen der Vier-Helix-Bündel-Proteine, die, wenn sie statistisch neu kombiniert werden, als Mini-Antikörper wirken könnten.<sup>[34]</sup>

Kürzlich haben wir ein allgemeines Schema für die In-vitro-Evolution von Proteinkatalysatoren entwickelt, das den Substratumsatz direkt mit einem Selektionsvorteil in einem biologisch amplifizierbaren System verbindet.<sup>[35]</sup> Das Substrat ist kovalent und ortsspezifisch über eine flexible Kette an das pIII-Hüllprotein eines filamentösen Phagen gebunden, der auch den Proteinkatalysator präsentiert. Die intramolekulare Umwandlung des Substrats in das Produkt ermöglicht es, aktive Katalysatoren aus einer Proteinbibliothek zu isolieren, entweder durch die Freisetzung oder durch die Bindung des Phagen an eine feste Phase oder durch das Abfangen des Produkts durch einen hierfür spezifischen Antikörper (Abbildung 6). Diese Methodik wurde unter Verwendung der *Staphylococcus*-Nuclease (SNase) als Modell entwickelt. Phagen, die SNase präsentieren, können aus einem bibliotheksähnlichen Ensemble von Phagen, die nichtkatalytische Proteine tragen, in einem einzigen Schritt bis zu tausendfach angereichert werden. Daneben sollte man mit diesem Ansatz natürliche Enzyme funktionell anhand ihrer Fähigkeit klonieren können, spezifische Reaktionen zu katalysieren (z. B. Glycosylübertragungen, sequenzspezifische Proteolyse oder Phosphorylierung, Polymerisation etc.), anstatt zur Klonierung auf Sequenz- oder Strukturhomologien mit bekannten Enzymen zurückgreifen zu müssen.

## 2.2. Diversität von Peptiden

Auf Phagenoberflächen präsentierte Bibliotheken linearer und cyclischer Peptide wurden benutzt, um hochaffine, selektive Liganden zu identifizieren, die viele biologische Rezeptoren wie Antikörper, Enzyme, Lektine, Zelloberflächenrezeptoren, Signaltransduktionsproteine und sogar Nucleinsäuren binden.<sup>[24]</sup> Eines der eindrucksvollsten Beispiele war die Isolierung eines aus 14 Aminosäuren bestehenden, cyclischen Peptids mit einer Disulfidbrücke und der Konsensussequenz YXCXXGPXTWXCXP (wobei X für ver-

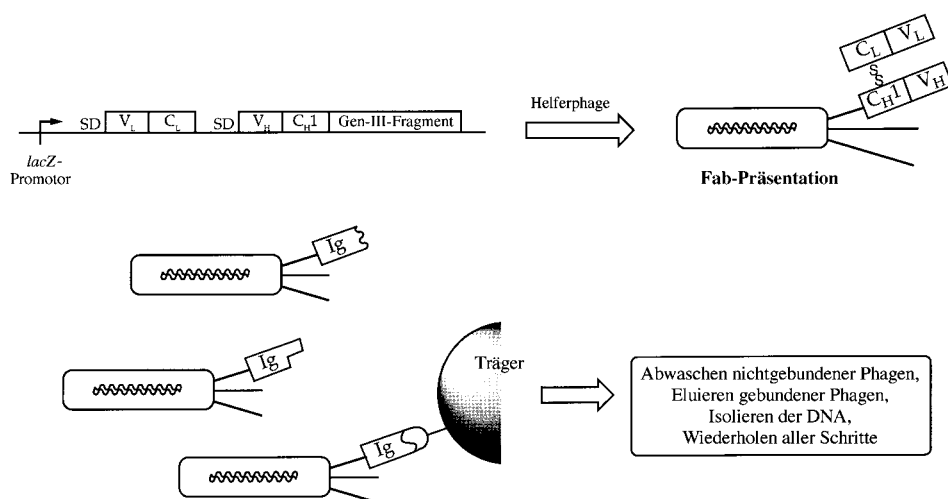


Abbildung 5. Phagen-Display-Technik und Durchmusterung einer Antikörperbibliothek. SD = Shine-Dalgarno-Sequenz (Ribosomenbindungsstelle auf prokaryontischer mRNA); Ig = Immunoglobulin-domäne.

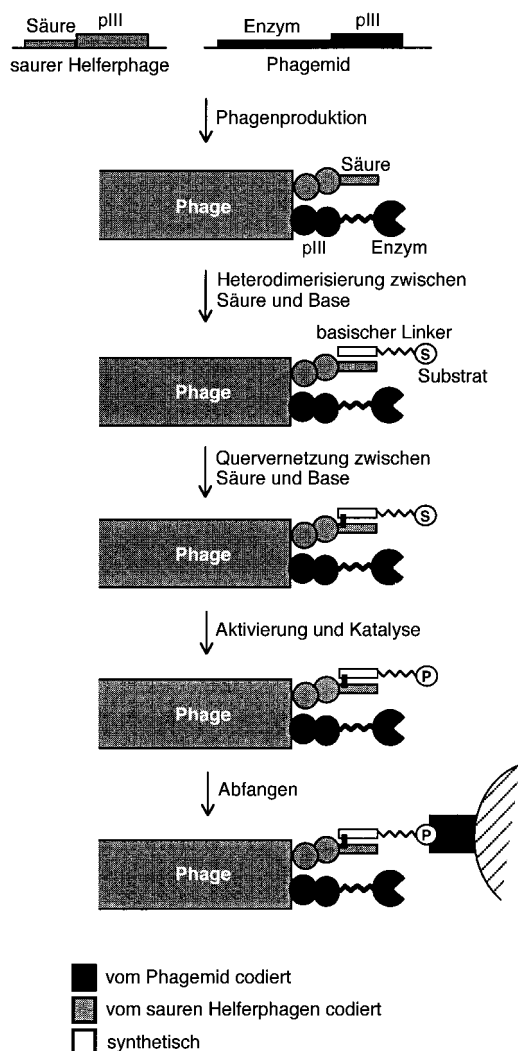


Abbildung 6. Ein allgemeines Schema für die In-vitro-Evolution von Proteinkatalysatoren.

schiedene Aminosäuren stehen kann), das an den Rezeptor für das Cytokin Erythropoietin (EPO) bindet und ihn aktiviert.<sup>[36]</sup> Die erfolgreiche Isolierung dieses Peptids wurde

ermöglicht durch Variationen in der Stringenz der Suche (indem die Bedingungen für Bindung und Elution variiert wurden) und durch die Herstellung und Durchmusterung von Bibliotheken, die von niederaffinen Peptiden abgeleitet worden waren. Das isolierte Peptid bindet die extrazelluläre Domäne des EPO-Rezeptors (EPOR) mit einem  $IC_{50}$ -Wert (Bindungskonstante) von ca.  $0.2 \mu M$  und stimuliert die Erythropoese in Mäusen über einen Signaltransduktionsweg, der mit demjenigen identisch zu sein scheint, der durch den natürlichen Liganden induziert wird. Die molekulare Grundlage für die Ago-

nisten-Aktivität dieses Peptids wurde durch die Analyse der dreidimensionalen Kristallstruktur des Komplexes von EPOR mit einem verwandten 20 Aminosäuren langen Peptid bestimmt (Abbildung 7).<sup>[37]</sup> Aus der Struktur läßt sich ab-

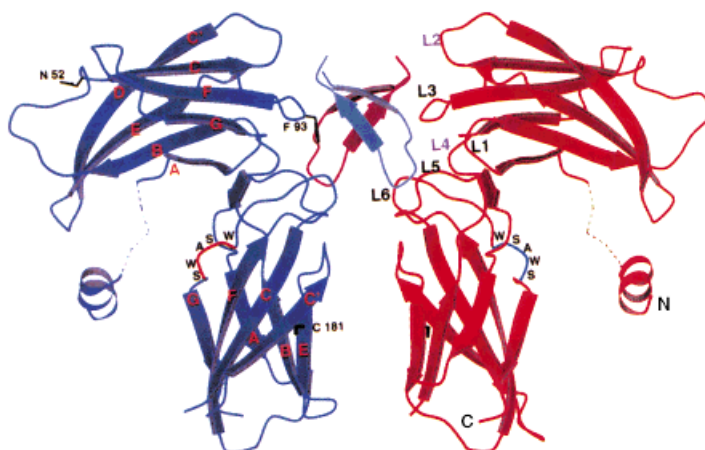


Abbildung 7. Struktur des Komplexes eines 20 Aminosäuren langen Peptids, das aus einer Phagenpeptid-Bibliothek isoliert wurde, mit der extrazellulären Domäne des EPO-Rezeptors im Kristall.<sup>[37]</sup>

leiten, daß das Peptid ein Dimer bildet, das aus einem viersträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt und zwei  $\beta$ -Schleifen vom Typ I besteht. Das Peptid induziert die fast perfekte zweifache Dimerisierung des Rezeptors durch eine Kombination aus hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen mit Abschnitten der vier Schleifenregionen des EPOR. Die erfolgreiche Isolierung dieses neuen Peptids, das wahrscheinlich ein minimales Epitop für die Aktivierung des EPOR definiert, legt nahe, daß Peptide auch viele andere Funktionen größerer Proteine übernehmen können.

Eine andere interessante Anwendung von Phagen-Display-Techniken ist die Bestimmung der Substratspezifitäten von Proteasen, indem man Peptidbibliotheken mit einem Testsystem durchsucht, das auf der Peptidhydrolyse beruht.<sup>[38]</sup> In

diesem Fall wird die aminoterminal Domäne des pIII-Proteins eines filamentösen Phagen über ein Peptid-Verbindungsstück mit zufälliger Sequenz mit einer Ankergruppe verknüpft. Die Phagen werden dann an eine feste Phase gebunden, die eine Affinität für den Anker aufweist. Bei Proteasebehandlung werden diejenigen Phagen von der festen Phase abgespalten, die Peptide mit guten Substrateigenschaften präsentieren. Nach mehreren Durchgängen von Bindung, Proteolyse und Amplifikation wurden Peptide mit sensitiven und mit resistenten Sequenzen bezüglich der Spaltung durch die Proteasen Subtilisin BPN' und Faktor X<sub>a</sub> identifiziert. Peptidbibliotheken, die auf Phagen präsentiert werden, wurden auch direkt mit Zellen zusammengebracht, um Peptidsequenzen zu finden, die an spezifische Zelltypen binden und/oder in sie eindringen. Solche Peptide bilden vielleicht einmal die Basis für intravenös applizierte Vektoren für die Gentherapie<sup>[39]</sup> oder für gewebsspezifische therapeutische Agentien.<sup>[40]</sup>

### 2.3. Weiterentwicklung der Proteinfunktion

Die natürliche Geschwindigkeit der genetischen Diversifizierung durch Punktmutationen kann durch UV-Bestrahlung, chemische oder enzymatische Mutagenese oder durch genetische Methoden wie die Verwendung von Mutationsstämmen erhöht werden. Proteinpopulationen mit zufälligen Mutationen, die durch diese Methoden hergestellt wurden, können mit einem geeigneten Such- oder Selektionsverfahren durchmustert werden, um Mutanten mit veränderten Eigenschaften zu isolieren. So wurden mit diesen Methoden die Substratspezifitäten von  $\beta$ -Galactosidase,<sup>[41]</sup> Ribitoldehydrogenase<sup>[42]</sup> sowie von Alkylamidasen<sup>[43]</sup> geändert.

In letzter Zeit sind auch einige sehr effiziente Methoden entwickelt worden, um umfangreichere und diversere Bibliotheken herzustellen, darunter die Kassettenmutagenese,<sup>[44, 45]</sup> die Polymerasekettenreaktion (PCR) mit erhöhter Fehlerhäufigkeit<sup>[46]</sup> und die Technik des „DNA shuffling“.<sup>[47, 48]</sup> Diese Methoden haben uns in die Lage versetzt, eine künstliche Evolution durch die beschleunigte Einführung von Diversität durchzuführen und Stabilität, katalytische Aktivität und Spezifität von Proteinen zu modifizieren.<sup>[49–54]</sup> Besonders beim DNA shuffling werden die kombinatorischen Prozesse

des Immunsystems und der natürlichen Evolution nachgeahmt, indem die zufälligen Punktmutationen eines Gens mit der homologen Rekombination in vitro kombiniert werden, so daß Bibliotheken von Mutanten unterschiedlicher Struktur entstehen (Abbildung 8). Dies ermöglicht es, große Sequenzbereiche effizienter nach Mutationen zu durchsuchen, die die Bindungs- oder die Katalyseeigenschaften additiv oder sogar kooperativ verstärken. Im direkten Vergleich mit Prozessen wie der PCR mit erhöhter Fehlerhäufigkeit, die vorteilhafte Mutationen ohne Rekombinationsvorgänge schrittweise aufbauen, konnten mit der Methode des DNA shuffling Proteine mit gesteigerten Aktivitäten in weniger Selektionsrunden hergestellt werden.<sup>[47]</sup> Das DNA shuffling wurde bei einigen Proteinen angewandt, um ihre Eigenschaften zu verbessern, z.B. bei Glycosidasen,  $\beta$ -Lactamasen, Antikörpern, beim Green fluorescent protein (GFP) und bei Wachstumsfaktoren.<sup>[48]</sup> Beispielsweise erhielt man nach drei Cyclen DNA shuffling und zwei Rückkreuzungszyklen (Rekombination mit dem Wildtypgen) bei einer Selektion mit steigenden Konzentrationen des Antibiotikums Cefotaxim eine  $\beta$ -Lactamase mit sechs Mutationen, die der Zelle zu einer 32000fach höheren Resistenz gegen das Antibiotikum verhalf.<sup>[47]</sup> Die Mutationen sind wie die somatischen Mutationen in affinitätsgereiften Antikörpern über das ganze Protein verteilt, so daß das rationale Design von mutierten Proteinen schwierig, wenn nicht unmöglich ist.

Die Technik des DNA shuffling wurde auf die Evolution eines „orthogonalen“ Paares aus Suppressor-tRNA und Aminoacyl-tRNA-Synthetase angewandt, mit dem in Proteine in vivo Aminosäuren mit neuen strukturellen oder elektronischen Eigenschaften, die nicht im genetischen Code verankert sind, ortsspezifisch eingebaut werden können.<sup>[55]</sup> Die orthogonale Suppressor-tRNA wurde konstruiert, indem anhand von Analysen der Kristallstruktur des Glutaminyl-tRNA-Aminoacylsynthetase(GlnRS)-tRNA<sub>2<sup>Gln</sup></sub>-Komplexes und früherer biochemischer Daten ortsspezifisch acht Mutationen in die tRNA<sub>2<sup>Gln</sup></sub> eingeführt wurden. Die resultierende tRNA erfüllt die Mindestanforderungen für den Einbau einer nichtnatürlichen Aminosäure: Sie wird durch keine endogene *E.-coli*-Aminoacyl-tRNA-Synthetase einschließlich der GlnRS acyliert und funktioniert effizient bei der Proteintranslation. Durch wiederholte Cyclen aus DNA shuffling und Oligonucleotid-gesteuerter Mutagenese wurde dann eine

große Bibliothek von ortsspezifischen und zufälligen Mutanten der GlnRS hergestellt. Diese Bibliothek wurde auf mutierte Enzyme selektiert, die die veränderte tRNA in vivo effizient mit einem Glutaminyrest acylieren, was auf der Suppression eines Amber-Codons (Amber-Codon = Terminations-Codon UAG) im *lacZ*-Gen beruht (Abbildung 9). Auf diese Weise wurde ein „orthogonales“ mutiertes GlnRS/tRNA-Paar gefunden, das in vivo aktiv ist.

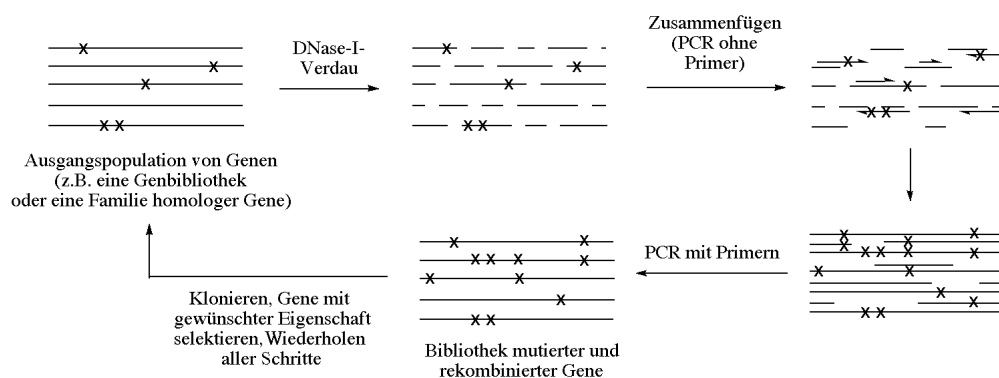


Abbildung 8. Beim DNA shuffling wird ein Gen zufällig in diskrete Teile fragmentiert, die Fragmente durch eine PCR ohne Primer neu zusammengesetzt und über eine abschließende PCR mit Primern amplifiziert. Die mutierten und rekombinierten Gene werden anschließend kloniert.<sup>[47]</sup>



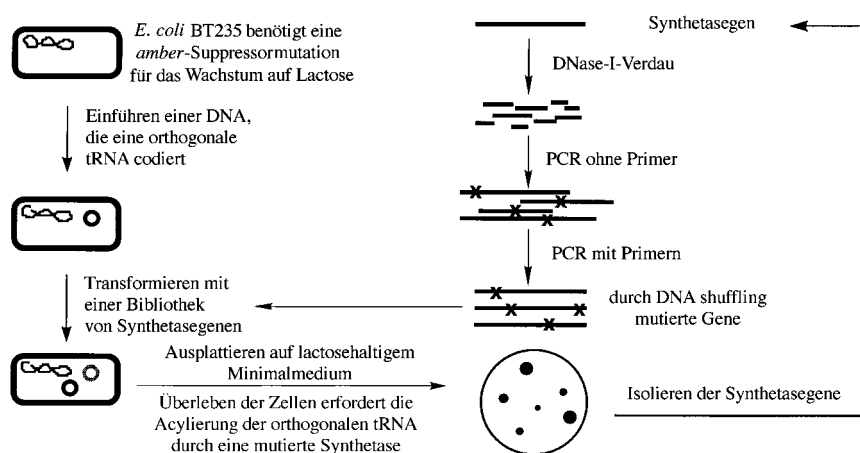


Abbildung 9. Selektion eines orthogonalen GlnRS/tRNA-Paares aus einer Bibliothek von GlnRS-Mutanten.<sup>[55]</sup>

Gegenwärtig wird mit DNA shuffling und Kassettenmutagenese nach Synthetasevarianten gesucht, die orthogonale tRNAs mit neuartigen Aminosäuren acylieren.<sup>[56]</sup> Natürlich spielen sowohl Strukturinformationen als auch Diversität eine kritische Rolle beim Entwurf dieser Experimente.

Eine Vielzahl anderer Proteine mit veränderten Bindungsaffinitäten und -spezifitäten, darunter Wachstumshormone<sup>[57]</sup> und DNA-bindende Proteine,<sup>[58–60]</sup> sind aus umfangreichen Bibliotheken von Mutanten isoliert worden. So wurde das Zinkfinger-Motiv des DNA-bindenden Proteins Zif268 auf der Oberfläche eines filamentösen Phagen exprimiert, und Bibliotheken von Mutanten wurden gegen DNA-Duplex-Sequenzen, die Wildtyp- und Mutanten-Bindungsstellen enthielten, selektioniert.<sup>[61]</sup> Daraus wurde ein DNA-bindendes Peptid gewonnen, das drei Zinkfinger-Motive enthält und an eine singuläre, neun Basenpaare lange Region eines BCR-ABL-Fusions-Onkogens mit einer Dissoziationskonstante  $K_d$  von  $6.2 \times 10^{-7}$  M bindet. Seine Bindungsaffinität für genomische BCR- und C-ABL-Sequenzen (die teilweise nur in einem einzigen Basenpaar abweichen) ist um eine Größenordnung geringer. Die Bindung des Peptids an das Zielonkogen in transformierten Zellen *in vitro* führte zur Blockade der Transkription. Auch andere Methoden als die Phagen-Display-Technik können genutzt werden, um DNA-bindende Proteine mit veränderten Spezifitäten herzustellen. Zum Beispiel wurden Helix-Schleife-Helix- und Leucin-zipper-Proteine mit neuen Spezifitäten aus umfangreichen Mutantenbibliotheken hergestellt, indem man die Selektion auf der Störung der Transkription von Antibiotika-Resistenzgenen aufbaute.<sup>[62–63]</sup> Untersuchungen dieser Art sind auch hilfreich, um die Erkennungsregeln zwischen den Aminosäuresequenzen DNA-bindender Proteine und deren jeweiligen Erkennungsstellen aufzuklären.

Große Bibliotheken mutierter Proteine wurden auch benutzt, um die Faktoren zu untersuchen, die Struktur und Stabilität bestimmter Proteinfaltungsmuster beeinflussen. Durch Kassettenmutagenese wurden zum Beispiel im hydrophoben Zentrum der N-terminalen Domäne des  $\lambda$ -Phagen-Repressorproteins sieben Aminosäuren nach dem Zufallsprinzip ausgetauscht.<sup>[64]</sup> Als man nach funktionellen Repres-

sorvarianten (phagenresistenten Transformanten) suchte, zeigte sich, daß viele unterschiedliche Sequenzen einen stabilen Kern bilden können. Am wichtigsten für eine spezielle mit dem Wildtyp kompatible Sequenz ist ihre Hydrophobie, wobei das van-der-Waals-Volumen des Kerns und die sterischen Wechselwirkungen zwischen den Resten die Zahl der funktionellen Sequenzen weiter einschränken. Die Sequenzelemente, die die Struktur von Vier-Helix-Bündeln bestimmen, sind untersucht worden.<sup>[65]</sup> Eine Bibliothek von Cytochrom-*b*<sub>562</sub>-Mutanten wurde hergestellt, in der Aminosäuren an definierten Positionen durch eine der hydrophoben Aminosäuren

Phe, Leu, Ile, Met oder Val oder durch eine der hydrophilen Aminosäuren Glu, Asp, Lys, Asn, Gln oder His ersetzt wurden, so daß ein binäres Muster von unpolaren und polaren Aminosäuren entstand. Die bakterielle Expression von löslichem proteaseresistentem Protein wurde spektrophotometrisch anhand der Hämabsorption verfolgt. 29 von 48 untersuchten Sequenzen führten nach der Expression zu einem Protein, das löslich und gegen intrazellulären Abbau resistent war. Zwei Proteine, die durch Harnstoff-Denaturierungsexperimente näher charakterisiert wurden, waren um 3.7 kcal mol<sup>-1</sup> und 4.4 kcal mol<sup>-1</sup> relativ zur ungefalteten Form stabilisiert. Eine ähnliche Strategie wurde bei einer Zufallssequenz von 80–100 Aminosäuren verfolgt, die aus Gln (Einbuchstabencode: Q), Leu (L) und Arg (R) besteht. Die Expression dieser „QLR-Proteine“ in Bakterien ergab, daß 5% der Sequenzen in Mengen gebildet wurden, die leicht nachzuweisen waren. Mehrere der charakterisierten Proteine wiesen Charakteristika nativer Proteine wie  $\alpha$ -Helices und einen hochkooperativen Faltungsvorgang auf, so daß man vermuten kann, daß gefaltete Proteine in Bibliotheken mit zufälligen Aminosäuresequenzen häufig vorkommen.<sup>[66]</sup>

Die Beziehung zwischen Proteinsequenz und -struktur wurde ebenfalls mit Bibliotheken untersucht, allerdings mit solchen, die weder *in vivo* noch *in vitro* hergestellt, sondern mit dem Computer erzeugt wurden. Kürzlich wurde ein Design-Algorithmus, der auf chemischen Potentialfunktionen sowie auf stereochemischen Einschränkungen (restraints) basiert, dazu verwendet,  $1.9 \times 10^{27}$  Aminosäuresequenzen nach solchen zu durchsuchen, die ein  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ -Zinkfinger-Faltungsmotiv einnehmen. Die gefundene Sequenz (FSF-1) hat wenig oder keine Ähnlichkeit mit irgendeiner bekannten Proteinsequenz. Das FSF-1-Protein wurde synthetisiert, und die anschließende NMR-spektroskopische Untersuchung in Lösung ergab eine kompakte Struktur, die hervorragend mit der gewünschten Zielstruktur übereinstimmt. Das Experiment verdeutlicht den potentiellen Nutzen von Computermethoden zur Durchmusterung kombinatorischer Bibliotheken, die um zehn oder mehr Größenordnungen umfangreicher sind als alle jemals im Labor hergestellten.<sup>[67]</sup>

### 3. Diversität von Nucleinsäuren

Kombinatorische Methoden haben eine wichtige Rolle gespielt, als die Vielfalt der Funktionen der Nucleinsäuren und deren mögliche Rolle in der präbiotischen Welt untersucht wurden. Dazu wurden Bibliotheken mit bis zu  $10^{15}$  zufälligen einzelsträngigen RNA- oder DNA-Sequenzen durch eine Kombination von chemischer Synthese, PCR und (im Falle der RNA) Run-off-Transkription hergestellt.<sup>[68–71]</sup> Diese Bibliotheken werden dann auf einzelne Moleküle durchsucht, die entweder 1) spezifische Liganden binden (mit affinitätsbasierten Methoden) oder die 2) spezifische chemische Transformationen katalysieren (mit In-vitro-Selektions- oder Suchverfahren). Nach der Amplifikation einer angereicherten Population von Molekülen mit Bindungs- oder Katalyseeigenschaften wurden weitere Selektionsrunden angeschlossen. So wurden Nucleinsäuren erhalten, die selektiv kleine Moleküle, Proteine und Nucleinsäuren binden, und solche, die eine Reihe von Reaktionen katalysieren, von der Übertragung von Phosphoryl- und Acylgruppen bis zu Metallierungen und pericyclischen Reaktionen.

#### 3.1. Selektion auf Bindungseigenschaften

Einzelsträngige RNA- und DNA-Oligomere (oder Aptamere) sind aus umfangreichen, zufälligen Oligonucleotidbibliotheken isoliert worden, die selektiv zahlreiche Moleküle binden, darunter T4-DNA-Polymerase, humanes Immunschwäche-Virus (HIV), HIV-Rev-Protein, Thrombin, Aminosäuren, organische Farbstoffe und Cofaktoren.<sup>[68, 69, 72–78]</sup> So wurde beim Screening einer Bibliothek aus  $10^{13}$  Transkripten mit an einer Agarosematrix immobilisiertem ATP eine RNA isoliert, die Adenosin mit einer Dissoziationskonstante  $K_d$  von  $0.7\ \mu\text{M}$  bindet.<sup>[74]</sup> Die Struktur einer aus 40 Nucleotiden bestehenden RNA, die das Konsensusmotiv für ATP-Bindung enthält und mit AMP (welches mit ähnlicher Affinität wie ATP bindet) komplexiert ist, wurde durch NMR-Spektroskopie in Lösung bestimmt.<sup>[79]</sup> Das AMP-Molekül bindet an einer „GNRA-ähnlichen“ (N = irgendeine Nucleobase, R = Purin-Base) Haarnadelschleife,<sup>[80]</sup> wobei das intercalierte Adenin eine A·G-Fehlpaarung eingeht und die 2'- und 3'-Hydroxygruppen der Ribose Wasserstoffbrückenbindungen mit der RNA bilden. Durch die Bindung von AMP wird eine Konformationsänderung an der ATP-Bindungsstelle der RNA induziert. Aus den Oligonucleotidbibliotheken wurden auch RNA-Aptamere isoliert, die das Purin Theophyllin mit hoher Affinität binden ( $K_d = 0.1\ \mu\text{M}$ ). Diese Aptamere binden nicht stark an Coffein ( $K_d = 3500\ \mu\text{M}$ ), das sich von Theophyllin nur durch eine Methylgruppe am Stickstoffatom N7 unterscheidet.<sup>[81]</sup> Solche Experimente zeigen, daß RNA – ebenso wie Proteine – viele kleine Moleküle mit extrem hoher Spezifität durch eine Kombination aus van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischen Wechselwirkungen binden kann.

Auch Aptamere, die selektiv an Makromoleküle wie Proteine und Nucleinsäuren binden, sind isoliert worden. So fand man einzelsträngige RNAs, die selektiv an bestimmte Se-

quenzabschnitte auf doppelhelicaler DNA durch Tripelhelixbildung über Hoogsteen-Basenpaarung binden.<sup>[82]</sup> Einzelsträngige DNAs, die an Thrombin über eine hochkonservierte, 14–17 Nucleotide umfassende Guanin-reiche Sequenz binden, wurden ebenfalls gefunden. In diesem Fall betrug die Bindungsaffinität 25–200 nM, und verschiedene Aptamere hemmten die Thrombin-katalysierte Bildung von Fibrinklumpen in vitro in nanomolaren Konzentrationen.<sup>[77]</sup>

#### 3.2. RNA-Katalyse

Die früheste Anwendung von In-vitro-Selektionsverfahren zur Isolierung von RNAs mit neuen Phänotypen aus einer großen Zahl von Mutanten geht auf Spiegelman et al. zurück.<sup>[83]</sup> In seinen Versuchen wurde die Q $\beta$ -Replikase, eine matrizenspezifische RNA-Polymerase, in einem darwinistischen Selektionssystem benutzt, um eine strukturierte RNA zu isolieren, die eine verringerte Affinität für den intercalierenden Farbstoff Ethidiumbromid aufwies. Die Mutante entstand nach sequentiellen Mutationen im Verlauf des Experiments und war nicht etwa eine im ursprünglichen RNA-Pool bereits vorhandene Variante.

Solche In-vitro-Selektionen zur Isolierung von RNAs mit neuen katalytischen Aktivitäten wurden entweder mit Bibliotheken durchgeführt, die durch Mutagenese natürlich vorkommender Ribozyme hergestellt worden waren, oder mit synthetischen Bibliotheken von RNA-Molekülen mit zufälligen Sequenzen. Das *Tetrahymena*-Ribozym der Gruppe I wurde zum Beispiel als Ausgangspunkt gewählt, um ein neues Ribozym zu isolieren, das DNA spaltet.<sup>[70, 71]</sup> Das Selektionsverfahren beruhte darauf, daß das Ribozym ein alternatives DNA-Substrat phosphorylierte, wobei neun Basen an die 3'-terminale Hydroxygruppe des Ribozyms addiert wurden (Abbildung 10). Durch diese 3'-terminale Verlängerung wurde die erfolgreiche Anlagerung eines Amplifikationsprimers möglich, der zur Vervollständigung des Selektionszyklus erforderlich war. Aus einem viel größeren Mutantenpool

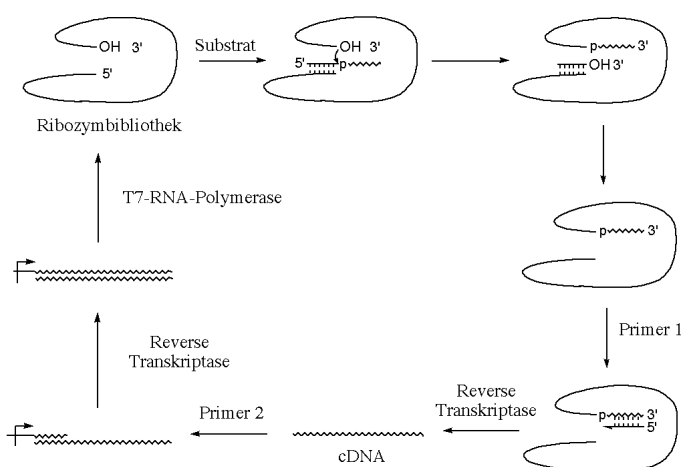


Abbildung 10. Selektion einer *Tetrahymena*-Ribozymmutante, die ein alternatives DNA-Substrat umsetzt.<sup>[70, 71]</sup> Die Wellenlinien symbolisieren die DNA-Stränge.

( $10^{13}$ ) wurden Varianten isoliert, die die Reaktion unter physiologischen Bedingungen bis zu 65mal schneller katalysieren als das Wildtyp-Ribozym. Andere Selektionsmethoden unter Verwendung von natürlich vorkommenden Ribozymen führten zu RNAs, die sich selbst kopierten<sup>[84]</sup> oder andere Metallionen-Abhängigkeiten aufwiesen.<sup>[85]</sup>

Eines der eindrucksvollsten Beispiele für die Selektion von RNA-Katalysatoren aus komplexen Bibliotheken mit zufälligen Sequenzen war die Isolierung einer RNA-Ligase, die auch als RNA-Polymerase wirken kann.<sup>[86, 87]</sup> Ausgehend von einem Pool von etwa  $10^{15}$  einzelnen Transkripten wurden schrittweise Amplifikations- und Selektionsrunden durchgeführt, die auf der Fähigkeit des Ribozyms beruhten, seine eigene 5'-terminale Triphosphatgruppe an ein Oligonucleotidsubstrat zu ligieren, das 5'-terminal eine Ankergruppe („tag“) trägt (Abbildung 11). Isoliert wurde ein Ribozym, das die Knüpfung einer 3'-5'-Phosphodiesterbindung mit  $k_{\text{cat}} > 1 \text{ s}^{-1}$  katalysiert;<sup>[86, 87]</sup> wurde es an einen Matrizenstrang gebunden, konnte diese RNA-Ligase einen RNA-Primer um bis zu sechs Nucleotide matrizenabhängig verlängern.<sup>[88]</sup> Nucleotide, die komplementär zur Matrize sind, werden bis zu 1000mal effizienter als fehlgepaarte Nucleotide addiert. Obwohl noch eine Reihe von Hindernissen bestehen, um eine RNA-Replicase herzustellen (z.B. die Strangtrennung nach der Polymerisation, unspezifische Bindung von Matrize und Primer, Fehlerhäufigkeit), zeigen diese Experimente das Potential, das in der Entwicklung von RNAs steckt, die Reaktionen katalysieren, die vielleicht in einer präbiotischen Welt notwendig waren.

Selektionsverfahren und affinitätsvermittelte Methoden sind auch eingesetzt worden, um die Anwendungsmöglichkeiten katalytischer RNAs auf andere Reaktionsklassen wie Isomerisierungen, C-C-Bindungsknüpfungen, Metallierungen und Alkylierungen auszuweiten. Als man z.B. dieselben Annahmen der Theorie des Übergangszustandes zugrunde-

legte, die auch bei der ersten Gewinnung katalytischer Antikörper Beachtung fanden, konnte man eine RNA isolieren, die die Isomerisierung eines überbrückten Biphenylsubstrates zu seinem Diastereomer katalysierte (Abbildung 12).<sup>[89]</sup> In diesem Fall wurde eine Bibliothek von  $10^{13}$

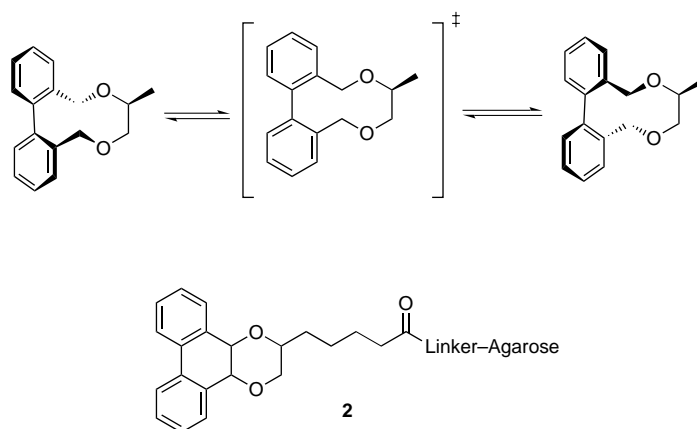


Abbildung 12. Atropisomerisierung von diastereomeren 1,1'-Biphenylen. Die Verbindung **2** ist ein Analogon des Übergangszustandes dieser Reaktion.<sup>[89]</sup>

nach dem Zufallsprinzip hergestellten RNA-Molekülen auf ihre Bindungsaffinität zum planaren, an einem festen Träger immobilisierten Analogon **2** des Übergangszustandes der Biphenyl-Isomerisierung durchsucht. Mit einem ähnlichen Ansatz wurden einzelsträngige RNAs und DNAs hergestellt, die die Metallierung von Porphyrin katalysieren.<sup>[90, 91]</sup> Wenig später wurden mit einem Selektionsverfahren, das auf der kovalenten Verknüpfung eines Ribozyms mit einem Träger beruhte, RNAs hergestellt, die die Diels-Alder-Reaktion zwischen einem Dien und einem Dienophil katalysieren.<sup>[92]</sup>

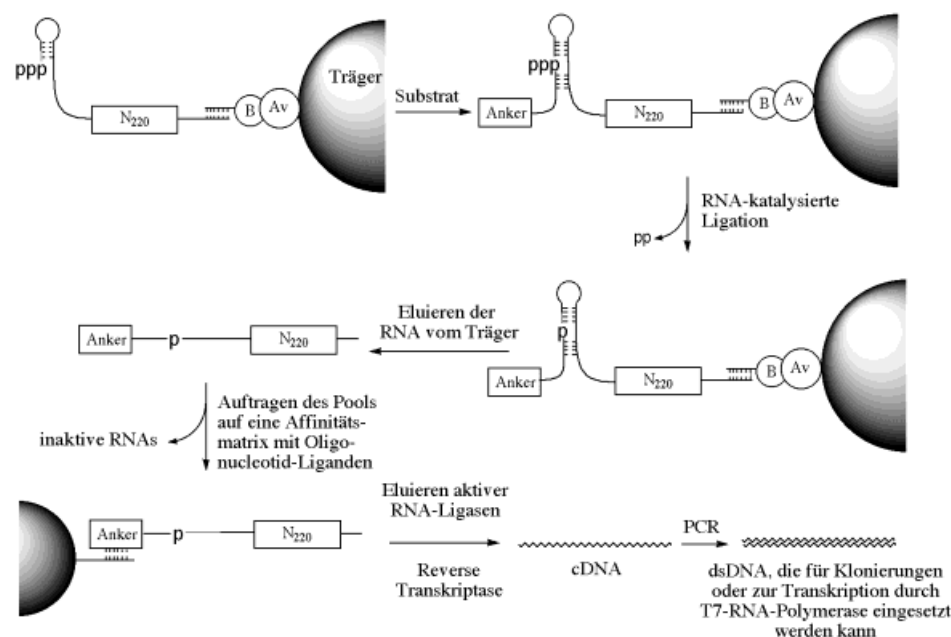


Abbildung 11. Selektionsverfahren für die Herstellung einer RNA-Ligase.<sup>[86, 87]</sup> Die Abkürzungen B und Av stehen für Biotin bzw. Avidin.

### 3.3. Andere Anwendungen

Viele andere neue Einsatzmöglichkeiten von Nucleinsäurebibliotheken werden laufend publiziert, darunter auch In-vivo-Anwendungen. In einem Fall werden genomische Expressionsbibliotheken zur Immunisierung benutzt, eine Technik, die sich die genetische Immunisierung (Immunisierung mit dem Gen, das das Protein-Antigen codiert, anstatt mit dem Protein selbst) zunutze macht sowie die Tatsache, daß alle Antigene eines Pathogens in seiner DNA codiert sind.<sup>[93]</sup> Tatsächlich wurde gezeigt, daß sogar partielle Expressionsbibliotheken aus der DNA von *Mycoplasma pulmo-*

nis, einem natürlichen Pathogen in Nagern, Schutz gegen den Erreger bieten. Nucleinsäurebibliotheken wurden auch in vivo eingesetzt, um cis-wirkende Sequenzabschnitte zu identifizieren, die RNAs in den Kern von *Xenopus-laevis*-Oocyten dirigieren.<sup>[94]</sup> Sicherlich werden Bibliotheken von Nucleinsäuren ebenso wie die von Peptiden und Proteinen viele Anwendungen finden bei der Suche nach neuen biologischen und chemischen Funktionen sowie bei unseren Bemühungen, komplexe biologische Prozesse besser zu verstehen.

#### 4. Diversität bei der chemischen Synthese

Der Biosyntheseapparat, mit dem lebende Zellen diverse Populationen von Molekülen herstellen, ist auf spezifische Klassen chemischer Verbindungen beschränkt; zu diesen gehören oligomere Moleküle wie Polypeptide, Oligonucleotide und Polysaccharide und eine Reihe von Naturstoffen, z. B. die Polyketide. Außerdem werden diese Verbindungen aus einer begrenzten Auswahl von Bausteinen gebildet. Durch die Entwicklung von Methoden zur Herstellung umfangreicher, diverser Populationen synthetischer Moleküle wurde dieser Ansatz auf neue Klassen von Verbindungen mit einer breiteren Palette chemischer, biologischer und physikalischer Eigenschaften ausgedehnt.

##### 4.1. Verfahren zum Hervorbringen von Diversität bei der Synthese

Nahezu alle Ansätze, große Populationen unterschiedlicher Moleküle zu synthetisieren und zu durchsuchen, basieren auf der Methode der Festphasensynthese nach Merrifield.<sup>[95]</sup> Die ersten Arbeiten konzentrierten sich auf Polypeptide, die schnell durch schrittweise Synthese aus einem diversen Satz allgemein vorkommender und nichtnatürlicher Aminosäuren aufgebaut werden können. Zunächst wurden Methoden entwickelt, mit denen einfach die parallele Synthese zahlreicher diskreter Peptidsequenzen möglich war, indem man entweder mit Polyacrylsäure beschichtete Polyethylenstifte benutzte, die im Mikrotiterformat angeordnet waren,<sup>[96]</sup> oder später Harze, die in porösen Polypropylenbeuteln eingeschlossen waren („Teebeutel“-Technik).<sup>[97]</sup>

Danach wurden Versuche unternommen, noch diversere Populationen von Molekülen herzustellen, indem man Sätze von Bausteinen in allen möglichen Kombinationen miteinander verknüpfte und dabei wiederum die kombinatorischen Strategien der Natur nachahmte, um molekulare Diversität effizient zu erzeugen. Dies geschah entweder durch die Herstellung von Bibliotheken, bei denen die einzelnen Komponenten räumlich voneinander getrennt sind, oder von Mischungen von Harzkügelchen, von denen jedes eine diskrete Verbindung oder eine kleine Zahl verwandter Verbindungen trägt. Ein Beispiel für den ersten Ansatz ist die „mimotope“-Strategie, nach der Peptide wiederum auf Stiften synthetisiert werden. In diesem Fall werden aber zufällig Aminosäurereste aus Mischungen aktivierter Aminosäuren eingebaut, so daß alle möglichen Peptidsequenzen entstehen.<sup>[98, 99]</sup> Zwei Positionen in einem Peptid aus  $n$  Aminosäuren

werden dann iterativ definiert durch die auf vielen Stäbchen erfolgende Synthese von 400 diskreten Mischungen, von denen jede alle möglichen  $(n-2)$  Aminosäuren langen Peptidsequenzen mit einer der 400 möglichen Paaren aus den Standard-L-Aminosäuren enthält. Diese Technik wurde in Verbindung mit ELISA-Screeningmethoden benutzt (ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay), um Peptide zu identifizieren, die selektiv an Antikörper und andere Rezeptoren binden.

Bei einer zweiten Methode wird für die räumlich adressierbare Synthese kombinatorischer Bibliotheken die Photolithographie zusammen mit der Festphasensynthese angewandt, um Anordnungen von Peptiden in hoher Dichte auf einer Glasunterlage herzustellen.<sup>[100, 101]</sup> Belichtet man nun ausgewählte Regionen der Glasunterlage, die die wachsenden Peptidketten trägt, deren terminale Aminogruppen durch eine photolabile Gruppe geschützt sind, kann man damit die räumliche Verteilung individueller Kupplungsschritte für Aminosäuren kontrollieren (Abbildung 13). Bei Verwendung

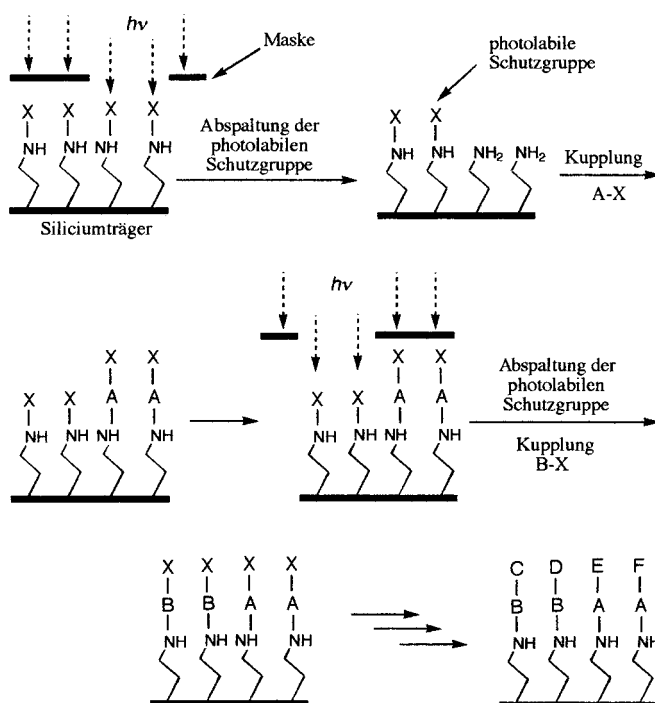


Abbildung 13. Lichtgesteuerte Synthese kombinatorischer Anordnungen.

von  $n$  binären Masken, durch die die Hälfte der Oberfläche in jedem Kupplungsschritt photolysiert wird, können  $2^n$  Verbindungen synthetisiert werden. Die Abfolge von Masken und Kupplungsschritten definiert die Identität des Peptids an jedem Syntheseort. Die Bindung von fluoreszenzmarkierten Rezeptoren an die Oberfläche wird durch Fluoreszenzemission nachgewiesen. Diese Technik wurde zwar ursprünglich für die Peptidsynthese entwickelt, doch hat sich herausgestellt, daß sie sehr nützlich für die Herstellung sehr dicht beladener Oligonucleotidfelder ist (siehe unten).

Ein anderer Ansatz für die Herstellung kombinatorischer Bibliotheken von Peptiden ist die Methode des Teilens und Synthetisierens („split synthesis“).<sup>[102–104]</sup> Dabei wird der



Harzträger in  $n$  gleiche Teile aufgeteilt und jede Fraktion mit einem einzelnen aktivierten Monomer (oder in manchen Fällen mit mehreren Monomeren) gekuppelt, bevor die Fraktionen wieder vereinigt werden (Abbildung 14). Eine

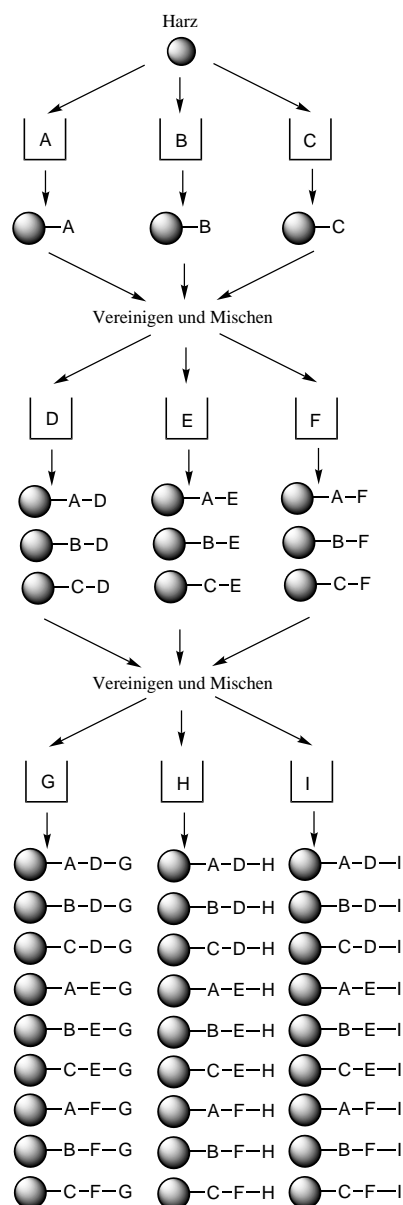


Abbildung 14. Herstellung einer kombinatorischen Bibliothek nach der Methode des Teilens und Synthetisierens.

Iteration über  $x$  Cycles ergibt eine stochastische Population von  $n^x$  Peptiden. Dieser Ansatz wurde in Verbindung mit der Teebeutel-Technik und unter Verwendung von Harzkügelchen, die nichtabsplattbare Linker tragen, dazu benutzt, um große kombinatorische Bibliotheken mit bis zu 50 Millionen verschiedenen Sequenzen herzustellen. Da dabei aber Mischungen von Harzkügelchen entstehen, benötigt man für diese Technik auch Methoden, um die Sequenz eines hochaffinen Liganden zu bestimmen, der mit einem auf der Affinität basierenden Test isoliert wurde.

Um die Identität von Peptidliganden zu bestimmen, die aus einem Pool zufälliger Sequenzen isoliert worden sind, wurden mehrere Strategien entwickelt. Dazu gehören Methoden, die

auf der schrittweisen „mimotopen“ Entschlüsselung beruhen (siehe oben),<sup>[105]</sup> oder auch die direkte Peptid-Mikrosequenzierung nach Edman, für die die Harzkügelchen ca. 80–100 pmol Peptid tragen müssen.<sup>[106]</sup> Auch die Massenspektrometrie kann zur Sequenzierung eines Peptids benutzt werden, wenn bei jedem Syntheseschritt ein kleiner Teil der wachsenden Polypeptidkette blockiert wird, so daß bei jedem Cycle bis zum Erreichen der vollständigen Peptidlänge eine kleine Menge an verkürztem Peptid anfällt.<sup>[107]</sup>

Es sind einige Methoden für die Herstellung von Peptidbibliotheken auf Harzkügelchen entwickelt worden, bei denen an jedes Kügelchen ein molekulares „Etikett“ angehängt wird, das die schnelle und empfindliche Identifizierung des jeweiligen Polypeptids ermöglicht.<sup>[108–111]</sup> Diese Etiketten werden gleichzeitig mit jedem Kupplungsschritt für ein Monomer an die Kügelchen gebunden. Die Markierung muß also unter den Bedingungen der Polymersynthese und des Entschützens stabil sein, das Anhängen des Etiketts darf die Polypeptidsynthese nicht beeinträchtigen, und die Markierungsgruppe muß einen ausreichenden Informationsgehalt tragen, um mit hoher Empfindlichkeit nachgewiesen zu werden. Mehrere Markierungsgruppen sind inzwischen entwickelt worden (Abbildung 15), darunter Oligonucleotide,

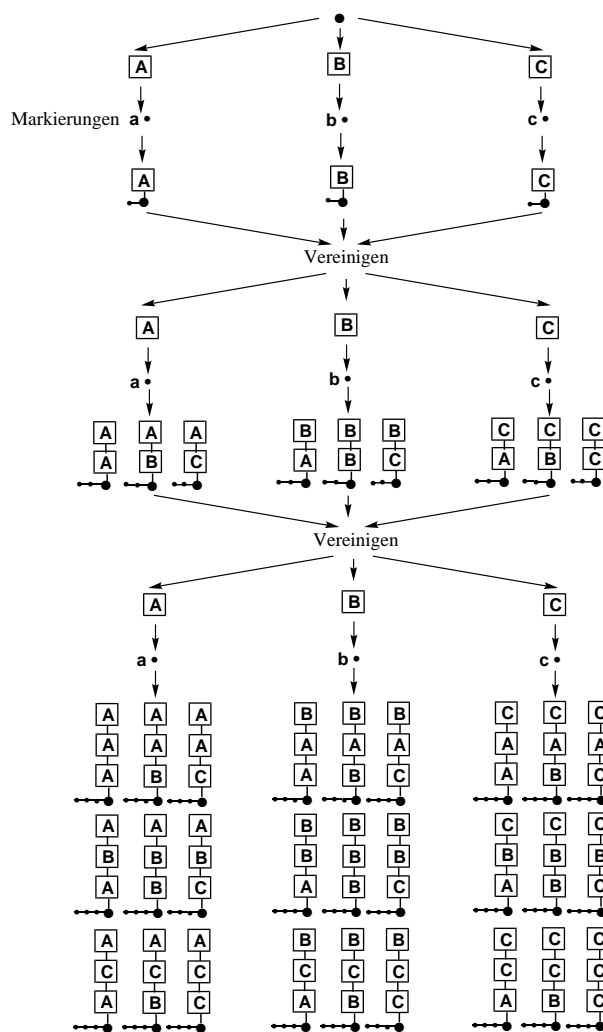


Abbildung 15. Die Verwendung molekularer „Etiketten“ zur Identifizierung von Verbindungen aus einer Bibliothek.<sup>[108–111]</sup>

die durch PCR-Amplifikation und DNA-Sequenzierung nachgewiesen werden können,<sup>[109]</sup> oder ein Satz verwandter halogener Gruppen, die durch Kapillargaschromatographie mit Elektroneneinfang-Detektion getrennt und nachgewiesen werden können.<sup>[111]</sup> Die hohe Nachweisempfindlichkeit beider Markierungsgruppen sollte die Synthese chemischer Bibliotheken von zunehmender Diversität erleichtern.

Mit den beschriebenen Techniken wurden natürliche und nichtnatürliche Polypeptide identifiziert, die zahlreiche Moleküle wie Antikörper, Enzyme oder Rezeptoren binden.<sup>[24]</sup> So konnten antimikrobielle Peptide hergestellt werden, die gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien wirksam sind.<sup>[112]</sup> Auch die Bindungsspezifitäten synthetischer Wirtverbindungen, die von Steroiden und Makrocyclen abgeleitet sind, für Peptidliganden wurden bestimmt.<sup>[113–115]</sup> Außerdem wurden mit diesen Techniken Protein-Protein-Wechselwirkungen bei zellulären Vorgängen analysiert.<sup>[116]</sup> In einer solchen Untersuchung wurde mit zwei Fluorescein-markierten SH3-Domänen eine Peptidbibliothek nach Liganden durchsucht, die eine Affinität für diese Proteindomänen aufweisen. Aus den gefundenen Sequenzen wurden Regeln abgeleitet, nach denen die SH3-Liganden-Wechselwirkung abläuft. Die anschließenden Strukturuntersuchungen ergaben ein detailliertes Bild der Ligandenbindung durch SH3-Domänen.<sup>[116]</sup>

## 4.2. Ausweitung auf andere polymere und nichtpolymere Verbindungen

Mit Hilfe der molekularen Diversität wurden auch chemische und biologische Eigenschaften von Heteropolymeren erforscht, die nicht aus Aminosäuren aufgebaut sind. Diese nichtnatürlichen polymeren Gerüste haben möglicherweise neue Eigenschaften wie besseres pharmakokinetisches Verhalten (z. B. Membranpermeabilität und biologische Stabilität), das ihre Bioverfügbarkeit erhöht, oder veränderte Konformations- oder Wasserstoffbrückenbindungseigenschaften, die Einsichten in die Struktur und Faltung von Biomolekülen ermöglichen. Viele neue „nichtnatürliche Biopolymere“ wurden hergestellt, darunter Oligocarbamate,<sup>[117]</sup> Peptide,<sup>[118, 119]</sup> Oligoharnstoffverbindungen,<sup>[120–122]</sup> Oligopyrrolinone,<sup>[123]</sup> Oligoazatide,<sup>[124]</sup> Oligosulfonamide<sup>[125]</sup> und  $\beta$ -Peptide.<sup>[126–128]</sup> Weil diese oligomeren Verbindungen aus einem Satz unterschiedlicher Bausteine zusammengesetzt werden können, lassen sich schnell umfangreiche molekulare Bibliotheken herstellen und auf gewünschte Eigenschaften durchsuchen. Oligocarbamate beispielsweise, die aus einem chiralen Ethylrücken mit variierenden Seitenketten bestehen, die durch relativ starre Carbamatgruppen verbunden sind, wurden

effizient durch die schrittweise Kupplung von N-geschützten Amino-*p*-nitrophenylcarbonat-Monomeren synthetisiert. Die Monomere ihrerseits sind einfach aus den entsprechenden Aminosäuren zugänglich (Abbildung 16).<sup>[117]</sup> Bibliotheken aus

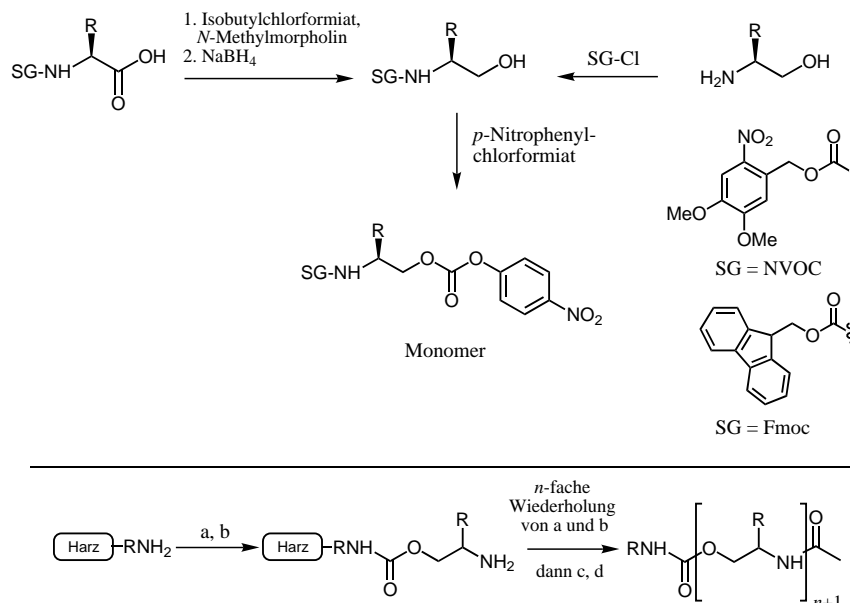


Abbildung 16. Synthese von Oligocarbamaten aus Aminosäuren als Ausgangsverbindungen.<sup>[117]</sup> a) Monomer, 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol (HOBt), Diisopropylethylamin, *N*-Methylpyrrolidin (NMP); b) Piperidin, NMP; c) Acetanhydrid, Pyridin; d) Trifluoressigsäure (TFA), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. – SG = Schutzgruppe; NVOC = Nitroveratrylmethoxycarbonyl; Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl.

diesen Molekülen sind hergestellt und auf hochaffine selektive Liganden für Antikörper und Integrinrezeptoren durchmustert worden.<sup>[117, 129]</sup> Auch Bibliotheken aus Polypeptoiden<sup>[118, 119]</sup> wurden hergestellt, deren Polypeptidrücken aus *N*-substituierten Glycineinheiten besteht. Daraus wurden Peptide identifiziert, die selektiv an den  $\alpha$ -adrenergen Rezeptor und eine Reihe von Enzymen binden.<sup>[118]</sup> Gegenwärtig bemüht man sich, die konformativen und die pharmakologischen Eigenschaften dieser Moleküle zu bestimmen.

Die Anwendung kombinatorischer Methoden zur Herstellung nichtpolymerer kleiner Moleküle wurde durch die Erkenntnis angeregt, daß viele solcher Moleküle auch durch die schrittweise Addition von Bausteinen an einem festen Träger synthetisiert werden können. Das bemerkenswerteste Beispiel aus der Anfangszeit der kombinatorischen Synthese war die Herstellung einer Bibliothek von 1,4-Benzodiazepinen,<sup>[130, 131]</sup> einer Pharmakophor-Gruppe, die in vielen klinisch bedeutsamen Therapeutika enthalten ist. Eine Bibliothek von etwa 2000 strukturell unterschiedlichen 1,4-Benzodiazepinen mit vielen verschiedenen Funktionalitäten wie Amid-, Carbonsäure-, Amin-, Phenol- und Indol-Gruppen wurde mit der Stäbchenmethode aus drei Komponenten hergestellt: 2-Aminobenzophenone, Aminosäuren und alkylierende Agentien (Abbildung 17). Aus dieser Bibliothek wurden Liganden, die selektiv an den Cholecystokin-A-Rezeptor p60src binden, sowie DNA-bindende Antikörper isoliert.

Seitdem sind kombinatorische Bibliotheken für eine ganze Reihe kleiner organischer Moleküle hergestellt worden, z. B. für  $\beta$ -Turn-Mimetica,<sup>[132]</sup> Hydantoine,<sup>[133]</sup> Protease-Inhibito-

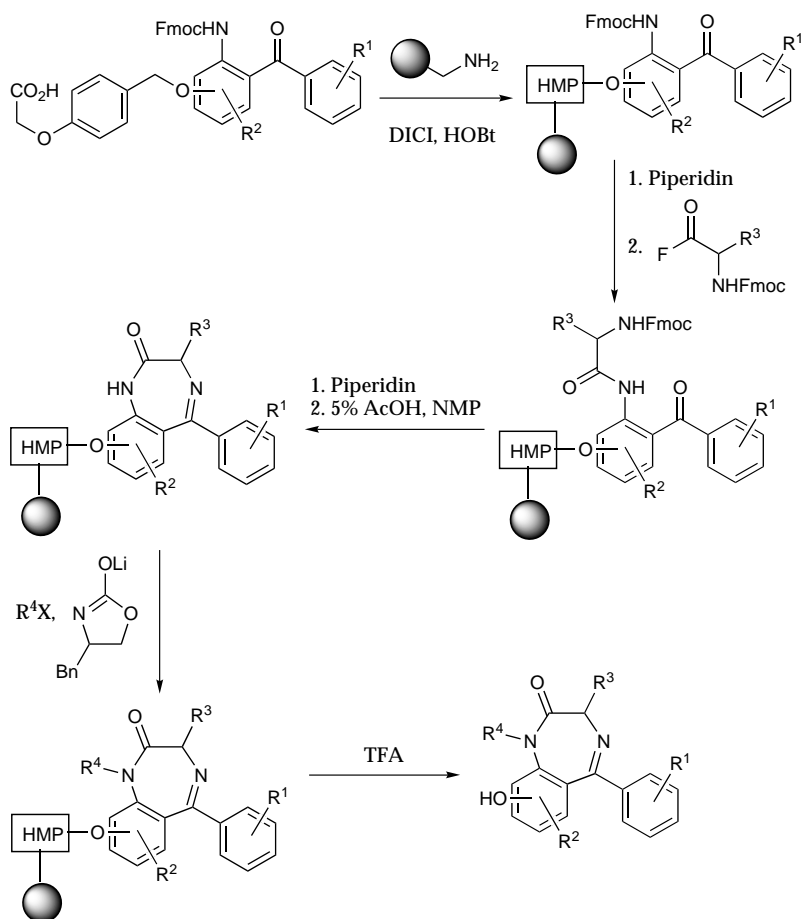


Abbildung 17. Festphasensynthese einer Bibliothek von 1,4-Benzodiazepinen.<sup>[130]</sup> – Bn = Benzyl; DICL = Diisopropylcarbodiimid; HMP = 4-(Hydroxymethyl)phenoxyessigsäure.

ren,<sup>[134]</sup> Pyrrolidine,<sup>[135]</sup>  $\beta$ -Lactame<sup>[136]</sup> und Tyrosinkinase-Inhibitoren.<sup>[137]</sup> Daneben wurde eine Bibliothek aus 1300 Di- und Trisacchariden auf Harzkügelchen hergestellt und gegen das mit einem Reporterenzym markierte Lektin von *Bauhinia purpurea* getestet.<sup>[138]</sup> Zwei Liganden wurden isoliert, die fester als der natürliche Ligand an das Lektin binden. Ähnliche Ansätze haben sich bei der Identifizierung von Liganden auf Kohlenhydrat-Basis für andere Rezeptoren als erfolgversprechend erwiesen.

Schließlich wurden auch beträchtliche Anstrengungen auf die Entwicklung neuer Festphasensynthesemethoden verwendet, um Bibliotheken aus kleinen Molekülen herzustellen;<sup>[139, 140]</sup> außerdem wird an theoretischen und empirischen Methoden zum Design von Bibliotheken gearbeitet. So konnten aus einer auf der Struktur basierenden Bibliothek von nichtpeptidischen Verbindungen, die das Hydroxyethyl-Pharmakophor von Pepstatin enthielten, starke Inhibitoren ( $K_i = 9\text{--}15\text{ nM}$ ) für Cathepsin D isoliert werden.<sup>[141]</sup> Mit Sicherheit werden Bibliotheken aus synthetischen oligomeren und nichtpolymeren Molekülen auch weiterhin einen wichtigen Einfluß auf die pharmazeutische Industrie haben.

### 4.3. Naturstoffe

Nicht nur durch chemische Synthese können Bibliotheken kleiner organischer Moleküle hergestellt werden; vor kurzem

wurde nachgewiesen, daß auch der Biosyntheseapparat von Zellen eingesetzt werden kann, um Bibliotheken von Naturstoffen wie den Polyketiden, zu denen die bekannten Antibiotika Erythromycin, Avermectin und Spiramycin gehören, herzustellen.<sup>[142]</sup> Die Verbindungen werden von modularen Polyketidsynthasen (PKSs) synthetisiert; diese sind große, multifunktionelle Enzymkomplexe, die die schrittweise Biosynthese dieser Naturstoffe katalysieren.<sup>[143, 144]</sup> Die Module enthalten Sätze von Enzymen (Ketosynthasen, Acyltransferasen, Ketoreduktasen, Dehydratasen und Enoylreduktasen), die prozessiv Cyclen von Verlängerungsschritten der Polyketidkette durchführen und dabei gleichzeitig den Oxidationsgrad und die absolute Konfiguration ändern. Werden einzelne Module entfernt, die Spezifität einzelner Enzyme in einem Modul geändert oder neue enzymatische Aktivitäten hinzugefügt, kann eine große Zahl unterschiedlicher Makrolide synthetisiert werden.<sup>[142]</sup> Vor kurzem wurde gezeigt, daß die Zugabe von synthetischen Diketid-Analoga zu einer Reaktion, die von der Desoxyerythronolid-B-Synthase, die eine Blockierung im KS-1-Gen enthält ( $\Delta$ KS1), katalysiert wird, zu einem neuen Polyketid führt, das den synthetischen Baustein enthält (Abbildung 18).<sup>[145]</sup> Sobald weitere Matrizen-unabhängige Biosynthesewege aufgeklärt und charakterisiert worden sind (z.B. für cyclische Peptide, Endiine und Bleomycine)

und unsere Möglichkeiten, ihre Funktion zu beeinflussen, wachsen, wird durch den beschriebenen Ansatz wahrscheinlich eine zunehmend diversere Sammlung chemischer Verbindungen verfügbar, die nach neuen biologischen Eigenschaften durchsucht werden kann.

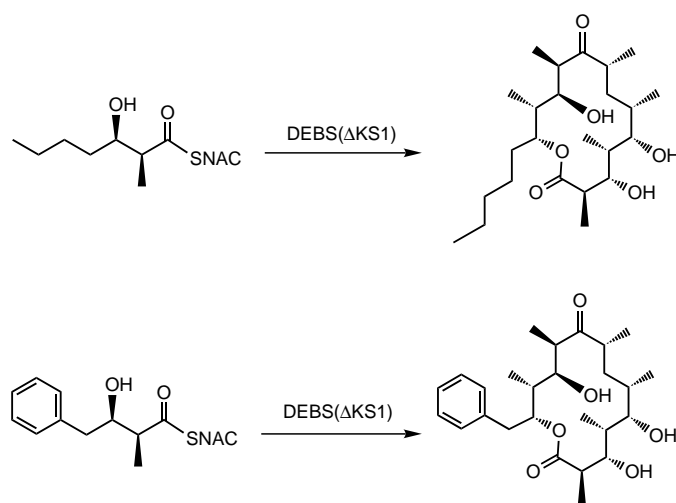


Abbildung 18. Vorstufen-gesteuerte Biosynthese neuer Polyketide, die synthetische Bausteine enthalten.<sup>[145]</sup> NAC = N-Acetylcysteinin; DEBS = Desoxyerythronolid-B-Synthase.

#### 4.4. Genomforschung

Für Methoden der kombinatorischen Synthese gibt es auch wichtige Anwendungen in der Genomforschung. Beispielsweise wurde es durch die photolithographische chemische Synthese, die für Peptide entwickelt wurde, möglich, räumlich adressierbare, dicht beladene Felder von Oligonucleotiden bekannter Sequenz zu synthetisieren.<sup>[146, 147]</sup> Mit dieser Technik wurden über 260 000 spezifisch ausgewählte Oligonucleotidsonden auf einer Fläche von ca. 6.5 cm<sup>2</sup> synthetisiert, die mit allen offenen Leserastern (open reading frames, ORFs) des Hefegenoms hybridisieren (zwanzig 25mere, die komplementär zu Segmenten in jedem ORF sind) (Abbildung 19).<sup>[148]</sup>



Abbildung 19. Fluoreszenzaufnahme eines mit Oligonucleotidsonden beladenen Feldes nach der Hybridisierung mit einer fluoreszenzmarkierten mRNA-Probe aus Hefezellen.

Damit läßt sich das Ausmaß der Expression fast aller Hefegene durch die Redundanz bei der Detektion und Analyse der Daten quantitativ, sensitiv und reproduzierbar verfolgen. Anordnungen dieser Art haben wahrscheinlich einen erheblichen Einfluß auf unsere Fähigkeit, den Informationsgehalt genomischer DNA zu analysieren, unter anderem durch die Suche nach Fehlpaarungen, Homologievergleiche und den Nachweis genetischer Unterschiede zwischen verschiedenen Stämmen der gleichen Art (z.B. Bakterienstämmen). Auch andere parallele Hochdurchsatzmethoden sind entwickelt worden, um Oligonucleotidfelder herzustellen,<sup>[149–156]</sup> darunter Hybridisierungsmethoden mit zuvor synthetisierten Oligonucleotiden.<sup>[157]</sup>

In einem anderen Fall wurde gezeigt, wie kombinatorische Bibliotheken kleiner Moleküle, Strukturinformationen und mit Oligonucleotiden beladene Felder synergistisch eingesetzt werden können, um selektive Kinase-Inhibitoren zu identifizieren und zu charakterisieren.<sup>[158]</sup> So wurde auf der Basis der Strukturanalyse des neuen Bindungsmodus des Purins Olomoucine in der ATP-Bindungs tasche der Zellcyclus-Kinase CDK2 eine kombinatorische Bibliothek aus 2,6,9-trisubstituierten Purinen hergestellt.<sup>[159, 160]</sup> Indem die Synthese chemischer Bibliotheken und ein biologisches Screening wiederholt hintereinandergeschaltet wurden, wurden hochaffine, selektive Inhibitoren von menschlicher CDK2/Cyclin A und von cdc28-Kinasen aus Hefe identifiziert. Zu den CDK2/Cyclin-A-Kinase-Inhibitoren gehören auch Verbin-

dungen, die selektiv das Wachstum von Dickdarmkrebs-Zelllinien hemmen. Die Strukturbasis für die Affinität und Selektivität dieser Purinderivate wurde durch die Analyse der dreidimensionalen Kristallstruktur ihrer Komplexe mit CDK2 bestimmt; davon ausgehend konnten Affinität und Selektivität der Verbindungen weiter gesteigert werden. Die zellulären Wirkungen dieser Verbindungsklasse wurden weiter untersucht und mit denen des CDK2-Inhibitors Flavopiridol verglichen, außerdem mit den Effekten von Mutationen in *cdc28* selbst, indem Änderungen im Expressionsniveau der mRNA bei allen Genen in den behandelten Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* mit den dicht beladenen Oligonucleotidsonden-Feldern bestimmt wurden.<sup>[148, 161]</sup> Insbesondere waren von den 105 Transkripten, die eine mehr als dreifache Veränderung als Reaktion auf beide Verbindungen (335 beim Purin und 267 bei Flavopiridol) aufwiesen, nur sieben reprimiert, und diese waren alle mit dem Fortschreiten des Zellcyclus assoziiert. Diese Versuche lieferten auch erste Hinweise auf andere allgemeine Auswirkungen dieser Verbindungen auf Zellmetabolismus, Streßantwort, Signaltransduktion sowie Wachstum und zeigten außerdem signifikante Unterschiede in den Wirkungen von Flavopiridol und den Purinen auf, trotz deren scheinbarer In-vitro-Selektivität für CDKs. Informationen dieser Art können im allgemeinen hilfreich sein, um Verbindungen vor dem Beginn von klinischen Studien zu vergleichen oder um Zielmoleküle zu identifizieren, deren Hemmung den Effekt eines primären Wirkstoffs potenzieren kann. Darüber hinaus wird durch den Rückgriff auf Genexpressions-Profile zusammen mit Überexpressions-Bibliotheken, in denen zahlreiche Kopien eines Gens vorliegen,<sup>[162]</sup> eine schnelle Identifizierung des Wirkortes von Verbindungen mit interessanten biologischen Eigenschaften ermöglicht, die durch phänotypisches Screening ganzer Zellen isoliert wurden. Der kombinierte Einsatz chemischer Bibliotheken, neuer In-vitro- und zellulärer Screeningmethoden<sup>[163–165]</sup> sowie der Genomforschung kann wahrscheinlich wichtige neue Einblicke in komplexe zelluläre Prozesse liefern.

#### 5. Materialwissenschaften

Die jüngste Anwendung kombinatorischer Methoden hat sich in der Festkörper- und Materialforschung eröffnet. Die Eigenschaften vieler funktioneller Materialien, z.B. von Hochtemperatur-Supraleitern, heterogenen Katalysatoren, ferroelektrischen Materialien, Magneten und sogar strukturgebenden Materialien wie Legierungen sind das Ergebnis komplexer Wechselwirkungen zwischen der Matrixstruktur, Dotierungsmitteln, Defektstellen und Grenzflächen, die alle stark von der Zusammensetzung und vom Herstellungsprozeß abhängen. Leider erlaubt der gegenwärtige Stand des theoretischen und empirischen Verständnisses im allgemeinen nicht, die Strukturen und die resultierenden Eigenschaften dieser Materialien vorherzusagen.<sup>[166]</sup> Die Situation wird weiter kompliziert durch die komplexen Zusammensetzungen vieler moderner Materialien (aus vier oder mehr Elementen) und durch die Tatsache, daß deren Synthese, anders als in der organischen Synthese, im allgemeinen nicht



kinetisch kontrolliert ist. Bei etwa 60 Elementen im Periodensystem, die für Mischungen aus drei, vier, fünf oder sogar sechs Elementen geeignet sind, ist das Universum möglicher neuer Verbindungen mit interessanten physikalischen und chemischen Eigenschaften noch kaum abgesteckt worden. Mit kombinatorischen Methoden sollten schnell große Bibliotheken (mit Hunderten bis Hunderttausenden von Verbindungen) von anorganischen und organischen Materialien und Vorrichtungen synthetisiert, bearbeitet und analysiert werden können. So kann die Effizienz der Materialentwicklung und -optimierung deutlich gesteigert und unser Wissen über den Zusammenhang zwischen Struktur und Eigenschaften von Materialien deutlich vergrößert werden.

### 5.1. Synthese und Screening

In der Materialforschung wurden mit kombinatorischen Methoden als erstes Bibliotheken von Dünnschicht-Kupferoxiden, die Hochtemperatur-Supraleiter enthalten, synthetisiert.<sup>[167]</sup> Sie dienten dazu, viele verschiedene Materialzusammensetzungen zu testen, und wurden synthetisiert, indem nacheinander Vorstufen mit Hilfe von Lochblenden präzise an verschiedenen Stellen eines Trägers aufgebracht wurden (Abbildung 20). Dem Auftrag bei niedriger Temperatur folgte eine Nachbehandlung bei hoher Temperatur; dabei bildeten sich supraleitende dünne Schichten. Vor kurzem wurde mit quarternären Masken und Verschlussblenden-Systemen zusammen mit photolithographischen Maskentechniken und Materialabscheidung durch gepulste Laser die Synthese von qualitativ hochwertigen, diversen Dünnschicht-Bibliotheken von etwa 1000 bis 10000 Proben auf einer Fläche von ca. 6.5 cm<sup>2</sup> erreicht.<sup>[168–170]</sup> Auch Verfahren in Lösung wurden zur Synthese von Materialbibliotheken eingesetzt. So sind z.B. Systeme zur gerasterten Flüssigkeitsabgabe (wie bei Tintenstrahldruckern) eingesetzt worden, mit denen schnell und präzise Nanolitermengen an Lösungen von Vorstufen aufgetragen werden können, um damit Bibliotheken von Metalloxiden und organischen Polymeren herzustellen.<sup>[171, 172]</sup> Die Bedingungen der Nachbehandlung spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Materialeigenschaften, und es ist wichtig, die entsprechenden Variablen bei der Planung einer Materialbibliothek miteinzubeziehen. Identische Bibliotheken, die gleichzeitig synthetisiert wurden, können unter verschiedenen Bedingungen nachbehandelt werden, um die Diversität zu erhöhen. Öfen mit programmierbaren Temperaturgradienten wurden benutzt, um optimale Bedingungen für die Nachbehandlung einer Metalloxid-Bibliothek zu finden; in ähnlicher Weise kann man den Sauerstoffpartialdruck variieren, indem man Sauerstoff auf einer Seite des Chips zuführt.<sup>[173]</sup>

Bis heute sind eine Reihe von Detektionssystemen entwickelt worden, um Materialbibliotheken auf gewünschte optische, elektronische, magnetische oder chemische Eigenschaften zu durchmustern.<sup>[173]</sup> Mit optischen Bildauswertungssystemen wurden Bibliotheken photolumineszierender Materialien untersucht. Beispielsweise wurden ein Spektrophotometer und Charge-coupled-device (CCD)-Detektoren benutzt, um die Photonenemission und Chromatizität einer

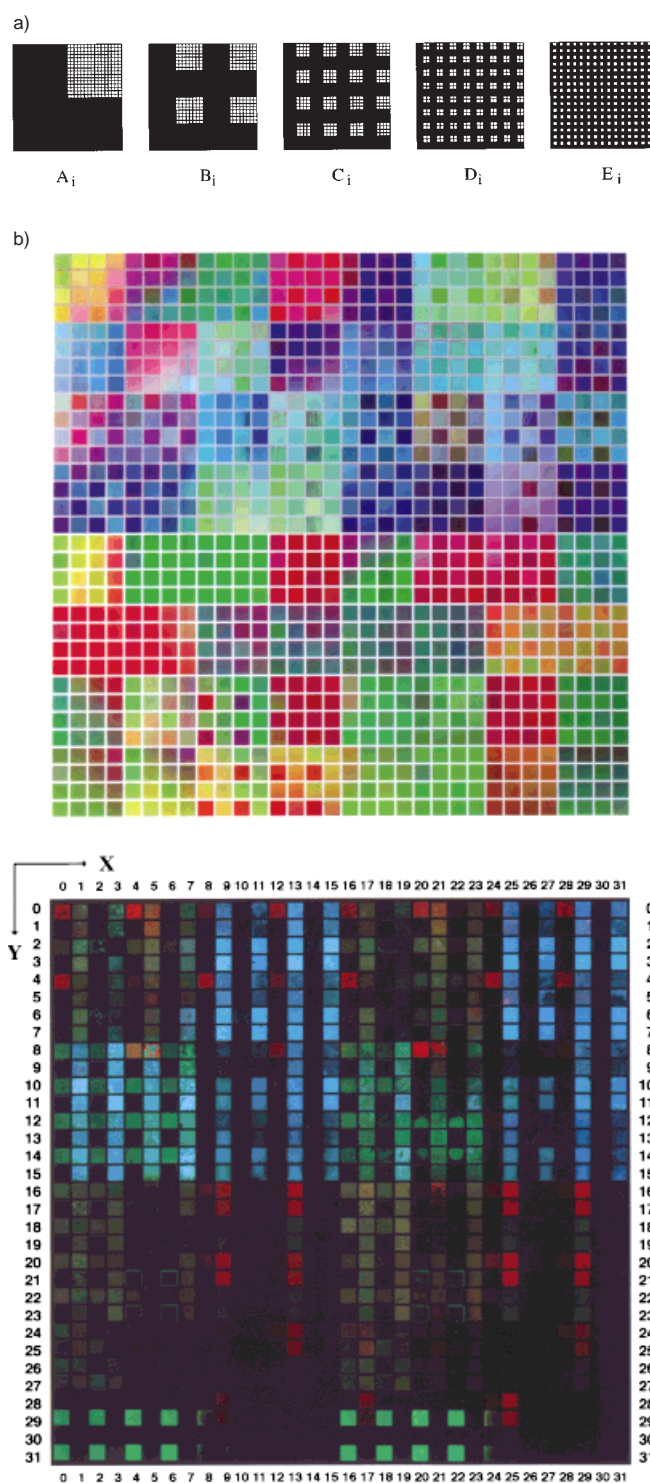


Abbildung 20. a) Beim quarternären Maskierungsschema wird die Abscheidung ausgeführt, indem eine Serie von  $n$  verschiedenen Masken benutzt wird, die das Substrat in eine Serie von zusammenhängenden Quadranten unterteilt. Jede Maske wird bei vier aufeinanderfolgenden Auftragungsschritten um jeweils 90° gedreht, so daß sich bis zu  $4^n$  Zusammensetzungen in  $4n$  Auftragungsschritten ergeben. b) Photographie einer Bibliothek aus 1024 Verbindungen (aufgetragen auf einem Siliciumsubstrat mit einer Fläche von 2.54 × 2.54 cm<sup>2</sup>) unter Umgebungslicht (oben) und UV-Bestrahlung (unten).

jeden Komponente in Bibliotheken mit phosphoreszierenden Verbindungen bei Anregung mit monochromatischem UV-Licht zu bewerten.<sup>[168, 169]</sup> Ein neues Rastersonden-Mikro-

wellen-Nahfeldmikroskop (scanning-tip microwave near-field microscope, STMNM) wurde entwickelt, um die Dielektrizitätskonstante und den dielektrischen Dissipationsfaktor (dielektrischer Verlust) einer Bibliothek von ferroelektrischen Materialien mit räumlicher Auflösung (Submikrometerbereich) und hoher Empfindlichkeit zerstörungsfrei messen zu können (Abbildung 21).<sup>[170, 174]</sup> Noch aktueller ist eine Röntgen-Mikrostrahltechnik mit einer Strahlfläche von  $3 \times 20 \mu\text{m}^2$ , mit der die Zusammensetzung und die Struktur von Proben in Dünnschicht-Bibliotheken charakterisiert wurde.<sup>[175]</sup> Mit der bildgebenden Infrarot-Thermographie wurde die Katalysatoraktivität in einer kleinen Bibliothek von Wasserstoff-oxidierenden Katalysatoren<sup>[176]</sup> qualitativ ausgewertet; mit der Massenspektrometrie wurde eine Bibliothek von Oxidationskatalysatoren mit hoher Sensitivität rasch durchmustert.<sup>[177]</sup> Magneto-optische Detektoren wurden entwickelt, um Bilder von Bibliotheken magnetischer Materialien herzustellen, und mit vielen anderen Detektorsystemen kann ein weiterer Bereich von Materialeigenschaften gemessen werden (Infrarot- und Raman-Spektroskopie, Oberflächen-Plasmonenresonanz, Nanoindentation, Lichtstreuung und Mikroskopie unter polarisiertem Licht).

## 5.2. Anwendungen

Obwohl bei der Methodenentwicklung für kombinatorische Synthese, Nachbehandlung und Detektion von Materialbibliotheken noch viel Arbeit zu tun bleibt, wurden bereits einige Anwendungen veröffentlicht. Kombinatorische Methoden wurden bei der Identifizierung einer Klasse magneto-resistiver Cobaltoxide des Typs  $(\text{La}_{0.88}\text{S}_{0.12})\text{CoO}_3$  eingesetzt.<sup>[178]</sup> Der magnetische Widerstand nahm mit der Größe des dotierenden Ions zu, im Gegensatz zu manganhaltigen Verbindungen, in denen der magnetoresistive Effekt zunimmt, wenn die Größe des Erdalkalimetallions abnimmt. Auch bei der Identifizierung und Optimierung lumineszenter Materialien wurden kombinatorische Methoden angewandt. Kürzlich wurden zwei neue blaue phosphoreszierende Verbindungen,  $\text{SrCeO}_4$ <sup>[179]</sup> und  $\text{Gd}_3\text{Ga}_5\text{O}_{12}/\text{SiO}_x$ ,<sup>[168]</sup> in kombinatorischen Bibliotheken gefunden. Ähnliches gilt auch für ferroelektrische Materialien, wo die Effekte der Dotierung mit Übergangsmetallen auf die Dielektrizitätskonstante und den dielektrischen Dissipationsfaktor einer Dünnschicht-Bibliothek von  $(\text{Ba}_x\text{Sr}_{1-x})\text{TiO}_3$  bestimmt wurden.<sup>[170]</sup> Kombinatorische Methoden werden wahrscheinlich einen erheblichen Einfluß auf Katalysatorforschung und Polymerchemie haben; die ersten Versuche, diese Methoden anzuwenden, sind bereits beschrieben worden.<sup>[173–176, 180–182]</sup> Es ist vielleicht auch möglich, kombinatorische Bibliotheken von vollständigen Funktionseinheiten wie Kondensatoren oder elektrolytmineszierenden Displays herzustellen.<sup>[183]</sup>

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Entwicklung von Strategien zur Herstellung umfangreicher und diverser Bibliotheken von Biomolekülen, kleinen organischen Molekülen und festen Materialien, zusammen mit neuen Suchmethoden und Selektionsverfahren für spezifische biologische, chemische oder physikalische Eigenschaften,

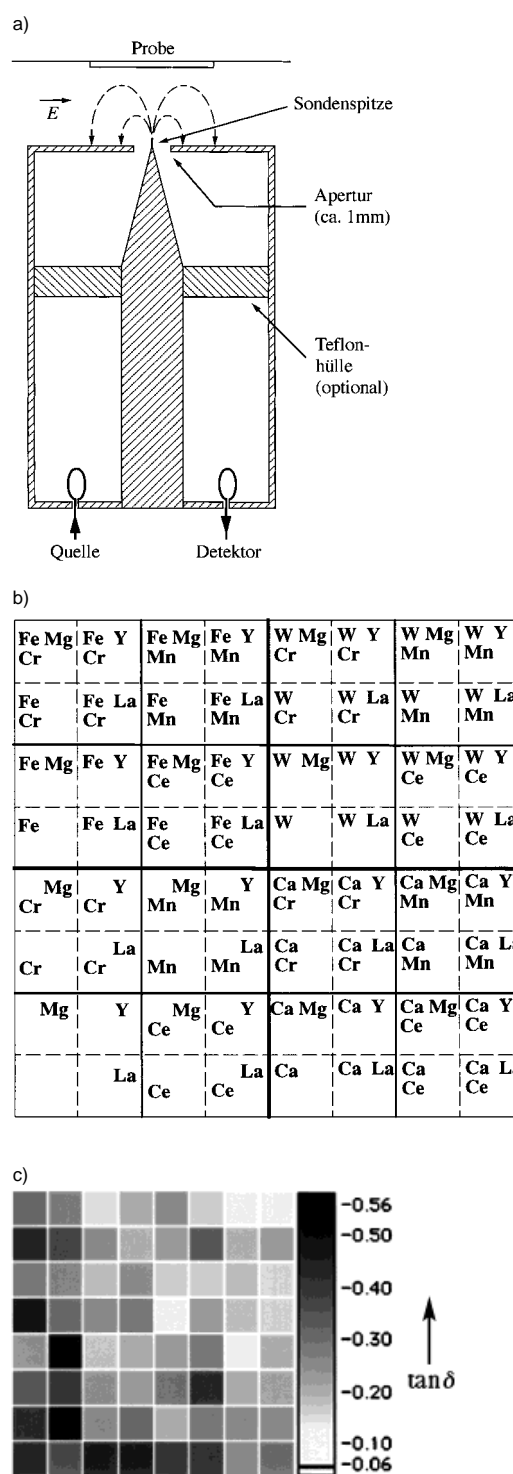


Abbildung 21. a) Schematische Darstellung eines Rastersonden-Mikrowellen-Nahfeldmikroskops zur Analyse von Bibliotheken ferroelektrischer und dielektrischer Materialien. b) Zusammensetzung eines Teils einer Bibliothek von ferroelektrischem  $\text{BaTiO}_3$  mit den angegebenen Dotierungsmitteln. c) STMNM-Aufnahme zur Bestimmung der dielektrischen Dissipationsfaktoren ( $\tan \delta$ ) in dieser Bibliothek.<sup>[174]</sup>

ten, hat einen enormen Einfluß auf die Wissenschaft. Durch die neuen Ansätze werden Geschwindigkeit und Effizienz, mit der die wissenschaftliche Methode genutzt werden kann, um Moleküle mit neuen Eigenschaften zu identifizieren und die Strukturbasis für ihre Funktion zu verstehen, erheblich

erhöht. Natürlich liegen noch viele Herausforderungen vor uns, darunter a) die Verbesserung der theoretischen und computergestützten Methoden zum Design von Bibliotheken und zur Analyse der Ergebnisse von Experimenten mit Bibliotheken; b) die Entwicklung von Methoden zur Herstellung von Bibliotheken zunehmender Größe (besonders für Polypeptide, Proteine und synthetische Moleküle); c) die Entwicklung von Hochdurchsatz-Screeningverfahren für breitere biologische (zelluläre), chemische und physikalische Eigenschaften; d) die Ausdehnung biologischer Selektions- und Amplifikationsverfahren auf synthetische Pools hoher Diversität und e) weitere ingenieurtechnische Verbesserungen bei Miniaturisierung und Automatisierung. Nichtsdestoweniger wurde die molekulare Diversität bereits genutzt, um eine große Zahl von Verbindungen mit Funktionen herzustellen, die mit traditionellen Synthesemethoden schwierig, in manchen Fällen sogar unmöglich hervorzubringen wären.

Unsere eigenen Arbeiten zum Thema dieses Aufsatzes wurden vom Department of Energy, den National Institutes of Health und vom Office of Naval Research gefördert. D.R.L. bedankt sich für ein Doktorandenstipendium des Howard Hughes Medical Institute. P.G.S. wurde vom Howard Hughes Medical Institute und von der W. M. Keck Foundation unterstützt.

Eingegangen am 18. Februar 1998,

veränderte Fassung am 15. Juli 1998 [A274]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 36–54

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] F. M. Burnet, *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*, Vanderbilt University Press, Nashville, TN, **1959**, S. 53.
- [2] D. W. Talmage, *Science* **1959**, 129, 1649.
- [3] S. Tonegawa, *Nature* **1983**, 302, 57.
- [4] D. R. Davies, S. Chacto, *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 421.
- [5] S. J. Pollack, J. W. Jacobs, P. G. Schultz, *Science* **1986**, 234, 1570.
- [6] A. Tramontano, K. D. Janda, R. A. Lerner, *Science* **1986**, 234, 1566.
- [7] P. G. Schultz, R. A. Lerner, *Science* **1995**, 269, 1835.
- [8] A. G. Cochran, P. G. Schultz, *Science* **1990**, 249, 781.
- [9] M. E. Blackwood, Jr., T. S. Rush III, F. Romesberg, P. G. Schultz, T. G. Spiro, *Biochemistry* **1998**, 37, 779.
- [10] F. E. Romesberg, B. D. Santarsiero, B. Spiller, J. Yin, D. Barnes, P. G. Schultz, R. C. Stevens, *Biochemistry* **1998**, 37, 14404.
- [11] J. R. Jacobsen, J. R. Prudent, L. Kockersperger, S. Yonkovich, P. G. Schultz, *Science* **1992**, 256, 365.
- [12] E. Driggers, P. G. Schultz, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [13] P. G. Schultz, R. A. Lerner, *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 391–395.
- [14] C. F. Barbas III, A. Heine, G. Zhong, T. Hoffmann, S. Gramatikova, R. Bjornstedt, B. List, J. Anderson, E. A. Stura, I. A. Wilson, *Science* **1997**, 278, 2085–2092.
- [15] G. F. Zhong, T. Hoffmann, R. A. Lerner, S. Danishefsky, C. F. Barbas III, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8131–8132.
- [16] H. D. Ulrich, E. Mundorff, B. D. Santarsiero, E. M. Driggers, R. C. Stevens, P. G. Schultz, *Nature* **1997**, 389, 271–275.
- [17] F. E. Romesberg, B. Spiller, P. G. Schultz, R. C. Stevens, *Science* **1998**, 279, 1929–1933.
- [18] A. Heine, E. A. Stura, J. T. Yli-Kauhala, C. Gao, Q. Deng, B. R. Beno, K. N. Houk, K. D. Janda, I. A. Wilson, *Science* **1998**, 279, 1934.
- [19] G. J. Wedemayer, P. A. Patten, L. H. Wang, P. G. Schultz, R. C. Stevens, *Science* **1997**, 276, 1613–1756.
- [20] P. A. Patten, N. S. Gray, P. L. Yang, C. B. Marks, G. J. Wedemayer, J. J. Boniface, R. C. Stevens, P. G. Schultz, *Science* **1996**, 271, 1086.
- [21] G. J. Wedemayer, L. H. Wang, P. A. Patten, P. G. Schultz, R. C. Stevens, *J. Mol. Biol.* **1997**, 268, 390.
- [22] W. D. Huse, L. Sastry, S. A. Iverson, A. S. Kang, M. Alting-Mees, D. R. Burton, S. J. Benkovic, R. A. Lerner, *Science* **1989**, 246, 1275–1281.
- [23] S. Cwirla, E. A. Peters, R. W. Barrett, W. J. Dower, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 6378–6382.
- [24] M. A. Gallop, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, E. M. Gordon, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 1233–1251.
- [25] J. K. Scott, C. P. Smith, *Science* **1990**, 249, 386–390.
- [26] J. J. Delvin, L. C. Panganiban, P. E. Delvin, *Science* **1990**, 249, 404–406.
- [27] M. G. Cull, J. F. Miller, P. J. Schatz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 1865–1869.
- [28] L. C. Mattheakis, R. Bhatt, W. J. Dower, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 9022.
- [29] R. W. Roberts, J. W. Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 12297–12302.
- [30] A. S. Kang, C. F. Barbas, K. D. Janda, S. J. Benkovic, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 4363–4366.
- [31] J. McCafferty, A. D. Griffiths, G. Winter, D. J. Chiswell, *Nature* **1990**, 348, 552–554.
- [32] K. D. Janda, C. H. Lo, T. Li, C. F. Barbas III, P. Wirsching, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 2532.
- [33] K. D. Janda, L.-C. Lo, C.-H. Lo, M.-M. Sim, R. Wang, C.-H. Wong, R. A. Lerner, *Science* **1997**, 275, 945–948.
- [34] J. Ku, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 6552.
- [35] H. Pedersen, S. Holder, D. S. Sutherlin, U. Schwitter, D. S. King, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 10523.
- [36] N. C. Wrighton, F. X. Farrell, R. Chang, A. K. Kashyap, F. P. Barbone, L. S. Mulcahy, D. L. Johnson, R. W. Barrett, L. K. Jolliffe, W. J. Dower, *Science* **1996**, 273, 458–463.
- [37] O. Livnah, E. A. Stura, D. L. Johnson, S. A. Middleton, L. S. Mulcahy, N. C. Wrighton, W. J. Dower, L. K. Jolliffe, I. A. Wilson, *Science* **1996**, 273, 464.
- [38] D. J. Matthews, J. A. Wells, *Science* **1993**, 260, 1113–1117.
- [39] M. A. Barry, W. J. Dower, S. A. Johnston, *Nat. Med.* **1996**, 2, 299–305.
- [40] M. Barinaga, *Science* **1998**, 279, 323–324.
- [41] B. G. Hall, *Biochemistry* **1981**, 20, 4042–4049.
- [42] M. S. Neuberger, B. S. Hartley, *J. Gen. Microbiol.* **1981**, 122, 181–191.
- [43] A. Paterson, P. H. Clarke, *J. Gen. Microbiol.* **1979**, 114, 75–85.
- [44] J. Reidhaar-Olson, J. Bowie, R. M. Breyer, J. C. Hu, K. L. Knight, W. A. Lim, M. C. Mossing, D. A. Parsell, K. R. Shoemaker, R. T. Sauer, *Methods Enzymol.* **1991**, 208, 564–586.
- [45] J. A. Wells, M. Vasser, D. B. Powers, *Gene* **1985**, 34, 315.
- [46] R. C. Caldwell, G. F. Joyce, *PCR Methods Appl.* **1992**, 2, 28–33.
- [47] W. P. C. Stemmer, *Nature* **1994**, 370, 389–391.
- [48] P. A. Patten, R. J. Howard, W. P. C. Stemmer, *Curr. Opin. Biol.* **1997**, 8, 724–733.
- [49] C. Ho, M. Jasin, P. Schimmel, *Science* **1985**, 229, 389.
- [50] A. R. Oliphant, K. Struhl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 9094.
- [51] H. Liao, T. McKensie, R. Hageman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 576.
- [52] J. F. Reidhaar-Olson, R. T. Sauer, *Science* **1988**, 241, 53.
- [53] J. C. Moore, F. H. Arnold, *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 458.
- [54] K. W. Munir, D. C. French, L. A. Loeb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 4012.
- [55] D. R. Liu, T. J. Magliery, M. Pastrnak, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 10092–10097.
- [56] D. R. Liu, M. Pastrnak, P. G. Schultz, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [57] S. Bass, R. Green, J. A. Wells, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **1990**, 8, 309–314.
- [58] Y. Choo, A. Klug, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 1163–1167.
- [59] E. J. Rebar, C. O. Pabo, *Science* **1994**, 263, 671–673.
- [60] A. C. Jamieson, S.-H. Kim, J. A. Wells, *Biochemistry* **1994**, 33, 5689–5695.
- [61] Y. Choo, I. Sánchez-García, A. Klug, *Nature* **1994**, 372, 642–645.
- [62] L. Huang, T. Sera, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 3969–3973.
- [63] T. Sera, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 2920–2925.
- [64] W. A. Lim, R. T. Sauer, *Nature* **1989**, 339, 31–36.
- [65] S. Kamtekar, J. M. Schiffer, H. Xiong, J. M. Babik, M. H. Hecht, *Science* **1993**, 262, 1680–1685.

- [66] A. R. Davidson, R. T. Sauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 2146–2150.
- [67] B. I. Dahiyat, S. L. Mayo, *Science* **1997**, *278*, 82–87.
- [68] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818–822.
- [69] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505–510.
- [70] D. L. Robertson, G. F. Joyce, *Nature* **1990**, *344*, 467.
- [71] A. A. Beaudry, G. F. Joyce, *Science* **1992**, *257*, 635.
- [72] C. Tuerk, S. MacDougall, L. Gold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 6988.
- [73] D. P. Bartel, M. L. Zapp, M. R. Green, J. Szostak, *Cell* **1991**, *67*, 529.
- [74] M. Sassanfar, J. W. Szostak, *Nature* **1993**, *364*, 550–553.
- [75] M. Famulok, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3990.
- [76] G. J. Connell, M. Illangsekare, M. Yarus, *Biochemistry* **1993**, *32*, 5497.
- [77] L. Bock, L. Griffin, J. Latham, E. Vermaas, J. Toole, *Nature* **1992**, *355*, 564–566.
- [78] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1992**, *355*, 850.
- [79] F. Jiang, R. A. Kumar, R. A. Jones, D. J. Patel, *Nature* **1996**, *382*, 183–186.
- [80] C. R. Woese, S. Winker, R. R. Gutell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 8467–8471.
- [81] R. D. Jenison, S. C. Gill, A. Pardi, B. Polisky, *Science* **1994**, *263*, 1425–1429.
- [82] D. Pei, H. D. Ulrich, P. G. Schultz, *Science* **1991**, *253*, 1408–1411.
- [83] I. Haruna, S. Spiegelman, *Science* **1965**, *150*, 886.
- [84] R. Green, *Science* **1992**, *258*, 1910–1915.
- [85] N. Lehman, G. F. Joyce, *Nature* **1993**, *361*, 182–185.
- [86] D. P. Bartel, J. W. Szostak, *Science* **1993**, *261*, 1411–1418.
- [87] E. H. Eklund, J. W. Szostak, D. P. Bartel, *Science* **1995**, *269*, 364–370.
- [88] E. H. Eklund, D. P. Bartel, *Nature* **1996**, *382*, 373–376.
- [89] J. R. Prudent, T. Uno, P. G. Schultz, *Science* **1994**, *264*, 1924–1927.
- [90] M. M. Conn, J. R. Prudent, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7012–7013.
- [91] Y. Li, D. Sen, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 743–747.
- [92] T. M. Tarasow, S. L. Tarasow, B. E. Eaton, *Nature* **1997**, *389*, 54–57.
- [93] M. A. Barry, W. C. Lai, S. A. Johnston, *Nature* **1995**, *377*, 632–635.
- [94] C. Grimm, E. Lund, J. E. Dahlberg, *EMBO J.* **1997**, *16*, 793–806.
- [95] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [96] H. M. Geysen, R. H. Meloan, S. J. Barteling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3998–4002.
- [97] R. A. Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 5131–5135.
- [98] H. M. Geysen, S. J. Rodda, T. J. Mason, G. Tribbick, P. G. Schoofs, *J. Immunol. Methods* **1987**, *102*, 259–274.
- [99] H. M. Geysen, S. J. Rodda, T. J. Mason, *Mol. Immunol.* **1986**, *23*, 709–715.
- [100] S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767.
- [101] J. W. Jacobs, S. P. A. Fodor, *Trends Biotechnol.* **1994**, *12*, 19–26.
- [102] A. Furka, F. Sebestyen, M. Asgedom, G. Dibo, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 487–493.
- [103] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82–84.
- [104] R. A. Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, J. H. Cuervo, *Nature* **1991**, *354*, 84–86.
- [105] C. Pinilla, J. R. Appel, P. Blanc, R. A. Houghten, *Biotechniques* **1992**, *13*, 901–905.
- [106] K. S. Lam, V. J. Hruby, M. Lebl, R. J. Knapp, W. M. Kazmierski, E. M. Hersh, S. E. Salmon, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 419–424.
- [107] G. P. Smith, D. A. Schultz, J. E. Ladbury, *Gene* **1993**, *128*, 37–42.
- [108] S. Brenner, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5181–5183.
- [109] M. N. 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.
- [110] V. Nikolaiev, A. Stierandova, V. Krchnak, B. Sekigmann, K. S. Lam, S. E. Salmon, M. Lebl, *Pept. Res.* **1993**, *6*, 161–170.
- [111] M. H. J. Ohlmeyer, R. N. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asouline, R. Kobayashi, M. Wigler, W. C. Still, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10922–10926.
- [112] R. A. Houghten, J. R. Appel, S. E. Blondelle, J. H. Cuervo, C. T. Dooley, C. Pinilla, *Biotechniques* **1992**, *13*, 412–421.
- [113] M. Torneiro, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5887–5888.
- [114] S. S. Yoon, W. C. Still, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 567–578.
- [115] A. Borchardt, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 373–374.
- [116] J. K. Chen, S. L. Schreiber, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1041; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 953–969.
- [117] C. Y. Cho, E. J. Moran, S. R. Cherry, J. C. Stephans, S. P. A. Fodor, C. L. Adams, A. Sundaram, J. W. Jacobs, P. G. Schultz, *Science* **1993**, *261*, 1303–1305.
- [118] R. J. Simon, R. S. Kania, R. N. Zuckermann, V. D. Huebner, D. A. Jewell, S. Banville, S. Ng, L. Wang, S. Rosenberg, C. K. Marlowe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 9367–9371.
- [119] R. N. Zuckermann, E. J. Martin, D. C. Spellmeyer, G. B. Stauber, K. R. Shoemaker, J. M. Kerr, G. M. Figliozzi, D. A. Goff, M. A. Siana, R. J. Simon, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2678–2685.
- [120] J. S. Nowick, N. A. Powell, E. J. Martinez, E. M. Smith, G. Noronha, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3763–3765.
- [121] K. Burgess, J. Ibarzo, D. S. Linthicum, D. H. Russell, H. Shin, A. Shitangkoon, R. Totani, A. J. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1556–1564.
- [122] J.-M. Kim, T. E. Wilson, T. C. Norman, P. G. Schultz, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5305–5308.
- [123] A. B. Smith, T. P. Keenan, R. C. Holcomb, P. A. Sprengeler, M. C. Guzman, J. L. Wood, P. J. Carroll, R. Hirschmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10672–10674.
- [124] H. Han, K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2539–2544.
- [125] C. Gennari, B. Salom, D. Potenza, A. Williams, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2181; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2067–2069.
- [126] M. Hagihara, N. J. Anthony, T. J. Stout, J. Clardy, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6568–6570.
- [127] D. H. Appella, L. A. Christianson, D. A. Klein, D. R. Powell, X. Huang, J. J. Barchi, S. H. Gellman, *Nature* **1997**, *387*, 381–384.
- [128] J. L. Matthews, M. Overhand, F. N. M. Kühnle, P. E. Ciceri, D. Seebach, *Liebigs Ann.* **1997**, 1371–1379.
- [129] C. Y. Cho, R. S. Youngquist, S. J. Paikoff, M. H. Beresini, A. R. Hebert, C. W. Liu, D. E. Wemmer, T. Keough, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, im Druck.
- [130] B. A. Bunin, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10997–10998.
- [131] B. A. Bunin, M. J. Plunkett, J. A. Ellman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 4708–4712.
- [132] A. A. Virgilio, A. A. Bray, W. Zhang, L. Trinh, M. Snyder, M. M. Morrissey, J. A. Ellman, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 6635–6644.
- [133] S. H. De Witt, J. S. Kiely, C. J. Stankovic, M. C. Schroeder, D. M. Cody, M. R. Pavia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 6909–6913.
- [134] D. A. Campbell, J. C. Bermak, T. S. Burkoth, D. V. Patel, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5381–5382.
- [135] M. M. Murphy, J. R. Schullek, E. M. Gordon, M. A. Gallop, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7029–7030.
- [136] B. Ruhland, A. Bhandari, E. M. Gordon, M. A. Gallop, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 253–254.
- [137] J. Green, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4287–4290.
- [138] R. Liang, L. Yan, J. Loebach, M. Ge, Y. Uozumi, K. Sekanina, N. Horan, J. Gildersleeve, C. Thompson, A. Smith, *Science* **1996**, *274*, 1520–1522.
- [139] P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. Rees, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 4527–4554.
- [140] P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. Rees, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 5643–5678.
- [141] E. K. Kick, D. C. Roe, A. G. Skillman, G. Liu, T. J. A. Ewing, Y. Sun, I. D. Kuntz, J. A. Ellman, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 297–307.
- [142] C. Khosla, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2577–2590.
- [143] J. Cortes, S. F. Haydock, G. A. Roberts, D. J. Bevirt, P. F. Leadlay, *Nature* **1990**, *348*, 176–178.
- [144] S. Donadio, M. J. Staver, J. B. McAlpine, S. J. Swanson, L. Katz, *Science* **1991**, *252*, 675–679.
- [145] J. R. Jacobsen, C. R. Hutchinson, D. E. Cane, C. Khosla, *Science* **1997**, *277*, 367–369.
- [146] A. C. Pease, D. Solas, E. J. Sullivan, M. T. Cronin, C. P. Holmes, S. P. A. Fodor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 5022–5026.
- [147] M. S. Chee, X. Huang, R. Yang, E. Hubbell, A. Berno, D. Stern, J. Winkler, D. J. Lockhart, M. S. Morris, S. P. A. Fodor, *Science* **1996**, *274*, 610–614.



- [148] L. Wodicka, H. Dong, M. Mittman, M.-H. Ho, D. J. Lockhart, *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 1359–1367.
- [149] M. D. Adams, J. M. Kelley, J. D. Gocayne, M. Dubnick, M. H. Polymeropoulos, H. Xiao, C. R. Merrill, A. Wu, B. Olde, R. F. Moreno, A. R. Kerlavage, W. R. McCombie, J. C. Venter, *Science* **1991**, *252*, 1651–1656.
- [150] G. G. Lennon, H. Lehrach, *Trends Genet.* **1991**, *7*, 314–317.
- [151] P. Liang, A. B. Pardee, *Science* **1992**, *257*, 967–971.
- [152] K. Okubo, N. Hori, R. Matoba, T. Niiyama, A. Fukushima, Y. Kojima, K. Matsubara, *Nat. Genet.* **1992**, *2*, 173–179.
- [153] S. Meier-Ewert, E. Maier, A. Ahmadi, J. Curtis, H. Lehrach, *Nature* **1993**, *361*, 375–376.
- [154] V. E. Velculescu, L. Zhang, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, *Science* **1995**, *270*, 484–487.
- [155] N. Zhao, H. Hashida, N. Takahashi, Y. Misumi, Y. Sakaki, *Gene* **1995**, *156*, 207–213.
- [156] C. Nguyen, D. Rocha, S. Granjeaud, M. Baldit, K. Bernard, P. Naquet, B. R. Jordan, *Genomics* **1995**, *29*, 207–216.
- [157] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown, *Science* **1995**, *270*, 467–470.
- [158] N. S. Gray, L. Wodicka, A.-M. Thunnissen, T. C. Norman, S. Kwon, F. H. Espinoza, D. O. Morgan, G. Barnes, S. LeClerc, L. Meijer, S.-H. Kim, D. J. Lockhart, P. G. Schultz, *Science* **1998**, *281*, 533–538.
- [159] N. S. Gray, S. Kwon, P. G. Schultz, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1161–1164.
- [160] T. C. Norman, N. S. Gray, J. T. Koh, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7430–7431.
- [161] J. L. DeRisi, V. R. Iyer, P. O. Brown, *Science* **1997**, *278*, 680–686.
- [162] D. Hirata, K. Yano, T. Miyakawa, *Mol. Gen. Genet.* **1994**, *242*, 250.
- [163] G. Zlokarnik, P. A. Negulescu, T. E. Knapp, L. Mere, N. Burres, L. Feng, M. Whitney, K. Roemer, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, *279*, 84–88.
- [164] S. D. Liberles, S. T. Diver, D. J. Austin, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 7825–7830.
- [165] E. J. Licitra, J. O. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 12817–12821.
- [166] F. J. DiSalvo, *Science* **1990**, *247*, 649.
- [167] X.-D. Xiang, X. Sun, G. Briceño, Y. Lou, K.-A. Wang, H. Chang, W. G. Wallace-Freedman, S.-W. Chen, P. G. Schultz, *Science* **1995**, *268*, 1738–1740.
- [168] J. X. Wang, *Science* **1998**, im Druck.
- [169] E. Danielson, J. H. Golden, E. W. McFarland, C. M. Reaves, W. H. Weinberg, X. D. Wu, *Nature* **1997**, *389*, 944.
- [170] H. Chang, C. Gao, I. Takeuchi, Y. Yoo, J. Wang, P. G. Schultz, X.-D. Xiang, *Appl. Phys. Lett.*, eingereicht.
- [171] X. Sun, K.-A. Wang, Y. Yoo, W. G. Wallace-Freedman, C. Gao, X.-D. Xiang, P. G. Schultz, *Adv. Mater.* **1998**, *9*, 1046.
- [172] R. Nielsen, persönliche Mitteilung, **1997**.
- [173] P. G. Schultz, X.-D. Xiang, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **1998**, im Druck.
- [174] Y. Lu, T. Wei, F. Duewer, Y. Lu, N. B. Min, P. G. Schultz, X.-D. Xiang, *Science* **1997**, *276*, 2004.
- [175] E. D. Isaacs, M. Kao, G. Aeppli, X.-D. Xiang, X. Sun, P. G. Schultz, M. A. Marcus, G. S. I. Cargill, R. Haushalter, *Appl. Phys. Lett.*, im Druck.
- [176] F. C. Moates, M. Somani, J. Annamalai, J. T. Richardson, *Ind. Eng. Chem. Res.* **1996**, *35*, 4801.
- [177] H. Weinberg, persönliche Mitteilung, **1998**.
- [178] G. Briceño, H. Chang, P. G. Schultz, X.-D. Xiang, *Science* **1995**, *270*, 273–275.
- [179] H. Weinberg, *Science* **1998**, im Druck.
- [180] C. L. Hill, R. D. Gall, *J. Mol. Catal. A* **1996**, *114*, 103.
- [181] S. Brocchini, K. James, V. Tangpasuthadol, J. Kohn, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4553.
- [182] T. A. Dickinson, D. R. Walt, J. While, J. S. Kauer, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3413.
- [183] I. Takeuchi, H. Weinberg, unveröffentlichte Ergebnisse.