

Das erweiterte genetische Alphabet

Denis A. Malyshev und Floyd E. Romesberg*

Stichwörter:

Basenpaare · DNA · Hydrophobie ·

Semisynthetischer Organismus ·

Nichtnatürliche Nucleotide



Sein dem letzten gemeinsamen Vorfahren allen Lebens auf der Erde wird die gesamte biologische Information durch ein genetisches Alphabet codiert, das aus nur vier Nucleotiden und den von ihnen gebildeten zwei Basenpaaren besteht. Aus langjährigen Versuchen, aus zwei synthetischen Nucleotiden ein drittes, nichtnatürliches Basenpaar (UBP) zu formen, haben sich jetzt drei vielversprechende Kandidaten herauskristallisiert. Eines dieser UBPs basiert auf alternativen Wasserstoffbrücken, während die beiden anderen durch hydrophobe Kräfte und Stapelkräfte stabilisiert werden. Alle drei dieser UBPs werden bemerkenswert effizient und zuverlässig repliziert und transkribiert. Die beiden letztgenannten UBP-Typen belegen, dass nicht nur auf Basis von Wasserstoffbrücken Erbinformation gespeichert und wieder abgerufen werden kann. Dieser Aufsatz beschreibt die jüngsten Entwicklungen auf dem Gebiet der UBPs sowie ihre mögliche Anwendungen, einschließlich der Erweiterung der Evolution um den Einbau neuer Funktionalität sowie der Erschaffung semisynthetischen Lebens, das zusätzliche Information speichern kann.

1. Einleitung und Überblick

Die DNA enthält den Lebenscode. Kein anderes Molekül hat mehr Aufmerksamkeit auf sich vereinigen und die Fantasie von Wissenschaftlern und Laien mehr beflügeln können. In rein chemischer und physikalischer Hinsicht ist das Polymer DNA als bloße Aneinanderreichung der Desoxyribonucleotide dG, dC, dA und dT eher unspektakulär. Ihre einzigartige Wirkung erzielt die DNA durch die sequenzspezifische Bildung einer Doppelstrangstruktur, ihre sequenzspezifische Replikationsfähigkeit und ihre sequenzspezifische Umbeschreibung in RNA, die aus den Ribonucleotiden G, C, A und U besteht. Die Sequenzspezifität wird erreicht, indem sich zwischen den vier Buchstaben des genetischen Alphabets selektiv Paare aus jeweils zwei unterschiedlichen Basen bilden, nämlich zwischen (d)G und (d)C sowie (d)A und dT oder U. Die Decodierung von der Nucleotid- in eine Proteineinsequenz erfolgt ebenfalls durch die gleiche Basenpaarung, nur dann zwischen mRNA und tRNA. Diese selektive Basenpaarung ist es, die dieses ansonsten eher unscheinbare Molekül DNA zum Code für die ganze Vielfalt des Lebens macht.

Seit der ersten Formulierung der Idee vor mehr als 50 Jahren^[1] verfolgen die Chemiker das Ziel, mit synthetischen Nucleotiden möglicherweise ein drittes, nichtnatürliches Basenpaar (unnatural base pair, UBP) herzustellen und somit das genetische Alphabet zu erweitern. Für ein solches UBP gäbe es sehr vielfältige In-vitro-Anwendungsmöglichkeiten, besonders wenn an ein oder an beide Nucleotide dieses Basenpaares mit speziellen Linkern funktionelle Gruppen mit besonderen physikochemischen Eigenschaften angeheftet werden können. Auch für das aufstrebende Gebiet der synthetischen Biologie gelten UBPs, die innerhalb einer Zelle besondere Funktionen ausüben können, als zentrales Entwicklungsziel. Mit solchen Bausteinen ließe sich semi-

Aus dem Inhalt

1. Einleitung und Überblick	12099
2. UBPs mit alternativen H-Brücken	12100
3. Konzeptionelle Erwägungen	12101
4. Überwiegend hydrophobe UBPs	12103
5. Strukturstudien	12105
6. In-vitro-Anwendungen	12107
7. UBPs und semisynthetische Organismen	12108
8. Bedeutung und Ausblick	12109

synthetisches Leben mit neuen und nützlichen Attributen und Funktionen erschaffen.

Während Nucleotide mit modifizierten Zucker^[2–5] oder Phosphatresten^[6,7] bereits intensiv erforscht wurden und schon wichtige Anwendungen finden, müssen für die Generierung eines UBP die Nucleobasen selbst modifiziert werden, denn nur diese sind für die Paarbildung verantwortlich. Eine Reihe von Nucleotiden mit Nucleobase-Analogen wurde bereits synthetisiert und beschrieben,^[8–10] und manche davon bilden auch stabile Paare innerhalb eines ansonsten natürlichen Doppelstrangs.^[11–19] Viel schwieriger ist die effektive und zuverlässige Replikation einer solchen UBP-DNA. Ein Jahrzehnt lang stammten die einzigen vielversprechenden Kandidaten aus den frühen Arbeiten der Gruppe um Benner.^[20,21] Diese ersten UBPs waren so aufgebaut, dass sie über komplementäre Wasserstoffbrücken, die die natürlichen Nucleotide so nicht aufweisen, miteinander wechselwirken. Es gibt allerdings keinen Grund zur Annahme, dass solche H-Brücken die einzige Kraft zur Speicherung und Abrufung von Erbinformation sein sollten. Wir^[22] und andere^[12,23–26] haben zum Beispiel auch Metalle als Paarbildner untersucht. Am intensivsten wurden jedoch hydrophobe Kräfte und Stapelkräfte (einschließlich der Stapelwechselwirkungen aromatischer Ringe) für die Paarbildung nichtnatürlicher Nucleobasen erforscht, und zusätzlich zu den optimierten ursprünglichen UBPs mit alternativen H-Brücken bilden mittlerweile viele hauptsächlich hydrophobe UBPs eine kleine Gruppe von Kandidaten, die bereits einen sehr hohen Entwicklungsstand erreicht haben (Abbildung 1). Die Entwicklung dieser UBPs bis zum Zeitpunkt vor etwa zehn Jahren wurde bereits ausführlich referiert.^[27–30] Der Schwer-

[*] Dr. D. A. Malyshev, Prof. F. E. Romesberg
Department of Chemistry, The Scripps Research Institute
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)
E-Mail: floyd@scripps.edu

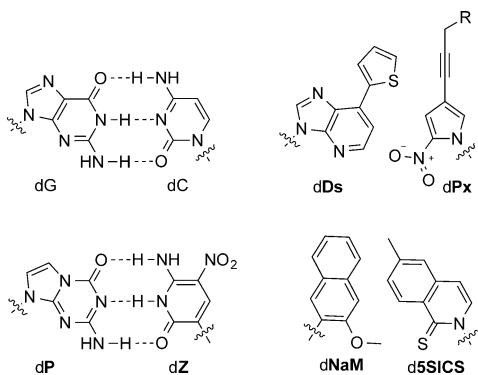


Abbildung 1. Natürliches dG-dC-Basenpaar sowie die dZ-dP-, dDs-dPx- ($R=H$ oder $-CH(OH)-CH_2OH$) und dNaM-d5SICS-UBPs. Zucker- und Phosphatreste wurden weggelassen.

punkt dieses Aufsatzes liegt auf den aktuellen Entwicklungen; die älteren Arbeiten werden nur im Zusammenhang angesprochen. Wichtig sind auch die Kräfte, die der Replikation von DNA mit hauptsächlich hydrophoben UBPen zugrunde liegen; diese wollen wir hier auch erläutern. Abschließend betrachten wir die momentanen und zukünftigen Anwendungsgebiete, einschließlich der Herstellung des ersten semisynthetischen Organismus mit stabil eingebauter UBP-DNA.

2. UBP mit alternativen H-Brücken

1962 beschrieb Alexander Rich die mögliche Basenpaarung der Konstitutionsisomere von dC und dG, *disoC* und *disoG* (Abbildung 2). Diese sollten über ein komplementäres H-Brückenmuster, das dem der natürlichen Basenpaare ähnelt, aber doch charakteristische Unterschiede aufweist, selektiv ein Basenpaar bilden. Erst dreißig Jahre später untersuchten die Gruppen von Rappaport^[31,32] und Benner^[20,21] dieses UBP genauer. Zehn Jahre lang konnten dabei Benner

et al. zunächst mit der *disoC*-*disoG*-, anschließend mit der *dk*-*dX*-Paarung den Stand der Forschung für sich behaupten (Abbildung 2). Höhepunkte dieser Arbeiten waren die zu- mindest moderate Replikation der *disoC*-*disoG* enthaltenden DNA durch das Klenow-Fragment der *Escherichia coli*-DNA-Polymerase I (Kf)^[20] und später die erfolgreiche De- codierung der *iso-C* mit Zellextrakten und synthetischer tRNA am Ribosom.^[33]

Ein Problem dieser ersten UBP-Kandidaten waren jedoch die Desaminierung und Epimerisierung von *disoC* und *dk*, die durch Tautomerisierung von *disoG* verursachte Fehlpaarung mit dT/U und die schwache Transkription von *disoG* enthal- tender DNA zu *isoC* enthaltender RNA.^[34,35] Später konnte man die Fehlpaarung durch Verwendung von 2-Thio- thymidindesoxyribonucleosidtriphosphat anstelle des natürlichen dTTP teilweise kompensieren und so die erste Poly- merasekettenreaktion(PCR)-vermittelte Amplifikation von DNA, die ein UBP enthielt, durchführen. Dies war ein Meilenstein in der UBP-Forschung und -Entwicklung.^[36] Allerdings verlief diese UBP-Replikation nur zu 98 %^[36] se- quenzgetreu (in diesem Manuskript beziehen sich die Be- griffe „Sequenztreue“ oder „Zuverlässigkeit“ (engl.: fidelity) auf die Erhaltung des UBP pro DNA-Verdopplung), was nach 20 PCR-Durchgängen ($0.98^{20} = 0.668$ verbleibende UBP) ein Drittel verlorener UBP bedeutet. Dieser Wert ist für die meisten Anwendungen viel zu hoch. Später beschrie- ben Benner et al. dann die stabileren, nicht epimerisierenden dZ- und dP-Nucleotide (Abbildung 1),^[37,38] die bei ihrem DNA-Einbau UBPen bilden, die unter PCR-Bedingungen zu 99.8 % zuverlässig vervielfältigt werden.^[39] Eine aktuelle Arbeit berichtet von der Transkription und reversen Tran- skription von dZ-dP.^[40]

Im Jahr 2000 beschrieben Hirao und Mitarbeiter die Bil- dung orthogonaler H-Brücken zwischen dem Purinanalogen *dx* und dem Pyridonanalogen *dy* für die UBP-Bildung (Ab- bildung 3).^[41,42] Um die Fehlpaarung von *dx* mit natürlichen Nucleotiden zu verringern, entwickelte die Gruppe im fol- genden Jahr durch Austausch der Dimethylaminogruppe von *dx* gegen die stärker raumfüllende aromatische Thiophenyl- einheit *ds* das Paar *ds*-*dy*.^[43] Während fehlgepaartes *dy* (hauptsächlich mit dA) durch die PCR nicht vervielfältigt wurde, ließ sich die *ds* enthaltende DNA in *y* enthaltende mRNA transkribieren. Unter Zugabe von synthetischer, s- haltiger tRNA erfolgte anschließend die Translation dieser mRNA in ein Protein mit der nichtnatürlichen Aminosäure 3- Chlortyrosin.^[44] Dagegen verlief die Transkription von *dy*

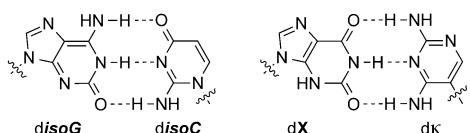
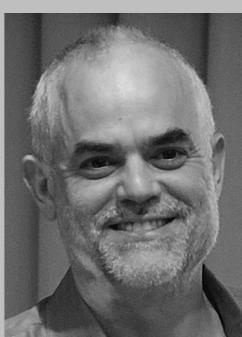


Abbildung 2. Die *disoC*-*disoG*- und *dX*-*dk*-UBPs. Zucker- und Phos- phatreste wurden weggelassen.



Denis Malyshev graduierte 2008 vom Higher Chemical College der Russischen Akademie der Wissenschaften. 2013 wurde er am Scripps Research Institute bei Prof. Floyd Romesberg promoviert. Derzeit ist er bei Synthorx Inc. als Wissenschaftler ange- stellt und entwickelt neue Biomoleküle mit nichtnatürlichen Bausteinen für Anwendun- gen im Bereich der Lebenswissenschaften und der Biotechnologie.



Floyd Romesberg studierte an der Ohio State University Chemie und promovierte an der Cornell University bei David Collum. Als Postdoktorand arbeitete er bei Peter Schultz an der UC Berkeley. Seit 1998 gehört er der Fakultät des Scripps Research Institute an. Seine Arbeit befasst sich mit der Erweiterung des genetischen Alphabets, neuen Ansätzen zur Bekämpfung von Bakterien und dem Verständnis der Dynamik in der Proteinevo- lution und -funktion.

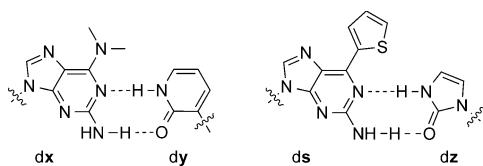


Abbildung 3. Die dx-dy- und ds-dz-UBPs. Zucker- und Phosphatreste wurden weggelassen.

enthaltender DNA in s enthaltende RNA nicht zuverlässig. Um die Fehlpaarung von dy mit dA zu minimieren, wurde dz entwickelt. Der Austausch des Pyridongerüsts gegen die kleinere cyclische Dehydroimidazoloneinheit sollte die Paarbildung von dz mit ds ermöglichen (Abbildung 3). Allerdings wurden dzTP und zTP durch die DNA- bzw. RNA-Polymerase nicht ausreichend gut erkannt.^[45]

3. Konzeptionelle Erwägungen

Zu den Kräften, die für die Replikation natürlicher DNA relevant sind, gehören klar die komplementären H-Brücken zwischen den natürlichen Nucleobasen. Vor 15 Jahren stellten jedoch Kool und Mitarbeiter fest, dass die Kf-Polymerase selektiv auch die Basenpaarung von dA mit dF vermittelt. dF als Difluortoluol-Nucleobase entspricht in ihrer Gestalt Thymin, allerdings ist dessen H-Donorgruppe N-H mit einer C-H-Gruppe vertauscht, und anstelle der H-Akzeptor-Carbonylgruppen liegen C-F-Bindungen vor.^[46,47] Inwieweit das Fluoratom H-Brücken bildet, ist seit langem Gegenstand intensiver Diskussionen,^[48,49] in jedem Fall aber ist die H-Brückenbindung von F···H viel schwächer als die zu ersetzende Bindung (neuere Schätzungen gehen von einer 3.8 kcal mol⁻¹ schwächeren Bindung aus),^[49] und DNA-Primer mit dF-dA am Ende werden nicht effizient verlängert. Andererseits wurde die selektive Paarung von dF mit dA als Nachweis für „geometrische Selektion“ bei der DNA-Replikation interpretiert (zum gleichen Schluss kam unabhängig davon auch Goodman).^[50,51] Dies zeigt deutlich, dass zur DNA-Synthese auch andere Kräfte als H-Brücken beitragen können. Solche Kräfte könnte man für eine UBP-Replikation nutzen.

Dass die Stabilität der DNA-Duplexstruktur nicht allein auf H-Brücken beruht, ist seit langem klar.^[52–56] Allerdings sollte man bei der Bewertung des genauen Beitrags dieser Kräfte zur Replikation vorsichtig sein, denn das aktive Zentrum der Polymerase bietet eine besondere und noch nicht vollständig verstandene Umgebung. So hat man bereits vor Jahrzehnten festgestellt, dass Destabilisierung infolge von Basenfehlpaarung im Doppelstrang nicht ausschlaggebend für die Zuverlässigkeit der DNA-Replikation ist.^[57,58] Bedenkt man, dass Triphosphate während der DNA-Synthese nach Verlassen ihrer wässrigen Umgebung zum Teil ähnliche Wechselwirkungen eingehen wie die Nucleobasen untereinander bei der Stabilisierung des DNA-Doppelstrangs, könnte man annehmen, dass solche Kräfte auch bei der DNA-Synthese eine Rolle spielen.^[59]

Eine bekannte Kraft, die die Bildung der Doppelstruktur begünstigt, ist der hydrophobe Effekt.^[54,60,61] Qualitativ kann man den hydrophoben Effekt als die Wechselwirkung be-

schreiben, die zur Aggregat- oder Clusterbildung von hydrophoben Einheiten in Wasser beiträgt. Der hydrophobe Effekt spielt bei der Micellenbildung und ebenso bei vielen biologischen Vorgängen wie der Membranbildung, der Proteinfaltung und der molekularen Erkennung eine entscheidende Rolle. Um ihn zu verstehen, zieht man nach wie vor das Water-Ordering- oder Iceberg-Modell von Frank und Evans aus dem Jahr 1945 heran.^[62] Diesem zufolge neigt ein unpolares Molekül dazu, Wassermoleküle aus seiner Umgebung in eine kristall- oder clathratartige Käfigstruktur zu zwingen, in der trotz der Krümmung eine maximale Anzahl von H-Brücken erhalten bleibt. Dieser Mechanismus erklärte zunächst sehr gut die überraschende Beobachtung, dass der hydrophobe Effekt entropieabhängig ist. Später erkannte man aber, dass bei steigender Temperatur oder bei größeren Molekülen der hydrophobe Effekt vor allem mit der Enthalpieänderung zusammenhängt. Daher wurde das ursprüngliche Iceberg-Modell um die variable Clathratstabilität erweitert.^[63–66] Im Einzelnen bedeutet dies, dass sich bei Temperaturerhöhung die H-Brücken der Clathratstruktur vor denen der reinen Wasserphase öffnen. Deshalb kann sich um große, hydrophobe Moleküle herum, besonders um solche mit geringer Oberflächenkrümmung, ein H-Brückennetzwerk nicht lange halten. Sind die unpolaren Moleküle daher groß genug oder steigt die Temperatur zu stark an, schwächt sich die Ordnung ab, und die positive Mischungsentropie oder die negative Enthalpie aus dem Bruch der Wasserstoffbrücken dominieren die Änderung in der freien Enthalpie. Obwohl neuere Arbeiten Hinweise darauf geben, dass auch die Verlagerung von energiereichen Wassermolekülen die Bindung von hydrophoben Molekülen an geordnete Umgebungen wie Proteine oder DNA fördern kann,^[67] bleibt das überarbeitete Iceberg-Modell das derzeit einzige Modell zum hydrophoben Effekt, das allgemein akzeptiert ist.

Wie eine Reihe von Arbeiten zeigte, kann man den hydrophoben Effekt nutzen, um Nucleotide mit hauptsächlich hydrophoben Nucleobasen in eine stabile Paarung zu bringen. Kool und Mitarbeiter führten hierfür den Dangling-End-Assay ein, bei dem das entsprechende Nucleotid an ein Doppelstrangende gebunden wird und dort ohne H-Brückenpartner mit den benachbarten Nucleobasen wechselwirkt. Weil die Stabilität des Doppelstrangs einzig von der Oberfläche der Nucleobase abhing, wurde gefolgert, dass hauptsächlich der hydrophobe Effekt für den Stabilitätsgewinn verantwortlich war.^[68] In einer anderen Studie interpretierten Leumann und Mitarbeiter ihre Beobachtung, dass die Stabilität von DNA mit fluorierte Biphenylringe enthaltenden Nucleotidpaaren von der Entropie abhing, als Beleg für den hydrophoben Effekt.^[69] Dass die Paarung von Nucleotiden mit hydrophoben Nucleobasen durch den hydrophoben Effekt stark beeinflusst wird, zeigten auch Rechnungen von Hobza und Mitarbeitern.^[70,71]

Es gibt einen Konsens darüber, dass der hydrophobe Effekt einen großen Anteil an der Einbindung des aromatischen Anteils von Nucleobasen in das hydrophobe Zentrum des Doppelstrangs hat; welche Rolle die Nicht-H-Brückenkräfte für die Assoziation der Nucleobasen genau spielen, wird aber noch kontrovers diskutiert. Ursprünglich gab es zwei unterschiedliche Sichtweisen: Nach einer Meinung

überlappen die Nucleobasen unter der Wirkung von dispersiven Kräften (Modell der Korrelation von Elektronen).^[72] Die andere Meinung konzentrierte sich auf die Wechselwirkungen, die zwischen den permanenten Dipolen der exocyclischen Gruppen einer der beiden Nucleobasen und der delokalisierten Elektronendichte der anderen auftreten (Induktionsmodell).^[73] Obwohl das zweite Modell auch von Strukturdaten gestützt wird (nach denen polare exocyclische Gruppen sich eher oberhalb des Rings einer benachbarten Nucleobase befinden),^[73,74] identifizierten immer genauere Rechenmodelle übereinstimmend dispersive Wechselwirkungen als die entscheidenden Kräfte.^[75–77] So sprechen Rechnungen von Hobza und Mitarbeitern dafür, dass trotz der dominanten Rolle des hydrophoben Effekts für die Assoziation von Nucleobasen doch die dispersiven Wechselwirkungen die gebildete spezifische Struktur bestimmen.^[78] Eine Art Kompromiss zwischen den beiden Sichtweisen bieten neuere theoretische Studien zur Topologie der berechneten Elektronendichte. Demnach kommt es an spezifischen Atomen wie den Stickstoffatomen im Ring und den polaren Amino- und Carbonylsubstituenten zu bindenden Wechselwirkungen mit den flankierenden Nucleobasen.^[79–81] Deshalb liegt der Forschungsschwerpunkt wieder auf den lokalen Wechselwirkungen durch die spezifischen Atome im Ring und den Substituenten der Nucleobasen.

Überlappungen zwischen Nucleobasen in einem DNA-Doppelstrang, die sich zumindest teilweise während der Replikation entwickeln, sind ein Beispiel für allgemeinere molekulare Wechselwirkungen zwischen aromatischen Ringen. Solche Wechselwirkungen werden seit Jahrzehnten unter der allgemeinen Bezeichnung π - π -Stapelung intensiv erforscht. Neuere Arbeiten weisen jedoch auf einen Übergebrauch und sogar möglichen Falschgebrauch dieses Begriffs hin.^[82,83] Das konventionelle Modell von Hunter und Sanders bezieht sich insbesondere auf die Abstoßungskraft zwischen π -Wolken und konzentriert sich auf die elektrostatischen Quadrupol-Quadrupol-Wechselwirkungen, die zu einer Anziehung zwischen den negativ geladenen π -Elektronen eines Rings und dem positiv geladenen σ -Gerüst des anderen führen.^[84] Diese Studien erklären sehr gut die ansonsten verblüffende Kante-Fläche-Geometrie bei Benzol und die versetzte oder parallel verschobene Geometrie vieler anderer Arene. Allerdings weisen auch hier neuere Rechnungen auf die besondere Bedeutung der dispersiven Kräfte hin, die aus dem engen Kontakt der wechselwirkenden Ringe folgen. Diese Kräfte ließen sich in den frühen Arbeiten wegen der hohen theoretischen Niveaus, die hierfür erforderlich sind, noch nicht bestimmen.^[85–88]

Die Auswirkung von verschiedenen Substituenten auf die Ringstapelung wurde an kleinen Molekülen eingehend untersucht. Nach der klassischen Meinung, die sich im Hunter-Sanders-^[84,89–92] und Polar/ π -Modell von Cozzi und Siegel wiederspiegelt,^[93–97] sind die Substituenteneffekte nichtlokale Effekte infolge von Polarisation und Resonanz innerhalb des substituententrägenden Rings und haben so Einfluss auf die repulsiven Wechselwirkungen zwischen aromatischen Elektronen. Insofern sollten elektronenziehende und -schiebende Substituenten die Wechselwirkungen zwischen zwei Ringen stabilisieren bzw. destabilisieren. Rechnungen auf hohem

theoretischem Niveau haben jetzt jedoch sehr klar gezeigt, dass sowohl elektronenziehende als auch -schiebende Substituenten die Wechselwirkung zwischen zwei aromatischen Ringen stabilisieren können.^[98–101] Nach Rechnungen der Gruppen um Wheeler und Houk^[102–105] kann dieses Ergebnis durch Substituenteneffekte erklärt werden, die sich nicht über die aromatischen Ringe und die assoziierten Resonanzeffekte entfalten, sondern als direkte Wechselwirkungen zwischen dem lokalen Dipol am Substituenten und dem elektrischen Feld des anderen Rings zu verstehen sind; zusätzlich sind auch lokale dispersive Wechselwirkungen infolge der polarisierten Bindung zu berücksichtigen. Das Wheeler-Houk-Modell wurde jüngst durch Rechnungen von Sherrill und Mitarbeitern auf hohem theoretischem Niveau gestützt und verfeinert.^[106] Neueste experimentelle Befunde lassen auf größtenteils additive Substituenteneffekte schließen, was unvereinbar mit dem Resonanzmodell scheint und ebenfalls das Wheeler-Houk-Modell stützt.^[107]

Auch die Wechselwirkungen zwischen heterocyclischen Arenen wurden untersucht. Rechnungen haben ergeben, dass eine Verstärkung der elektrostatischen Wechselwirkungen mit mehr Stickstoffatomen im Ring einhergeht, diese Stabilisierung aber durch eine stärkere Austauschabstoßung wieder ausgeglichen wird. Diese Tatsache, zusammen mit sich nur schwach ändernden Induktionstermen, macht die dispersiven Kräfte dominant.^[108] Andererseits legen Rechnungen von Sherrill nahe, dass eine Aza-Substitution sowohl die Dispersions- als auch die Austauschabstoßungskräfte ab schwächt und dass die elektrostatischen Effekte einer Aza-Substitution durch direkte Wechselwirkungen zwischen der lokalisierten Elektronendichte des Azasubstituenten und einem elektronenarmen Wasserstoffatom des wechselwirkenden Rings bestimmt werden.^[109] Liedl und Mitarbeiter beschreiben in einer neuen Arbeit, wie sich die Substitution mit Heteroatomen auf die Stabilität von aromatischen Ringen auswirkt, die in parallel versetzter Geometrie vor liegen.^[110] Ihre Ergebnisse führen zur allgemeinen Aussage, dass die Komplexstabilität stark von der Position der Substituenten beeinflusst wird, denn wenn ein elektronegatives Atom (insbesondere Stickstoff) dichter an das Zentrum hoher Elektronendichte des wechselwirkenden Ringes herangerückt wird, hat dies eine destabilisierende Wirkung. Die Stabilität und die spezifische Geometrie der bevorzugt eingenommenen Struktur wurden so interpretiert, dass sie sowohl durch eine ungerichtete disperse als auch eine stärker gerichtete elektrostatische Wechselwirkung hervorgerufen werden. Die Unterschiede in der Stabilität und der bevorzugten Struktur korrelieren stark mit der Größe des Dipolmoments am Heteroatom.

Die Wechselwirkungen zwischen aromatischen Ringen wurden auch experimentell an Modellsystemen untersucht.^[111–115] Allgemein sind die experimentellen Befunde in Einklang mit der derzeit gültigen theoretischen Sichtweise: Vorherrschend ist der hydrophobe Effekt, und er wird moduliert durch Dispersionskräfte sowie lokale elektrostatische Wechselwirkungen.

Alle Studien stimmen darin überein, dass außer den komplementären H-Brücken auch der hydrophobe Effekt, die Lösungsmittelverdrängung (Desolvatation), Dispersions-

kräfte und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Nucleobasen zur Stabilisierung des DNA-Doppelstrangs beitragen können. Unklar blieb bislang, ob und wie diese Kräfte die Replikationseffizienz beeinflussen. Da außerdem eine Erhöhung der Doppelstrangstabilität durch diese Nicht-H-Brückenkräfte wenigstens zum Teil sequenzunabhängig ist, war es noch fraglicher, ob und wie diese Kräfte eine sequenzspezifische Replikation vermitteln können. Während diese Kräfte nach Kools Ergebnissen in Bezug auf dA-dF zumindest in manchen Fällen stark genug sind, um den Einbau des Triphosphats zu vermitteln, so kann doch nicht die Fehlpaarung mit einem natürlichen Nucleotid ausgeschlossen werden (aus Sicht der UBP-Entwicklung ist dF-dA eine Fehlpaarung). Daher war es nicht klar, ob die hydrophoben und Stapelwechselwirkungen ausreichend stark und spezifisch für die Entwicklung eines funktionalen UBP sind.

4. Überwiegend hydrophobe UBPs

Seit 1999 verfolgt unsere Gruppe das Ziel, ein UBP auf der Grundlage von hydrophoben Kräften und Stapelkräften herzustellen. Die entsprechende Strategie leitet sich aus der medizinischen Chemie ab, nämlich ein breites Spektrum von Verbindungsanaloga zu synthetisieren, zu evaluieren und anhand von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (structure–activity relationships, SARs) zu optimieren. Anfangs bezogen wir die kinetischen Daten für die SARs aus dem stationären Zustand und verwendeten sie zur Berechnung von Effizienz (d.h. der Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung) und Zuverlässigkeit (d.h. des Verhältnisses der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung von korrekter zu unkorrekter Paarung) der UBP-Synthese (d.h. des matrizengesteuerten Einbaus eines nichtnatürlichen Triphosphats gegenüberliegend zum jeweiligen ebenfalls nichtnatürlichen Nucleotidegegenstück) und der anschließenden Strangverlängerung (d.h. des Einbaus des nächsten korrekten Nucleotids). Nach der Optimierung der UBPs wurde die Replikation jedoch schon bald zu effizient, um sich nur durch die Kinetik im stationären Zustand charakterisieren zu lassen (aufgrund von Produktdissoziation als geschwindigkeitsbestimmendem Schritt, die aber für den weiteren Syntheseprozess nicht relevant ist). Daher richteten wir unser Augenmerk auf die Kinetik vor dem stationären Zustand (Prästationärkinetik) sowie die Effizienz und Zuverlässigkeit, mit der UBP-haltige DNA durch die PCR amplifiziert wird. Um die Allgemeingültigkeit der SAR-Daten zu gewährleisten, nahmen wir später auch multiple Polymerasen und den Sequenzkontext in die Studien mit auf.

Mit unseren Analoga der ersten Generation (bis zu 37 verschiedene synthetische Nucleotide) versuchten wir zu bestimmen, inwieweit die doppelstrangstabilisierenden H-Brücken durch den hydrophoben Effekt und die Stapelwechselwirkungen zu ersetzen sind. Unsere Nucleobasenanaloga waren im Wesentlichen von den relativ großen Isocarbostyrol-, Naphthyl- und Indolgerüsten abgeleitet (man beachte, dass die „Nucleobasen“ in vielen Fällen eigentlich nicht basisch sind, aber der Einfachheit halber wollen wir bei der Bezeichnung bleiben). Diese ursprünglichen Studien wurden

bereits ausführlich referiert.^[28,29] Ganz allgemein konnten wir eine Reihe von Paaren identifizieren, die recht selektiv stabile Paare in doppelsträngiger DNA bilden.^[116] In einigen Fällen erreichte ihre Syntheserate sogar die von natürlichen Basenpaaren,^[117] oder die Paarbildung erfolgte mit mindestens mittlerer Selektivität, was auf eine grundsätzliche Machbarkeit der Replikation anhand von hydrophoben und Stapelkräften schließen ließ.^[117,118] Allerdings war die Effizienz für die Strangverlängerung bei allen UBPs der ersten Generation nach der UBP-Bildung sehr schwach. Dieses Muster, dass nämlich die großen Nucleobasenanaloga der ersten Generation zwar effizient Paare bilden, der DNA-Strang sich aber nicht verlängern lässt, war bei diesen Nucleobasen der ersten Generation die auffälligste Struktur-Aktivitäts-Beziehung.

Die Strukturbestimmungen der DNA-Doppelstränge zeigten, dass die Paarbildung der UBPs der ersten Generation nicht gemäß Kante-Kante-Geometrie, sondern durch Interkalation der großen aromatischen Nucleobasen in das gegenüberliegende Strangsegment abläuft (siehe Abschnitt 5). Unserer Vermutung nach wird durch diesen Modus, der auf hydrophoben und dispersiven Kräften beruht, die Bildung von UBPs zwar begünstigt, aber die daraus folgende Fehlpositionierung des Primer-Endes verhindert die Primer-Verlängerung. Daher basierte unsere zweite Generation von Analoga, die letztlich 55 synthetische Nucleotide umfasste, meist auf dem Benzol-,^[119–121] Pyridin-^[122,123] oder Pyridongerüst,^[124] denn wir wollten herausfinden, ob sich kleinere Nucleobasen mit weniger Neigung zur Interkalation besser für die Replikation eignen. Vielleicht überraschend ließen sich von diesen UBPs der zweiten Generation viele stabil und selektiv in die doppelsträngige DNA einbinden, obwohl sie weder H-Brücken bildeten noch eine größere aromatische Oberfläche aufwiesen.^[121]

Unter diesen UBPs der zweiten Generation ließen sich einige mit wenigstens zufriedenstellender Effizienz herstellen und/oder ermöglichen eine DNA-Verlängerung.^[119,125–127] Allerdings führten Optimierungsversuche nur zu kaum veränderten SARs, die darüber hinaus noch einen möglichen Konflikt bei den erforderlichen physikochemischen Eigenschaften aufdeckten. Dieser bestand darin, dass der Substituent in *ortho*-Position zur glycosidischen Bindung in die sich bei der Replikation herausbildende kleine Furche hineinragen soll. Dieser Substituent muss für eine effiziente UBP sowohl bei der neu hinzukommenden Base als auch bei der Matrize hydrophob sein. Dies widerspricht aber den bekannten Voraussetzungen für eine effiziente Strangverlängerung, dass nämlich der Substituent an der Matrize hydrophob ist, der am Primer-Ende jedoch als H-Brückenakzeptor fungiert.^[122,124,125] Tatsächlich befinden sich die H-Brückenakzeptoren in analoger Position bei jeder natürlichen Nucleobase, und am Primer-Ende fungieren sie als Akzeptor für H-Brücken ausgehend von der Polymerase.^[128] Ohne diese Wechselwirkungen kann die Primer-Verlängerung nicht ablaufen, wie in biochemischen Studien nachgewiesen wurde.^[34,128–130]

Weil also die für die UBP-Bildung notwendigen physikochemischen Eigenschaften von denen für die Verlängerung abweichen, wird ein rationales Design problematisch. Daher entwarfen wir zwei unterschiedliche Screening-Programme,

um alle Paarbildungen, die zwischen den 60 unterschiedlichen Nucleotiden unserer ersten und zweiten Generation möglich waren, zu evaluieren (ca. 1800 mögliche UBP).^[131] An der Spitze beider Screenings stand das UBP aus **dMMO2** und **dSICS** (Abbildung 4). Interessant an diesem **dMMO2-dSICS**-

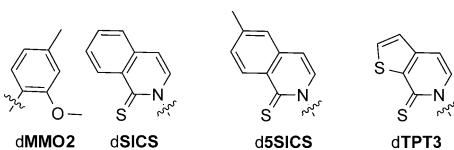


Abbildung 4. Das **dMMO2-dSICS**-UBP und die nichtnatürlichen Nucleotide **d5SICS** und **dTPT3**. Zucker- und Phosphatgruppen wurden weggelassen.

Paar war hierbei vor allem der Substituent in *ortho*-Stellung zur glycosidischen Verknüpfung, denn dieser kann möglicherweise den oben genannten Konflikt lösen. Das Schwefelatom von **dSICS** ist weicher und stärker polarisierbar als ein Sauerstoffatom und ist deshalb hydrophober, kann aber gleichwohl eine H-Brücke akzeptieren. Außerdem präsentiert sich die *O*-Methylgruppe von **dMMO2** als *ortho*-Substituent infolge einfacher Rotation entweder hydrophob als Methylgruppe oder als Sauerstoff-H-Brückenakzeptor.

Somit bildete das **dMMO2-dSICS**-UBP einen Ausgangspunkt für die dritte Generation von UBP-Kandidaten und führte rasch zum nächsten Paar, **dMMO2-d5SICS** (Abbildung 4), das die problematische Selbstpaarung von **dSICS-dSICS** verhindert.^[131] Anders als unsere UBPs der ersten und zweiten Generation wurde dieses Paar auch von vielen A-, B- und X-DNA-Polymerasen mit hoher Genauigkeit erkannt.^[132] Die geringste Effizienz während des Replikationsvorgangs von **dMMO2-d5SICS** liefert der Schritt, bei dem **dMMO2TP** gegenüber von **d5SICS** eingebaut wird. Im Zuge der Optimierung dieses Schritts erhielten wir das Paar **dNaM-d5SICS** (Abbildung 1),^[133,134] das sich um eine Größenordnung effizienter herstellen ließ.

dMMO2-d5SICS und **dNaM-d5SICS** waren Meilensteine in unserem Entwicklungsprogramm: Sie waren die ersten UBPs, mit denen nach Einbau in die DNA die Amplifikation durch PCR gelang.^[135] Tatsächlich verläuft die Amplifikation von **dNaM-d5SICS** enthaltender DNA massiv und verlustarm (d.h. 10²⁴-fache Amplifikation mit > 99.9 % Zuverlässigkeit). Bemerkenswert ist auch, dass die Amplifikation kaum Ansprüche an die Sequenz stellt.^[136] Diese effiziente, zuverlässige und sequenzunabhängige Replikation macht das **dNaM-d5SICS**-Paar besonders für Anwendungen interessant, bei denen randomisierte Matrizen wie für die SELEX massiv amplifiziert werden sollen (siehe Abschnitt 6). Wichtig ist auch, dass die T7RNA-Polymerase sowohl **dMMO2-d5SICS** als auch **dNaM-d5SICS** effizient in RNA transkribiert (d.h. **dMMO2** oder **dNaM** dirigieren den Einbau von entweder **MMO2** oder besonders auch **NaM** in RNA). Die Effizienz liegt nur ca. 30-fach unter der von natürlichen Nucleotiden und entspricht einer Zuverlässigkeit von 93–99 %.^[137]

Ungeachtet dieser effizienten und zuverlässigen Replikation und Transkription von **dNaM-d5SICS**-DNA hat man es noch immer mit einer insgesamt langsameren Replikation

als bei rein natürlichen Basenpaaren zu tun. Nachdem wir bei weiterer Optimierung eine kaum verbesserte SAR ermittelten hatten,^[134,138–140] begannen wir mit der Optimierung von **d5SICS**, da eine fortgesetzte Primer-Verlängerung nach Einbau dieses nichtnatürlichen Nucleotids die Replikation limitiert, und erhielten so **dTPT3** (Abbildung 4).^[141] Wir ergänzten diese Optimierung durch ein weiteres Screening von 111 nichtnatürlichen Nucleotiden (von denen viele Neusynthesen seit unserem ersten Screening waren). Folglich betrug die Anzahl möglicher UBP-Kandidaten etwa 6000.^[142] Aus diesem Screening gewannen wir eine ganze UBP-Familie, die gute Replikationseigenschaften aufwies (Abbildung 5).

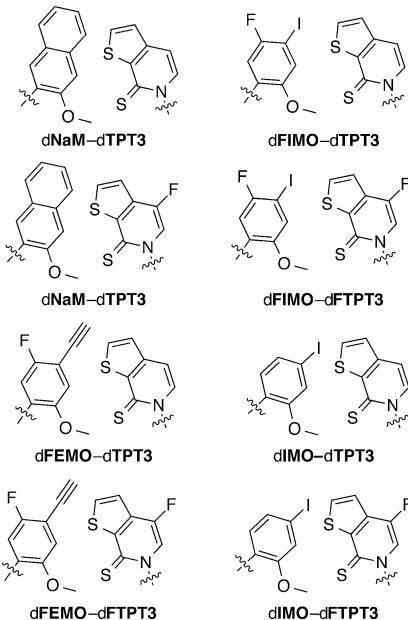


Abbildung 5. Die **dNaM-dTPT3**-UDP-Familie.

Während **dNaM-dTPT3** das bestreplizierte UBP blieb, verlief bei sämtlichen neuen UBPs die Replikation effizienter als für das ursprüngliche **dNaM-d5SICS**, das, wie in Abschnitt 7 beschrieben, bereits so gut repliziert wird, dass es *in vivo* verwendet werden kann. Daraus folgt, dass sich sämtliche dieser neuen UBPs für die praktische Anwendung eignen sollten.

Die Gruppe um Hirao beschäftigt sich seit 2003 mit überwiegend hydrophoben UBPs. Grundlage waren die von Kool entwickelten Basen **dQ** und **dF**, die hydrophobe Isostere von **dA** und **dT** sind (Abbildung 6).^[143,144] Um die Fehlpaarung mit **dA** zu verringern, entwickelte die Hirao-Gruppe zunächst **dPa** als **dQ**-Gegenstück^[145] und überführte danach

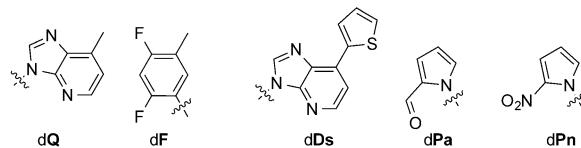


Abbildung 6. Das **dQ-dF**-UBP und die nichtnatürlichen Nucleotide **dDs**, **dPa** und **dPn**. Zucker- und Phosphatgruppen wurden weggelassen.

dQ durch eine raumfüllende Thienyleinheit in **dDs** (Abbildung 6). Das daraus resultierende **dDs-dPa** war das erste UBP, dass sich durch PCR mit einer Fehlerrate von unter 1% (das heißt >99 % Zuverlässigkeit) amplifizieren ließ.^[146] Wegen der möglichen **dDs-dDs**- und **dA-dPa**-Fehlpaarung verwendeten die Autoren allerdings das γ -Amidotriphosphat von **dDs** und **dA** (**dDsTP_N** bzw. **dATP_N**). Auch die Transkription des biotinylierten **Pa**-Analogs verlief äußerst zuverlässig (> 95 %).

Für die Weiterentwicklung des **dDs-dPa**-Paars wurde die Aldehydgruppe von **dPa** gegen eine Nitrogruppe ausgetauscht und so das **dPn**-Nucleosid erhalten (Abbildung 6).^[147] Die PCR-Amplifikation von **dDs-dPn** verlief noch zuverlässiger, und es war kein **dATP_N** erforderlich. Durch den Einbau einer zusätzlichen Propinyleinheit an **dPn** wurde das **dDs-dPx**-UBP (Abbildung 1, mit R = H) hergestellt, das nochmals eine bessere Zuverlässigkeit bei der PCR aufwies (> 99.9 %) und die Verwendung von **dDsTP_N** oder **dATP_N** unnötig machte.^[148]

Dass **d5SICS-dNaM** und seine Analoga ebenso wie **dDs-dPx** effizient und selektiv repliziert werden können, spricht klar dafür, dass auch andere Kräfte als nur H-Brücken für eine stabile und zuverlässige Replikation sorgen können, und zwar durch Optimierung von überwiegend hydrophoben Nucleobasen. Ungeachtet ihres im Wesentlichen empirischen Charakters zeigen die Studien einige generelle Trends auf: Allgemein sind die Daten konsistent mit einem übergeordneten hydrophoben Effekt sowie lokalen elektrostatischen und dispersiven Wechselwirkungen zwischen den (natürlichen und nichtnatürlichen) Nucleobasen. Diese Kräfte unterliegen den sterischen Anforderungen des aktiven Zentrums der Polymerase. Je nachdem, wo sich die Heteroatome im Nucleobasegerüst befinden, sind die Effekte positiv oder negativ, was im Wesentlichen mit elektrostatischen Wechselwirkungen und/oder der Desolvatation zusammenhängt. In der Regel wirkten sich Modifikationen am Triphosphat mehr aus als am Matrizen-Nucleosid. Wie schon erwähnt, vermittelt der Substituent in *ortho*-Position zur glycosidischen Bindung die für eine effiziente UBP-Synthese nötigen hydrophoben Packungswechselwirkungen, während er für die UBP-Verlängerung als H-Brückenakzeptor fungiert. Eine effiziente Replikation ist deshalb nur mit Substituenten möglich, die beides können. An der *meta*- und *para*-Position, in Richtung der entstehenden großen Furche, haben sich eine größere aromatische Oberfläche und andere Substituenten, die günstige lokale elektrostatische und dispersive Wechselwirkungen vermitteln können, als vorteilhaft für die UBP-Optimierung herausgestellt. Allerdings verschlechtern sie wiederum die Verlängerung, sodass man für eine effiziente Replikation diese Kräfte auf einem eher mittleren Niveau halten muss. Tatsächlich haben viele Modifikationen gegenläufige Effekte in UBP-Herstellung und Verlängerung, sodass man für eine Optimierung Kompromisse eingehen muss.

5. Strukturstudien

Die Strukturbestimmung von doppelsträngiger DNA mit Nucleotiden aus synthetischen Nucleobasen lieferte wertvolle

Informationen bezüglich der Kräfte, die UBPs stabilisieren und ihre Replikation fördern könnten. Die erste Struktur eines überwiegend hydrophoben UBP im DNA-Doppelstrang war die von **dF** mit einem hydrophoben Isoster von **dA** namens **dZ** (nicht zu verwechseln mit Benners Analogon desselben Namens; Abbildung 7).^[149] Der Doppelstrang nahm eine reguläre B-DNA-Struktur an, bei der die Nucleobasen im Stranginneren gepackt sind und die Basenpaarung planar über die Kanten erfolgt. Der C1'-C1'-Abstand des UBP war etwas größer (um 0.8 Å) als der in einem natürlichen Basenpaar, wahrscheinlich wegen des zusätzlichen Wasserstoffatoms zwischen den Analoga. Auch das **dPa-dQ**-Paar, das im Wesentlichen ein natürliches Purin-Pyrimidin-Paar nachahmt, hat in etwa die Struktur eines natürlichen Basenpaares im B-DNA-Doppelstrang (Abbildung 7).^[145] Selbst der abasische Paarungsmodus der großen Pyren-Nucleobasenanaloga führte zu keinen wesentlichen Änderungen in der B-Doppelstrangstruktur.^[150] Ähnliche Befunde gab es für verschiedene andere DNA-^[25, 151–154] und RNA-Strukturen,^[155] die zumindest teilweise hydrophobe Nucleobasenanaloga enthielten. Man kann daher davon ausgehen, dass der DNA-Doppelstrang diese Nucleobasen aufnehmen kann und dabei seine natürliche Geometrie nicht übermäßig verändert.

Beschrieben wurden auch Doppelstrangstrukturen mit den UBPs **dPICS-dPICS** (einem unserer UBPs der ersten Generation, das ein „Selbstpaar“ zwischen zwei identischen **dPICS**-Analoga ist und effizient synthetisiert wird, aber keine Strangverlängerung eingeht; siehe Abschnitt 4),^[154] **d3FB-d3FB** (einem UBP der zweiten Generation),^[119] **dMMO2-d5SICS**^[138] und **dNaM-d5SICS**^[156] (Abbildung 7). Anders als in den zuvor beschriebenen Strukturen wies die NMR-DNA-Struktur mit dem **dPICS**-Selbstpaar keine planare Kante-Kante-Paarung auf, sondern eine Paarung durch Interkalation in den jeweils gegenüberliegenden Strang. Während das **d3FB-d3FB**-UBP der zweiten Generation in der Röntgenkristallstruktur eine Kantenpaarung zeigte, wiesen die NMR-Strukturen von **dMMO2-d5SICS** und **dNaM-d5SICS** wiederum Interkalationen auf. Das *ortho*-Schwefelatom und die Methoxygruppe ragten in die kleine Furche des Doppelstrangs hinein, mit Drehung der Methoxygruppe aus der Planarität heraus, um mit dem Schwefelatom von **d5SICS** Van-der-Waals-Kontakte einzugehen. Die Kontaktfläche für die Stapelwechselwirkungen zwischen den Nucleobasen bildeten die Methylgruppe und der nächstliegende Teil des aromatischen Rings von **d5SICS** sowie der *para*-Substituent von **dMMO2** oder **dNaM**. Diese Basenpaare haben aber eine etwas andere Geometrie und/oder sind kleiner als das **dPICS**-Selbstpaar und überlappen deshalb etwas weniger. Anhand von Molecular-Modeling-Studien, ¹H-NMR-spektroskopischer Analyse und Studien zum Circular dichroismus kamen Leumann und Mitarbeiter zum Ergebnis, dass die Paarbildung von Biaryl-nucleotiden nach einem solchen Interkalationsmodus abläuft.^[13, 14, 157] Dieser Modus wurde später durch NMR-Strukturdaten bestätigt (Abbildung 7).^[158] Auch eine Art Reißverschlussstruktur ist möglich, wenn der Doppelstrang anstelle von Nucleobasen Nucleotide mit mehreren aromatischen Chromophoren enthält, von denen jedes einzelne in den Gegenstrang interkaliert (Übersichten in Lit. [159, 160]). Der Interkalationsmodus scheint also alle-

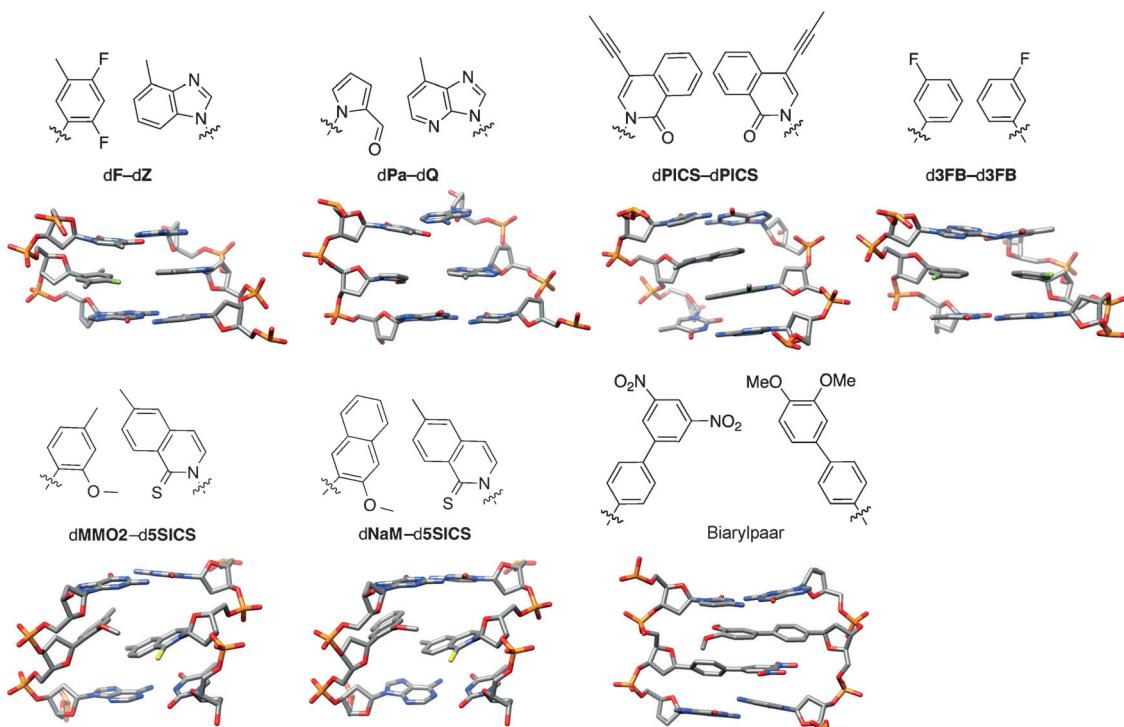


Abbildung 7. UDP-Strukturen. Zucker- und Phosphatgruppen wurden weggelassen.

mein für die Paarung großer aromatischer Nucleobasenanaloga zu gelten und unterstreicht die große Rolle, die hydrophobe und dispersive Kräfte dabei spielen.

Auch wenn der Interkalationsmodus eindeutig die UBP-Stabilität erhöht, ähnelt die dadurch entstehende Struktur im DNA-Doppelstrang doch eher einer Fehlpaarung als einem natürlichen Basenpaar. Daher ist nicht so leicht zu erklären, weshalb die UBPs so effizient und zuverlässig repliziert werden. Nach dem allgemein anerkannten Erkennungsmechanismus bindet die Polymerase zunächst das korrekte (natürliche) Triphosphat und bewirkt dadurch eine ausgedehnte Konformationsänderung einschließlich des Schließens der Fingerdomänen über den Domänen von Handteller und Daumen. Es entsteht ein geschlossener, starrer Komplex, der geometrisch die konservierte Watson-Crick-Struktur eines natürlichen Basenpaares selektiert.^[50,51,161–164] Um diesen scheinbaren Widerspruch zu klären und den Mechanismus der UBP-Synthese zu erforschen, charakterisierten wir in Kooperation mit der Marx-Gruppe röntgenkristallographisch die Struktur von mehreren KlenTaq-Komplexen (KlenTaq ist das große Fragment der Taq-DNA-Polymerase I; Abbildung 8).^[156] Ein Vergleich der binären und ternären Komplexe ergab, dass mit d5SICSTP als hinzukommender Base und dNaM in Matrizenposition die Polymerase die gleichen großen Konformationsänderungen eingeht wie mit einem entsprechenden natürlichen Triphosphat^[163,165,166] (Abbildung 8). Tatsächlich haben die ternären Polymerasekomplexe mit natürlichen und nichtnatürlichen Substraten bezüglich der Wechselwirkungen zwischen den Triphosphaten, der Orientierung der Seitenketten im aktiven Zentrum und selbst der gebundenen Metallionen eine bemerkenswerte Ähnlichkeit. Interessanterweise nehmen bei geschlossenem Komplex

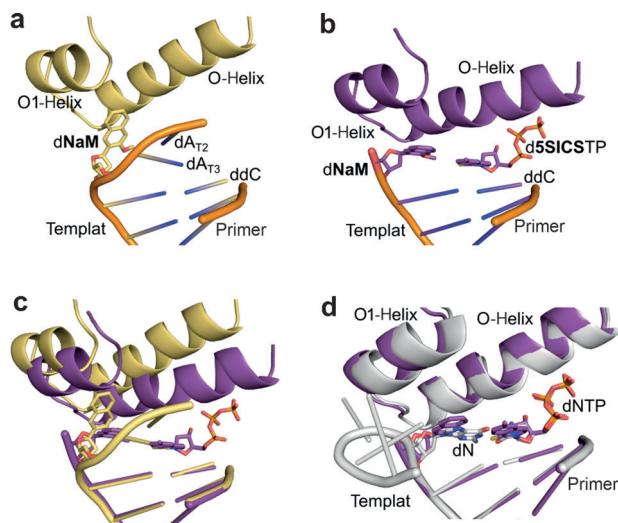


Abbildung 8. Infolge von Induktion durch die KlenTaq-Polymerase nimmt das dNaM-d5SICS-UDP eine natürliche Watson-Crick-Struktur an. a) Struktur des binären Polymerase-Matrize-Komplexes; b) Struktur des ternären Polymerase-Matrize-d5SICSTP-Komplexes; c) Überlagerung des binären und des ternären Komplexes; d) Überlagerung des ternären Komplexes, in dem d5SICSTP mit dNaM gepaart ist, mit dem ternären Komplex, in dem dGTP mit dC gepaart ist. Wiedergabe aus Lit. [156].

die Nucleobasen während der UBP-Bildung im aktiven Zentrum der Polymerase nicht die Interkalationsstruktur wie im freien Doppelstrang ein, sondern liegen coplanar mit nahezu optimaler Kante-Kante-Ausrichtung vor. Der C1'-C1'-Abstand zwischen den Nucleotiden entspricht grob dem

eines natürlichen Basenpaares (11.0 gegenüber 10.6 Å bei einem natürlichen Basenpaar, verglichen mit 9.1 Å für dNaM-d5SICS im freien Doppelstrang). Im Unterschied dazu hat der Komplex von KlenTaq mit d5SICS-Matze und zugegebenem dNaMTP nicht den katalytisch aktiven geschlossenen Zustand.^[167] Der Zustand ist vielmehr teilweise geschlossen, wobei sich d5SICS in Richtung der Insertionsstelle bewegt und das dNaMTP über seine Triphosphateinheit an die O-Helix gebunden ist. Dieser Zustand ähnelt dem halboffenen Zustand, den die Polymerase wahrscheinlich zur Prüfung der korrekten Basenpaarung während der Synthese von natürlicher DNA einnimmt.^[164,168,169]

Auch mehrere Strukturen von Komplexen nach erfolgtem UBP-Einbau und unter Variation des Sequenzkontexts im Strang sowie der flankierenden Sequenzen wurden charakterisiert.^[167] Trotz Strukturunterschieden befand sich die UBP stets an der korrekten Post-Insertionsstelle unter Bildung der Interkalationsstruktur wie im freien Doppelstrang.

Anhand dieser Strukturstudien sowie der Analysen der UBP-Replikation in unterschiedlichen Sequenzkontexten^[133] stellten wir schließlich einen Mechanismus für die UBP-Replikation auf (Abbildung 9). Zunächst bindet die Polymerase mit der O-Helix ein nichtnatürliches Triphosphat und prüft dabei unterschiedliche Konformationen. Bei ausreichender Stabilität des UBP populiert sie schließlich die aktive geschlossene Konformation. Bei d5SICSTP-Einbau werden die intermediären Zustände nur vorübergehend populiert, aber bei dNaMTP arretiert die Konformation schließlich im halbgeöffneten Zustand, entweder, weil dieser Komplex sehr stabil ist, oder, weil der entsprechende geschlossene Komplex so instabil ist. Um dann das dNaMTP aufnehmen zu können, muss der geschlossene Zustand durch thermische Fluktuationen erreicht werden. In jedem Fall liegen die sich bildenden UBPs im geschlossenen Komplex in einer Watson-Crick-ähnlichen Struktur vor, in der das hinzukommende nichtnatürliche Nucleotid kovalent gebunden wird. Nach dem Einbau kehrt die Polymerase in ihre offene Konformation zurück, und unter Freisetzung eines Pyrophosphat-Ions gelangt das UBP unter Interkalation an seine Post-Insertions-

position. Zur Strangverlängerung sind dann die Desinterkation des UBP sowie die Reorganisation des aktiven Zentrums durch thermische Fluktuationen erforderlich. Dieser Interkalations-/Desinterkalationsmechanismus erklärt auch das Gleichgewicht von elektrostatischen und dispersiven Wechselwirkungen, das für die gleichzeitige Optimierung von UBP-Synthese und Strangverlängerung erforderlich ist. Tatsächlich ist der Mechanismus nicht nur in Einklang damit, dass hydrophobe Kräfte und Stapelkräfte die Replikation vermitteln, sondern spricht auch dafür, dass diese Kräfte ideal sein könnten, da sie relativ stark, aber nicht gerichtet sind und somit plastischer Natur sind.

6. In-vitro-Anwendungen

Die replizierfähigen UBPs fanden bald interessante Anwendungen, wie die Nutzung der inhärent erhöhten Hybridisierungsspezifität von drei Basenpaaren gegenüber der von zweien (Übersicht von Kimoto et al. 2011^[170]). Neu und vielleicht revolutionär ist die Verwendung von UBPs in SELEX, um Aptamere oder Nucleinsäurekatalysatoren mit nichtnatürlicher Funktionalität zu entwickeln. Ein Meilenstein war hierbei Bildung von Aptameren unter Verwendung eines dDs-dPx-UBP-Derivats [Abbildung 1, mit R = CH-(OH)CH₂OH] durch Hirao et al. Dieses Aptamer konnte dank der einzigartigen Funktionalität von dDs das VEGF-165-Protein oder IFN-γ spezifisch erkennen.^[171] Weil es noch keine direkte Sequenzierungsmethode gibt, um die Position multipler UBPs festzustellen, wurden ein oder mehrere dDs-Analoga an definierten, durch einen Zwei- oder Drei-Nucleotid-Barcode kenntlich gemachten Positionen einer randomisierten 43-nt-Region eingebaut. Nach mehreren Selektions-/PCR-Amplifikationsrunden waren sämtliche nichtnatürlichen Nucleotide in natürliche Nucleotide umgewandelt, und die verbliebene Besetzung wurde durch das Ion-Torrent-Deep-Sequenzierverfahren analysiert. Dann wurden die dDs-Positionen anhand der Barcodes rekonstruiert. Beide Selektionen mit UBP ergaben Aptamere, die ihr Zielmolekül mit

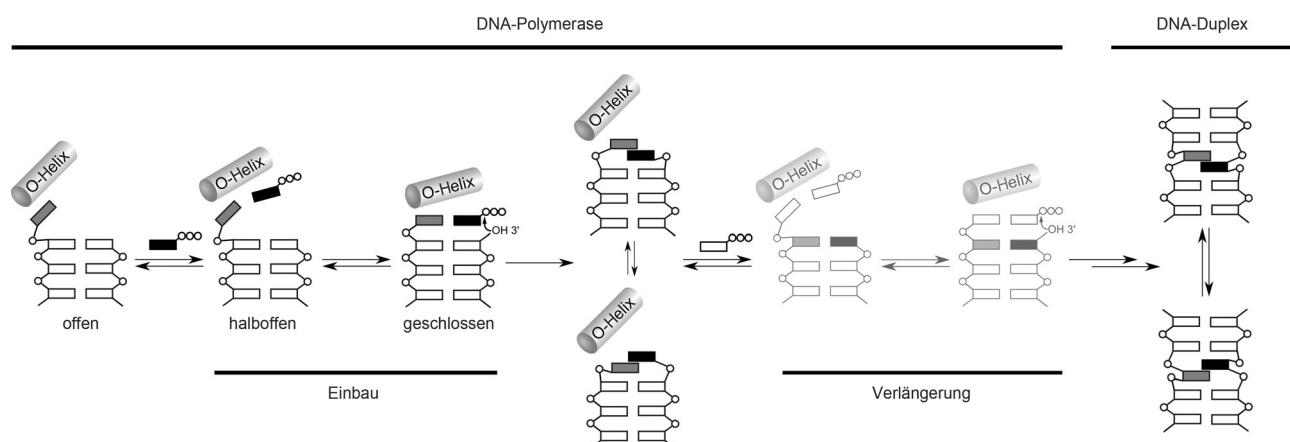


Abbildung 9. Vorgeschlagener Replikationsmechanismus für das d5SICS-dNaM-UBP. Intermediate auf Grundlage gelöster Strukturen sind dunkler und solche, deren Struktur noch nicht bestätigt ist, sind heller dargestellt. Der Einbau des nichtnatürlichen Triphosphats und die anschließende Verlängerung des entstehenden UBP sind gekennzeichnet. Phosphate sind als leere Kreise, natürliche Nucleotide als leere Rechtecke und nichtnatürliche Nucleotide als grau und schwarz gefüllte Rechtecke dargestellt. Wiedergabe aus Lit. [167].

ca. 100-mal höherer Affinität banden als solche, die aus der Selektion mit ausschließlich natürlichen Nucleotiden hervorgegangen waren. Das nichtnatürliche Aptamer mit der größten Affinität für VEGF-165 enthielt zwei dDs-Nucleotide, von denen sich keines ohne Affinitätsverlust austauschen ließ, und das Aptamer mit der höchsten Affinität für IFN-γ enthielt drei, von denen zwei sich nicht gegen dA austauschen ließen.

Schon bald nach den Arbeiten von Hirao entwickelte die Benner-Gruppe Aptamere mit den nichtnatürlichen Nucleotiden dP und dZ zur Erkennung von Krebszellen und erhielt eine Dissoziationskonstante von 30 nm.^[172] Nach zwölf In-vitro-Selektionsrunden identifizierten die Autoren die spezifisch bindenden Moleküle durch Sequenzierung der erhaltenen nichtnatürlichen Bibliothek unter kontrollierbarer Mutation von dZ nach dC und dT (nach Lit. [39]), gefolgt von einem gängigen Deep-Sequencing-Verfahren mit einem Ion-Torrent-Instrument. Wie auch schon im vorgehenden Beispiel war die Affinität für die Zielzellen deutlich geringer, sobald die nichtnatürlichen Nucleotide in ihr natürliches Gegenstück zurückmutiert waren. Dieses Ergebnis unterstreicht noch einmal die Bedeutung, die eine solche nichtnatürliche Funktionalität haben kann.

Die entstandenen Aptamere erhielten ihre Funktionalität eindeutig durch die dDs-dPx- oder dP-dZ-UBPs; ein viel breiteres Spektrum an physikochemischen Eigenschaften ließe sich jedoch erzielen, wenn man DNA oder RNA mit Hilfe eingeführter UBPs ortsspezifisch neu funktionalisierte. So würden sich nahezu grenzenlos Funktionalitäten in den Evolutionsprozess einschleusen lassen. Hierfür müssen die nichtnatürlichen Nucleotide mit einem Linker modifiziert werden, der nicht in die Replikation oder Transkription eingreift und über den die zusätzliche Funktionalität an das Triphosphat oder das nichtnatürliche Nucleotid nach dessen Einbau in DNA oder RNA gebunden wird.

Zum ersten Mal beschrieb die Dervan-Gruppe eine solche ortsspezifische Oligonucleotidmarkierung. Nach dem gerichteten Einbau von 6-Aminohexyl-*isoG* in die RNA über eine *disoC* enthaltende Matrize ließ sich die RNA posttranskriptional mit N-Hydroxysuccinimidobiotin (NHS-Biotin) oder EDTA-Dianhydrid markieren.^[173] Später verwendeten Hirao und Mitarbeiter dDs-dPa/dPn/dPx-UPBs, um DNA^[146,148] und RNA ortsspezifisch zu markieren.^[146,174,175] Einige der RNA-Markierungsexperimente beruhen auf dem direkten Einbau im Zuge der Transkription des nichtnatürlichen Ribonucleosidtriphosphats, an das die gewünschte funktionelle Gruppe kovalent gebunden ist. Größere Einheiten wie Fluorophore störten allerdings die Transkription. Daher wurde dDs als Matrize für die Transkription des alkinmodifizierten Ribonucleosid-Triphosphats Eth-C4-PaTP eingesetzt, und die entstandene RNA wurde durch Klickchemie mit einem Biotin-Tag oder einem Fluorophor versehen.^[176] Die Hirao-Gruppe beschrieb eine Reihe von dPx-Analoga mit angebundenem Linker, die ebenfalls gut repliziert wurden.^[177] Eines dieser Analoga wurde für die oben beschriebene Selektion eingesetzt. Es ist klar, dass zusätzliche Linker oder Linker, an die eine interessante Funktionalität geknüpft ist, die Bandbreite möglicher Aktivitäten vergrößern werden.

Wir synthetisierten auch die Linker-modifizierten UBP-Derivate von **5SICSTP**, (d)**MMO2TP** und (d)**NaMTP** im Hinblick auf ihre Replikation und Transkription. Die Linker enthielten freie oder geschützte Aminogruppen, die in Form eines NHS-Esters weiter beladen werden können,^[178] oder Alkinylgruppen, die mithilfe von Klickchemie beladen werden können.^[179] Das Anknüpfen eines Propinyletherlinkers an die freie *meta*-Position des **d5SICS**-Gerüsts gelingt besser als das seines aliphatischen Analogons, am besten wird aber der geschützte Propargylaminlinker toleriert. Interessanterweise ist das **dTPT3**-Gerüst besser verträglich mit der Linkerderivatisierung als das **d5SICS**-Gerüst.^[141] Für das **dNaM**-Gerüst haben wir noch keine gut tolerierte Linker-modifikation identifiziert, aber die *para*- und *meta*-Positionen von **dMMO2** sind kompatibel mit der Anbindung von Linkern. Aliphatische und etherbasierte Linker werden toleriert, am besten gelingt aber das direkte Anknüpfen einer Ethinylgruppe an die Nucleobase. Diese Befunde lassen sich allgemein anhand der Bindung eines 5'-Propargylamido-dUTP an die ternäre Struktur der KlenTaq-Polymerase erklären.^[180] Die Strukturbestimmung ergab eine H-Brücke zwischen Arg 660 und dem Stickstoffatom des Propargylamidolinkers in der sich bildenden großen Furche. Weil linkerfreies Arg 660 mit dem Phosphatrückgrat des Primer-Terminus wechselwirkt,^[181,182] müssen die Linker entweder klein genug sein, um diese Wechselwirkung nicht zu stören, oder sie durch eine stabilisierende Wechselwirkung ersetzen können.

Ein Beispiel für die Anwendung eines Linker-modifizierten UBP ist die Transkription von **dNaM**- oder **d5SICS**-DNA in *Methanococcus-jannaschii*-tRNA^{Tyr}. Durch die UDP-Matrize erhielt diese tRNA an ihrer dritten Anticodon-Position entweder die Aminolinker-modifizierte **5SICS**- oder die **MMO2**-Nucleobase. Im letzteren Fall ließ sich die tRNA danach ortsspezifisch biotinylieren.^[178] Für Materialanwendungen wurde DNA, die ein UBP aus **dNaM** und Propinylether-derivatisiertem **d5SICS** enthielt, amplifiziert und für die ortsspezifische Anordnung von zwei nSH3-Domänen eingesetzt (SRC-homology-3-Domäne des humanen Crkl-Adapterproteins). Deren Topologie wurde durch Atomkraftmikroskopie bestätigt.^[179] Wir synthetisierten ebenfalls die α-Phosphorothioatvariante von **d5SICSTP** und zeigten daran beispielhaft die Thiolierung des DNA-Rückgrats sowie die Möglichkeit, nach erfolgter Amplifikation Markierungen in die DNA einbringen zu können.^[178] Diese modifizierten Nucleotide ermöglichen eine ortsspezifische Modifikation von Nucleinsäuren mit bis zu drei verschiedenen funktionellen Gruppen und zuvor unerreichter räumlicher Kontrolle.

7. UBPs und semisynthetische Organismen

Das vielleicht ultimative Ziel bei der Entwicklung von UBPs ist ihre In-vivo-Verwendung für die Erschaffung von semisynthetischen Organismen, die zusätzliche Erbinformation speichern und wieder abrufen können (Abbildung 10). Diese Entwicklung begann mit unserem **dNaM-d5SICS**, das effizient und fast fehlerfrei in jedem Sequenzkontext repliziert und ebenso effizient in RNA transkribiert wird. Weil über *Escherichia coli* bereits so viel bekannt ist und in diesem

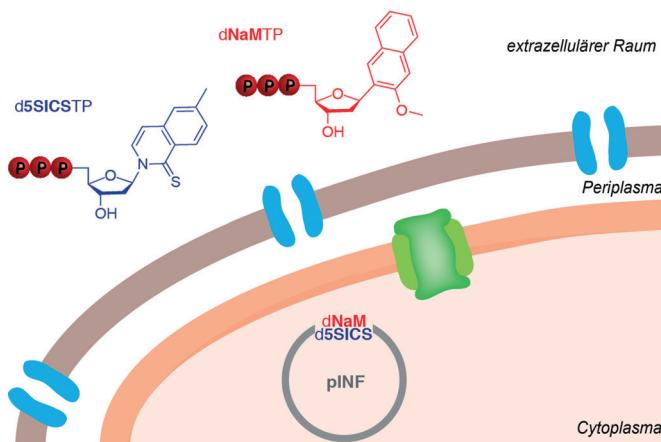


Abbildung 10. Der jüngst entwickelte semisynthetische Organismus. Porine in der äußeren und PtNTT2 in der inneren Membran sind blau bzw. grün dargestellt.

Zusammenhang auch zahlreiche Techniken zur Verfügung stehen, war dieses Bakterium ein klarer Kandidat für den ersten semisynthetischen Organismus. Die erste Hürde war, die nichtnatürlichen Triphosphate in die Zelle zu schleusen, was durch die beiden Membranen, mit denen dieser Organismus ausgestattet ist, erschwert wurde. Zuerst versuchten wir, sie nach der Art vieler Nucleosidwirkstoffe durch passive Diffusion als freie Nucleoside in die Zelle zu bringen, wo sie dann durch Kinasen des Nucleosid-Salvage-Pathways sukzessive triphosphoryliert werden sollten.^[183] Auf diesem Weg gelang zwar die Monophosphorylierung einiger Nucleoside mit überwiegend hydrophoben Nucleobasen durch die Nucleosid-Kinase von *D. melanogaster*, aber wir konnten keine Monophosphat-Kinasen identifizieren, die die Umwandlung zum Diphosphat katalysierten und eine höhere Spezifität für ihr natürliches Substrat aufweisen.^[184] Die schwache Aktivität der Kinasen versuchten wir durch Überexpression zu kompensieren, aber dies führte, wahrscheinlich wegen der Fehlregulation des natürlichen Triphosphat-Pools, zu erheblicher Toxizität.

Wir mussten also einen neuen Weg finden, um die nichtnatürlichen Triphosphate für die Zelle verfügbar zu machen. Uns fiel auf, dass die Genome einer Reihe von intrazellulären Bakterien und Algenplastiden nicht für die Enzyme codieren, die für die Nucleosidtriphosphatsynthese erforderlich sind; sie enthalten stattdessen Gene für bestimmte Nucleosiddiphosphat-Transporter (NTTs); die benötigten Triphosphate entnehmen sie dann aus dem Zellmilieu.^[185–192] Also untersuchten wir die Plasmid-Expression von acht verschiedenen NTTs in *E. coli* und identifizierten einen aktiven NTT von *Phaeodactylum tricornutum* (PtNTT2),^[191] der sowohl d5SICSTP als auch dNaMTP in die Zelle importieren kann (Abbildung 10). Unter Zugabe von 250 µM d5SICSTP und dNaMTP in das Medium konnten wir ein gleichbleibendes Niveau dieser nichtnatürlichen Nucleotide in der Zelle von etwa 90 bzw. 30 µM aufrecht erhalten. Weil diese Konzentrationen erheblich über den submikromolaren K_m -Werten der nichtnatürlichen Triphosphate für die DNA-Polymerasen liegen,^[134] war eine gute Grundlage geschaffen, dieses UBP in einem lebenden Organismus zu replizieren.

Um festzustellen, ob ein mit PtNTT2 ausgestattetes *E. coli* das importierte nichtnatürliche Triphosphat für eine UBP-DNA-Replikation nutzen würde, tauschten wir im pUC19-Plasmid durch Festphasensynthese und ein Circular-Extension-PCR-Verfahren ein dA-dT gegen dNaM-dTPT3 aus und generierten so ein pINF (Informationsplasmid). *E. coli*-Zellen, die das Plasmid-codierte PtNTT2 exprimierten, konnten mit dNaMTP und d5SICSTP im Medium wachsen und wurden nachfolgend mit pINF transformiert (Abbildung 10). Kontrollzellen transformierten wir mit dem Stamm-pUC19-Plasmid oder ließen sie entweder ohne Transporterinduktion oder ohne nichtnatürliche Triphosphate wachsen. Nach einer Nacht Wachstum im Medium wurde das ca. 10⁷-fach amplifizierte pINF wiedergewonnen, verdaut und dephosphoryliert, um die freien Nucleoside zu gewinnen. LC-MS/MS-Analyse bestätigte das Vorhandensein von etwa einem d5SICS per Plasmid. In den Kontrollzellen mit dem rein natürlichen pUC19-Plasmid wurde hingegen kein d5SICS nachgewiesen, ebenso wenig wie in den pINF-transformierten Zellen ohne Transporterinduktion und in den Zellen ohne nichtnatürliche Triphosphate. Weil das synthetische pINF nur dNaM-dTPT3 enthielt, während freies d5SICS-Triphosphat im Medium vorhanden war, bewiesen wir durch die Entdeckung von d5SICS im wiedergewonnenen Plasmid eindeutig, dass es eine Replikation in vivo gab. Dieser Befund wurde auch durch Sequenzierung und durch einen Biotin-Shift-Test nach Amplifizierung des wiedergewonnenen pINF mit d5SICS und einem biotinylierten dNaM-Analogon bestätigt. Unter Berücksichtigung der unteren Nachweisgrenze, die man aus der UBP-Retention und dem Amplifikationsgrad erhält, beträgt die Zuverlässigkeit der Replikation mindestens 99.4 %. Wir können also sagen, dass dieses modifizierte *E. coli* der erste semisynthetische Organismus ist, der ein UBP in seiner DNA weitergeben kann.

8. Bedeutung und Ausblick

Vor mehr als 50 Jahren stellte Alex Rich zum ersten Mal Überlegungen zu möglichen UBPs an, und vor 25 Jahren wurden die ersten brauchbaren Kandidaten im Labor von Steve Benner produziert. Mittlerweile gibt es drei Klassen von UBPs, die auf einem hohen Entwicklungsstand sind: eine, die alternative H-Brücken bildet, (wie dZ-dP) und zwei, die durch hydrophobe Kräfte und Stapelkräfte stabilisiert werden (wie dNaM-dSICS und dDs-dPx). Die Daten belegen, dass es nicht nur H-Brücken sind, mit denen man eine selektive Paarung stabilisieren und die Replikation und Transkription in RNA fördern kann. Die H-Brücken lassen sich durch den hydrophoben Effekt sowie disperse Wechselwirkungen zwischen komplementären Nucleobasestrukturen ersetzen, in Kombination mit Desolvatationseffekten und elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen geeignet positionierten Heteroatomen. Durch weitere Optimierung wird man aus diesen drei Klassen sicherlich UBPs erhalten, die sich in ihrer Replikationsgeschwindigkeit und -zuverlässigkeit nicht mehr von den natürlichen Basenpaaren unterscheiden.

Ein künftiger Schwerpunkt sollte auch auf der Entwicklung neuer Sequenzierungsverfahren für UBP-DNA liegen,

insbesondere für DNA mit multiplen UBP. Für die Sanger-Sequenzierung würde dies die Modifikation der Nucleobase mit einem Fluorophor bedeuten, für die Sequenzierung auf der Illumina-Plattform^[193] die Modifikation der Nucleobase und des Zuckers mit einem Fluophor bzw. reversiblen Terminator oder für das Sequenzierverfahren von Pacific Biosciences die Modifikation des Triphosphats mit einem Fluorophor.^[194] Auch Sequenzierungen auf den Ion-Torrent-^[195] oder Oxford-Nanopore-Plattformen^[196] wären vielversprechend, denn diese erfordern keine Modifikation am Nucleotid. In jedem Fall müssten aber die Hardware und Software angepasst werden. Ein Schwerpunkt sollte auch auf der systematischen Erforschung und Optimierung von Linkern zum ortsspezifischen Anknüpfen von Molekülen an DNA liegen. Solche Arbeiten werden die Anwendung von UBP für verschiedene Techniken erlauben, die sich auf die physikochemischen Eigenschaften der angeknüpften Moleküle stützen – und dies zusammen mit der Möglichkeit einer Evolution. Die wahrscheinlich wichtigste In-vitro-Anwendung ist jedoch die Neu- und Weiterentwicklung von Bauelementen und Materialien.

Unserer Meinung nach ist die interessanteste Anwendung von UPBs jedoch die Erschaffung von semisynthetischen Organismen, die zusätzliche Information speichern und abrufen können. Für die medizinische Chemie ist hier die dNaM-dTPT3-UBP-Familie am bedeutendsten, denn diese Nucleotide dürften sich durch unterschiedliche pharmakokinetische Eigenschaften wie Triphosphataufnahme, Stabilität und Off-Target-Aktivität auszeichnen. Entsprechende SAR-Studien müssten sich daher mehr auf diese Parameter fokussieren, zusätzlich zur Effizienz und Zuverlässigkeit der In-vitro- und In-vivo-Replikation.

Der nächste Schritt in Richtung eines semisynthetischen Organismus, der mit zusätzlicher Information versehen werden kann, ist die In-vivo-Transkription von UBP-haltiger DNA in RNA. Zusammen mit den von Schultz und Mitarbeitern entwickelten orthogonalen RNA-Aminoacyl-Synthetase-Paaren^[197–199] wird dies die Grundlage bilden, um die von den UBP codierte Information in neuartige Proteine zu übertragen. Diese Arbeiten müssen nicht auf Bakterienzellen beschränkt bleiben, und die Erschaffung von eukaryotischen Zellen, die zusätzliche Information speichern und abrufen können, wäre die Grundlage für weitergehende Transformationen. Dann könnte man ausgehend von solchen semisynthetischen bakteriellen und eukaryotischen Organismen semisynthetisches Leben entwickeln, das möglicherweise neue und nützliche Attribute und Funktionen aufweist und im Evolutionsprozess weiterführt. Die DNA bildet die Grundlage für alles, was Leben ist, war und vielleicht sein wird, und die UBP geben uns jetzt die Möglichkeit, das Potenzial dieses bemerkenswerten Moleküls noch einmal entscheidend zu erweitern.

Danksagung

Unsere in diesem Aufsatz beschriebenen Arbeiten wurden durch die Unterstützung des National Institute of General Medical Sciences (GM060005) möglich gemacht. Wir danken

auch allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Romesberg-Gruppe, die zu diesem Projekt beigetragen haben.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 11930–11944
Angew. Chem. **2015**, *127*, 12098–12113

- [1] A. Rich, *Horizons in Biochemistry*, Academic Press, New York, **1962**.
- [2] M. Fa, A. Radeghieri, A. A. Henry, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1748–1754.
- [3] R. N. Veedu, J. Wengel, *Chem. Biodiversity* **2010**, *7*, 536–542.
- [4] J. C. Chaput, H. Y. Yu, S. Zhang, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 1360–1371.
- [5] V. B. Pinheiro, P. Holliger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 245–252.
- [6] P. E. Nielsen, *Mol. Biotechnol.* **2004**, *26*, 233–248.
- [7] P. Guga, M. Koziolkiewicz, *Chem. Biodiversity* **2011**, *8*, 1642–1681.
- [8] C. Simons, *Nucleoside Mimetics: Their Chemistry and Biological Properties*, Gordon and Breach Science, Amsterdam, **2001**.
- [9] J. Stambasky, M. Hocek, P. Kocovsky, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6729–6764.
- [10] P. Merino, *Chemical Synthesis of Nucleoside Analogs*, Wiley, New York, **2013**.
- [11] K. M. Guckian, J. C. Morales, E. T. Kool, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9652–9656.
- [12] H. Weizman, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3375–3376.
- [13] C. Brotschi, A. Haberli, C. J. Leumann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3012–3014; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3101–3103.
- [14] C. Brotschi, G. Mathis, C. J. Leumann, *Chemistry* **2005**, *11*, 1911–1923.
- [15] N. Paul, V. C. Nashine, G. Hoops, P. Zhang, J. Zhou, D. E. Bergstrom, V. J. Davisson, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 815–825.
- [16] T. W. Kim, E. T. Kool, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2048–2053.
- [17] A. T. Krueger, H. Lu, A. H. Lee, E. T. Kool, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 141–150.
- [18] K. Kuramoto, N. Tarashima, Y. Hirama, Y. Kikuchi, N. Minakawa, A. Matsuda, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10818–10820.
- [19] F. Wojciechowski, C. J. Leumann, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5669–5679.
- [20] C. Switzer, S. E. Moroney, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8322–8323.
- [21] J. A. Piccirilli, T. Krauch, S. E. Moroney, S. A. Benner, *Nature* **1990**, *343*, 33–37.
- [22] E. Meggers, P. L. Holland, W. B. Tolman, F. E. Romesberg, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10714–10715.
- [23] K. Tanaka, M. Tasaka, H. Cao, M. Shionoya, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *13*, 77–83.
- [24] J. L. Czapinski, T. L. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8618–8619.
- [25] C. Kaul, M. Müller, M. Wagner, S. Schneider, T. Carell, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 794–800.
- [26] C. Switzer, S. Sinha, P. H. Kim, B. D. Heuberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1529–1532; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1553–1556.
- [27] S. A. Benner, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 784–797.
- [28] A. A. Henry, F. E. Romesberg, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 727–733.
- [29] A. M. Leconte, F. E. Romesberg in *Protein Eng.* (Hrsg.: C. Koehler, U. L. RajBhandary), Springer, Berlin, **2009**, S. 291–314.
- [30] I. Hirao, M. Kimoto, R. Yamashige, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 2055–2065.
- [31] H. P. Rappaport, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 7253–7267.
- [32] H. P. Rappaport, *Biochemistry* **1993**, *32*, 3047–3057.

- [33] J. D. Bain, C. Switzer, A. R. Chamberlin, S. A. Benner, *Nature* **1992**, *356*, 537–539.
- [34] C. Y. Switzer, S. E. Moroney, S. A. Benner, *Biochemistry* **1993**, *32*, 10489–10496.
- [35] J. Horlacher, M. Hottiger, V. N. Podust, U. Hübscher, S. A. Benner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 6329–6333.
- [36] A. M. Sismour, S. A. Benner, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 5640–5646.
- [37] Z. Yang, A. M. Sismour, P. Sheng, N. L. Puskar, S. A. Benner, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4238–4249.
- [38] D. Hutter, S. A. Benner, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9839–9842.
- [39] Z. Yang, F. Chen, J. B. Alvarado, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15105–15112.
- [40] N. A. Leal, H. J. Kim, S. Hoshika, M. J. Kim, M. A. Carrigan, S. A. Benner, *ACS Synth. Biol.* **2015**, *4*, 407–413.
- [41] M. Ishikawa, I. Hirao, S. Yokoyama, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3931–3934.
- [42] T. Ohtsuki, M. Kimoto, M. Ishikawa, T. Mitsui, I. Hirao, S. Yokoyama, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 4922–4925.
- [43] T. Fujiwara, M. Kimoto, H. Sugiyama, I. Hirao, S. Yokoyama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2221–2223.
- [44] I. Hirao et al., *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 177–182.
- [45] I. Hirao, Y. Harada, M. Kimoto, T. Mitsui, T. Fujiwara, S. Yokoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13298–13305.
- [46] S. Moran, R. X. F. Ren, S. Rumney, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2056–2057.
- [47] S. Moran, R. X. Ren, E. T. Kool, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10506–10511.
- [48] E. T. Kool, H. O. Sintim, *Chem. Commun.* **2006**, 3665–3675.
- [49] O. Khakshoor, S. E. Wheeler, K. N. Houk, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3154–3163.
- [50] M. F. Goodman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10493–10495.
- [51] E. T. Kool, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 191–219.
- [52] J. M. Sturtevant, S. A. Rice, E. P. Geiduschek, *Discuss. Faraday Soc.* **1958**, *25*, 138–149.
- [53] P. O. P. Ts'o, I. S. Melvin, A. C. Olson, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 1289–1296.
- [54] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer, New York, **1984**.
- [55] P. Yakovchuk, E. Protozanova, M. D. Frank-Kamenetskii, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 564–574.
- [56] M. Petersheim, D. H. Turner, *Biochemistry* **1983**, *22*, 256–263.
- [57] J. Petruska, M. F. Goodman, M. S. Boosalis, L. C. Sowers, C. Cheong, I. Tinoco Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 6252–6256.
- [58] L. A. Loeb, T. A. Kunkel, *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, *51*, 429–457.
- [59] E. T. Kool, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2001**, *30*, 1–22.
- [60] T. Herskovits, *Arch. Biochem. Biophys.* **1962**, *97*, 474–484.
- [61] R. A. Friedman, B. Honig, *Biophys. J.* **1995**, *69*, 1528–1535.
- [62] H. S. Frank, M. W. Evans, *J. Chem. Phys.* **1945**, *13*, 507–532.
- [63] N. T. Southall, K. A. Dill, A. D. J. Haymet, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 521–533.
- [64] D. Chandler, *Nature* **2005**, *437*, 640–647.
- [65] M. Lukšić, T. Urbic, B. Hribar-Lee, K. A. Dill, *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116*, 6177–6186.
- [66] W. Blokzijl, J. B. F. N. Engberts, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1545–1579; *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1610–1650.
- [67] F. Biedermann, W. M. Nau, H. J. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11158–11171; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 11338–11352.
- [68] K. M. Guckian, B. A. Schweizer, R. X. F. Ren, C. J. Sheils, D. C. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2213–2222.
- [69] A. Zahn, C. Brotschi, C. J. Leumann, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2125–2129.
- [70] D. Řeha, M. Hocek, P. Hobza, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 3587–3595.
- [71] L. Zendlova, D. Reha, M. Hocek, P. Hobza, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7601–7610.
- [72] P. Hobza, J. Sponer, M. Polasek, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 792–798.
- [73] C. E. Bugg, J. M. Thomas, M. Sundaralingam, S. T. Rao, *Biopolymers* **1971**, *10*, 175–219.
- [74] A. Sarai, J. Mazur, R. Nussinov, R. L. Jernigan, *Biochemistry* **1988**, *27*, 8498–8502.
- [75] R. Sedlak, P. Jurecka, P. Hobza, *J. Chem. Phys.* **2007**, *127*, 075104.
- [76] A. Fiethen, G. Jansen, A. Hesselmann, M. Schutz, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1802–1803.
- [77] P. Hobza, J. Sponer, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11802–11808.
- [78] M. Kolář, T. Kubář, P. Hobza, *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 8038–8046.
- [79] M. P. Waller, A. Robertazzi, J. A. Platts, D. E. Hibbs, P. A. Williams, *J. Comput. Chem.* **2006**, *27*, 491–504.
- [80] C. F. Matta, N. Castillo, R. J. Boyd, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 563–578.
- [81] P. R. Kamya, H. M. Muchall, *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 12800–12808.
- [82] S. Grimme, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3430–3434; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3478–3483.
- [83] C. R. Martinez, B. L. Iverson, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 2191–2201.
- [84] C. A. Hunter, J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5525–5534.
- [85] Y. Andersson, D. C. Langreth, B. I. Lundqvist, *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *76*, 102–105.
- [86] P. Hobza, J. Sponer, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 3247–3276.
- [87] O. V. Shishkin, L. Gorb, P. Hobza, J. Leszczynski, *Int. J. Quantum Chem.* **2000**, *80*, 1116–1124.
- [88] J. Sponer, J. Leszczynski, P. Hobza, *Biopolymers* **2001**, *61*, 3–31.
- [89] C. A. Hunter, K. R. Lawson, J. Perkins, C. J. Urch, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2001**, 651–669.
- [90] S. L. Cockroft, C. A. Hunter, K. R. Lawson, J. Perkins, C. J. Urch, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8594–8595.
- [91] S. L. Cockroft, C. A. Hunter, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 172–188.
- [92] S. L. Cockroft, J. Perkins, C. Zonta, H. Adams, S. E. Spey, C. M. Low, J. G. Vinter, K. R. Lawson, C. J. Urch, C. A. Hunter, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1062–1080.
- [93] F. Cozzi, M. Cinquini, R. Annunziata, T. Dwyer, J. S. Siegel, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5729–5733.
- [94] F. Cozzi, M. Cinquini, R. Annunziata, J. S. Siegel, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5330–5331.
- [95] F. Cozzi, J. S. Siegel, *Pure Appl. Chem.* **1995**, *67*, 683–689.
- [96] F. Cozzi, R. Annunziata, M. Benaglia, M. Cinquini, L. Raimondi, K. K. Baldridge, J. S. Siegel, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 157–162.
- [97] F. Cozzi, R. Annunziata, M. Benaglia, K. K. Baldridge, G. Aguirre, J. Estrada, Y. Sritana-Anant, J. S. Siegel, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 2686–2694.
- [98] M. O. Sinnokrot, C. D. Sherrill, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 8377–8379.
- [99] M. O. Sinnokrot, C. D. Sherrill, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 10656–10668.
- [100] M. O. Sinnokrot, C. D. Sherrill, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7690–7697.
- [101] M. Watt, L. K. Hardebeck, C. C. Kirkpatrick, M. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3854–3862.
- [102] S. E. Wheeler, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10854–10855.
- [103] S. E. Wheeler, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10262–10274.
- [104] S. E. Wheeler, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 1029–1038.

- [105] S. E. Wheeler, J. W. Bloom, *J. Phys. Chem. A* **2014**, *118*, 6133–6147.
- [106] R. M. Parrish, C. D. Sherrill, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 17386–17389.
- [107] J. Hwang, P. Li, W. R. Carroll, M. D. Smith, P. J. Pellechia, K. D. Shimizu, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14060–14067.
- [108] W. Wang, P. Hobza, *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 1003–1009.
- [109] C. D. Sherrill, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 1020–1028.
- [110] R. G. Huber, M. A. Margreiter, J. E. Fuchs, S. von Grafenstein, C. S. Tautermann, K. R. Liedl, T. Fox, *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54*, 1371–1379.
- [111] A. S. Shetty, J. Zhang, J. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1019–1027.
- [112] R. R. Gardner, S. L. McKay, S. H. Gellman, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2335–2338.
- [113] M. S. Cubberley, B. L. Iverson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7560–7563.
- [114] A. J. Goodman, E. C. Breinlinger, C. M. McIntosh, L. N. Grimaldi, V. M. Rotello, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1531–1534.
- [115] M. J. Rashkin, M. L. Waters, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1860–1861.
- [116] M. Berger, A. K. Ogawa, D. L. McMinn, Y. Wu, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2940–2942; *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3069–3071.
- [117] A. K. Ogawa, Y. Q. Wu, D. L. McMinn, J. Q. Liu, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3274–3287.
- [118] D. L. McMinn, A. K. Ogawa, Y. Wu, J. Liu, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11585–11586.
- [119] A. A. Henry, A. G. Olsen, S. Matsuda, C. Z. Yu, B. H. Geierstanger, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6923–6931.
- [120] G. T. Hwang, F. E. Romesberg, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2037–2045.
- [121] S. Matsuda, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14419–14427.
- [122] Y. Kim, A. M. Leconte, Y. Hari, F. E. Romesberg, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7809–7812; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7973–7976.
- [123] Y. Hari, G. T. Hwang, A. M. Leconte, N. Joubert, M. Hocek, F. E. Romesberg, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2796–2799.
- [124] A. M. Leconte, S. Matsuda, G. T. Hwang, F. E. Romesberg, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4326–4329; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4432–4435.
- [125] A. M. Leconte, S. Matsuda, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6780–6781.
- [126] S. Matsuda, A. A. Henry, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6369–6375.
- [127] S. Matsuda, A. M. Leconte, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5551–5557.
- [128] A. S. Meyer, M. Blandino, T. E. Spratt, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 33043–33046.
- [129] J. C. Morales, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1001–1007.
- [130] T. E. Spratt, *Biochemistry* **2001**, *40*, 2647–2652.
- [131] A. M. Leconte, G. T. Hwang, S. Matsuda, P. Capek, Y. Hari, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2336–2343.
- [132] G. T. Hwang, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14872–14882.
- [133] Y. J. Seo, G. T. Hwang, P. Ordoukhalian, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3246–3252.
- [134] T. Lavergne, D. A. Malyshev, F. E. Romesberg, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1231–1239.
- [135] D. A. Malyshev, Y. J. Seo, P. Ordoukhalian, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14620–14621.
- [136] D. A. Malyshev, K. Dhami, H. T. Quach, T. Lavergne, P. Ordoukhalian, A. Torkamani, F. E. Romesberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 12005–12010.
- [137] Y. J. Seo, S. Matsuda, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5046–5047.
- [138] D. A. Malyshev, D. A. Pfaff, S. I. Ippoliti, G. T. Hwang, T. J. Dwyer, F. E. Romesberg, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 12650–12659.
- [139] Y. J. Seo, F. E. Romesberg, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2394–2400.
- [140] T. Lavergne, M. Degardin, D. A. Malyshev, H. T. Quach, K. Dhami, P. Ordoukhalian, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5408–5419.
- [141] L. Li, M. Degardin, T. Lavergne, D. A. Malyshev, K. Dhami, P. Ordoukhalian, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 826–829.
- [142] K. Dhami, D. A. Malyshev, P. Ordoukhalian, T. Kubelka, M. Hocek, F. E. Romesberg, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 10235–10244.
- [143] J. C. Morales, E. T. Kool, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 950–954.
- [144] J. C. Morales, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2323–2324.
- [145] T. Mitsui, A. Kitamura, M. Kimoto, T. To, A. Sato, I. Hirao, S. Yokoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5298–5307.
- [146] I. Hirao, M. Kimoto, T. Mitsui, T. Fujiwara, R. Kawai, A. Sato, Y. Harada, S. Yokoyama, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 729–735.
- [147] I. Hirao, T. Mitsui, M. Kimoto, S. Yokoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15549–15555.
- [148] M. Kimoto, R. Kawai, T. Mitsui, S. Yokoyama, I. Hirao, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e14.
- [149] K. M. Guckian, T. R. Krugh, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6841–6847.
- [150] S. Smirnov, T. J. Matray, E. T. Kool, C. de Los Santos, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 5561–5569.
- [151] S. Atwell, E. Meggers, G. Spraggon, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12364–12367.
- [152] D. A. Klewer, A. Hoskins, P. M. Zhang, V. J. Davisson, D. E. Bergstrom, A. C. LiWang, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 4514–4522.
- [153] Z. Johar, A. Zahn, C. J. Leumann, B. Jaun, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1080–1086.
- [154] S. Matsuda, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10466–10473.
- [155] G. Minasov, J. Matulic-Adamic, C. J. Wilds, P. Haeberli, N. Usman, L. Beigelman, M. Egli, *RNA* **2000**, *6*, 1516–1528.
- [156] K. Betz, D. A. Malyshev, T. Lavergne, W. Welte, K. Diederichs, T. J. Dwyer, P. Ordoukhalian, F. E. Romesberg, A. Marx, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 612–614.
- [157] C. Brotschi, C. J. Leumann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1655–1658; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1694–1697.
- [158] Siehe Lit. [153].
- [159] V. L. Malinovskii, D. Wenger, R. Haner, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 410–422.
- [160] Y. N. Teo, E. T. Kool, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4221–4245.
- [161] H. Echols, M. F. Goodman, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 477–511.
- [162] T. A. Kunkel, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 16895–16898.
- [163] P. J. Rothwell, G. Waksman, *Adv. Protein Chem.* **2005**, *71*, 401–440.
- [164] E. Y. Wu, L. S. Beese, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 19758–19767.
- [165] Y. Li, S. Korolev, G. Waksman, *EMBO J.* **1998**, *17*, 7514–7525.
- [166] S. Doublié, S. Tabor, A. M. Long, C. C. Richardson, T. Ellenberger, *Nature* **1998**, *391*, 251–258.
- [167] K. Betz, D. A. Malyshev, T. Lavergne, W. Welte, K. Diederichs, F. E. Romesberg, A. Marx, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18637–18643.
- [168] J. Hohlbach, L. Aigrain, T. D. Craggs, O. Bermek, O. Potapova, P. Shoolizadeh, N. D. Grindley, C. M. Joyce, A. N. Kapanidis, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2131.
- [169] S. Y. Berezhna, J. P. Gill, R. Lamichhane, D. P. Millar, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11261–11268.

- [170] M. Kimoto, R. S. Cox III, I. Hirao, *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **2011**, *11*, 321–331.
- [171] M. Kimoto, R. Yamashige, K. Matsunaga, S. Yokoyama, I. Hirao, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 453–457.
- [172] K. Sefah, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 1449–1454.
- [173] Y. Tor, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4461–4467.
- [174] M. Kimoto, A. Sato, R. Kawai, S. Yokoyama, I. Hirao, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2009**, *73*–74.
- [175] N. Morohashi, M. Kimoto, A. Sato, R. Kawai, I. Hirao, *Molecules* **2012**, *17*, 2855–2876.
- [176] T. Ishizuka, M. Kimoto, A. Sato, I. Hirao, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 10835–10837.
- [177] R. Yamashige, M. Kimoto, Y. Takezawa, A. Sato, T. Mitsui, S. Yokoyama, I. Hirao, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 2793–2806.
- [178] Y. J. Seo, D. A. Malyshev, T. Lavergne, P. Ordoukhalian, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19878–19888.
- [179] Z. Li, T. Lavergne, D. A. Malyshev, J. Zimmermann, R. Adhikary, K. Dhami, P. Ordoukhalian, Z. Sun, J. Xiang, F. E. Romesberg, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 14205–14209.
- [180] S. Obeid, A. Baccaro, W. Welte, K. Diederichs, A. Marx, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 21327–21331.
- [181] Y. Li, Y. Kong, S. Korolev, G. Waksman, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 1116–1123.
- [182] Y. Li, G. Waksman, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1225–1233.
- [183] Y. Wu, M. Fa, E. L. Tae, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14626–14630.
- [184] H. Yan, M. D. Tsai, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1999**, *73*, 103–134.
- [185] H. H. Winkler, H. E. Neuhaus, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 64–68.
- [186] H. Amiri, O. Karlberg, S. G. Andersson, *J. Mol. Evol.* **2003**, *56*, 137–150.
- [187] T. P. Hatch, E. Al-Hossainy, J. A. Silverman, *J. Bacteriol.* **1982**, *150*, 662–670.
- [188] H. H. Winkler, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 389–396.
- [189] M. Horn, M. Wagner, *J. Eukaryotic Microbiol.* **2004**, *5*, 509–514.
- [190] I. Haferkamp, S. Schmitz-Esser, M. Wagner, N. Neigel, M. Horn, H. E. Neuhaus, *Mol. Microbiol.* **2006**, *60*, 1534–1545.
- [191] M. Ast, A. Gruber, S. Schmitz-Esser, H. E. Neuhaus, P. G. Kroth, M. Horn, I. Haferkamp, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 3621–3626.
- [192] I. Haferkamp, N. Linka, *Plant Biol.* **2012**, *14*, 675–690.
- [193] D. R. Bentley, et al., *Nature* **2008**, *456*, 53–59.
- [194] J. Eid, et al., *Science* **2009**, *323*, 133–138.
- [195] J. M. Rothberg, et al., *Nature* **2011**, *475*, 348–352.
- [196] Oxford Nanopore Technologies, „Introduction to nanopore sensing“, <http://nanoporetech.com/technology>, **2014**.
- [197] C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 413–444.
- [198] T. S. Young, P. G. Schultz, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 11039–11044.
- [199] L. Wang, J. Xie, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2006**, *35*, 225–249.

Eingegangen am 29. März 2015

Online veröffentlicht am 25. August 2015

Übersetzt von Dr. Roswitha Harrer (Otterberg)