

# Target-katalysierte Transferreaktionen für den signalverstärkten RNA-Nachweis

Tom N. Grossmann, Lars Röglind und Oliver Seitz\*

Für den Nachweis geringer Mengen einer biologischen Zielverbindung ist es von besonderer Bedeutung, ein messbares Signal verstärken zu können. In der Nucleinsäurediagnostik gilt die Polymerasekettenreaktion (PCR) als Standardmethode zum hochempfindlichen Nachweis von DNA und RNA. Die PCR vervielfältigt die Zielsequenz und erleichtert dadurch die anschließende Detektion des gebildeten Produkts. Detektionsverfahren, die den Nachweis der Zielsequenz ohne eine solche vorherige Vervielfältigung ermöglichen, sind von großem Interesse, da sich die Testgeräte vereinfachen lassen könnten. PCR-freie Detektionsverfahren nutzen die katalytische Bildung von Signalmolekülen<sup>[1]</sup> sowie elektrochemische<sup>[2]</sup> oder Nanopartikel-basierte<sup>[3]</sup> Ausleseverfahren. Hohe Empfindlichkeiten wurden durch Kombination zweier Signalverstärkungsmethoden erreicht. In einer Strichcode-basierten Methode rekrutiert die Ziel-DNA mehrere Kopien einer Strichcode-DNA. In einem zweiten Schritt wird die Strichcode-DNA mithilfe Nanopartikel-katalysierter Silberentwicklung nachgewiesen.<sup>[4]</sup> Ein Vorverstärkungsschritt wird auch in einem Peptidnucleinsäure(PNA)-basierten Hybridisierungssassay eingesetzt, in dem eine Ziel-DNA die Rekrutierung mehrerer Meerrettichperoxidases (HRP) vermittelt, was anschließend durch eine katalytische Farbreaktion angezeigt wird.<sup>[1b]</sup> Bei all diesen Ansätzen führt der Rekrutierungsschritt zu Bildung eines ternären Komplexes (Sandwichhybridisierung) aus einer immobilisierten Oligonucleotidsonde und einer weiteren Sonde, die eine Reportergruppe (z. B. Strichcode-DNA oder Biotin) trägt. Die Bildung dieses Komplexes ist entscheidend für den Nachweis der Zielsequenz und wird durch die Hybridisierung komplementärer Oligonucleotidsequenzen vermittelt. Jedoch muss man beim Waschschritt, der zur Entfernung der ungebundenen Oligonucleotidsonden erforderlich ist, auf allzu harsche Bedingungen verzichten, will man dabei die relativ schwache, nichtkovalente Wechselwirkung im gebildeten Komplex nicht aufbrechen.

Die oben diskutierten Sandwichassays beruhen auf der Rekrutierung katalytisch aktiver Einheiten durch die DNA-Sequenz. Alternativ kann die Zielsequenz selbst katalytisch wirken, indem sie als Templat fungiert und die funktionellen Gruppen modifizierter Oligonucleotide so anordnet, dass eine schnelle und selektive Reaktion ermöglicht wird.<sup>[5-8]</sup> Mit

diesem Ansatz konnten unter anderem Verknüpfungs-<sup>[5,9]</sup> und Hydrolysereaktionen<sup>[6]</sup> beschleunigt werden, die in Abwesenheit des Templat nur sehr langsam verlaufen. Bisherige DNA-vermittelte Reaktionen ergaben bis zu 10<sup>2</sup>-fache Signalverstärkungen, was jedoch für den PCR-freien Nachweis sehr geringer Mengen an DNA nicht ausreicht. Hier stellen wir eine Templat-katalysierte Reaktion vor, die als Vorverstärkung für eine Enzym-basierte Nachweisreaktion dient. Die Reaktion wurde so gestaltet, dass die Zielsequenz die kovalente Anbindung einer Reportergruppe an Nucleinsäuresonden katalysiert. Es wird gezeigt, dass sowohl die Vorverstärkungsreaktion als auch die kovalente Anbindung der Reportergruppe zur Empfindlichkeitssteigerung einer vom ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) abgeleiteten Methode führen.

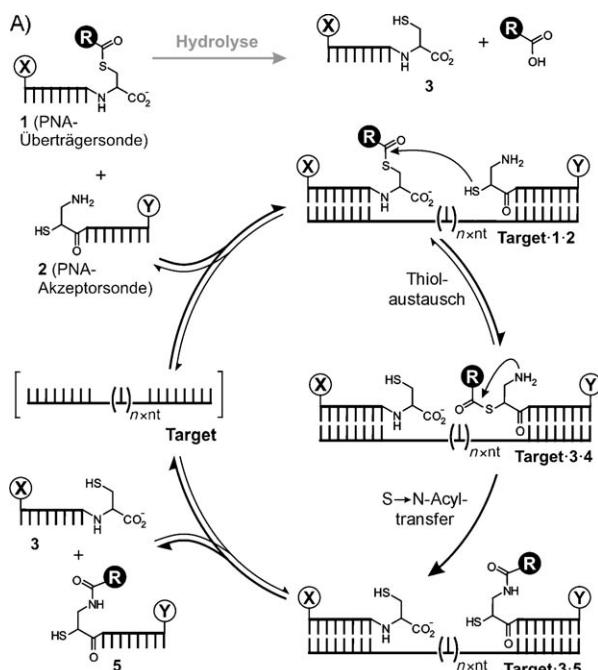
Kürzlich haben wir ein Konzept zum Nachweis von Nucleinsäuresequenzen vorgestellt, das auf dem Templat-katalysierten Transfer einer Reportergruppe **R** von einer PNA-Überträgersonde **1** auf eine Akzeptorsonde **2** gründet (Abbildung 1 A). Die Sonden **1** und **2** sind so aufgebaut, dass sie mit benachbarten Abschnitten der Zielsequenz (**Target**) hybridisieren. Die Anordnung des Thioesters **1** und des N-terminalen Isocysteins (*i*Cys) **2** im ternären Komplex **Target-1-2** leitet den Thiolaustausch ein. In Analogie zur nativen chemischen Peptidkupplung<sup>[10]</sup> reagiert das gebildete Intermediat **4** in einem S→N-Acyltransfer zum Produkt **5**. Ausgangs- und Produktsonden haben ähnliche Affinitäten zum **Target**, sodass der Strangtausausch in einem schnellen Gleichgewicht wieder zum Komplex **Target-1-2** führt. In vorangegangenen Arbeiten stellten wir den DNA-katalysierten Transfer eines Fluoreszenzlöschers vor (Abbildung 1B, oben).<sup>[8]</sup> Der Löscher (Dabcyl) wurde von einer Fluorescein(FAM)- auf eine Tetramethylrhodamin(TMR)-modifizierte PNA-Sonde (**6** und **7**) übertragen. Der Transfer aktivierte die Emission von FAM und deaktiviert die von TMR.

Die Geschwindigkeit einer Nucleinsäure-katalysierten Reaktion wird von der Architektur des Target-Sonden-Komplexes beeinflusst.<sup>[11]</sup> In den meisten DNA-vermittelten Reaktionen hybridisieren die Sonden direkt nebeneinander. Wir haben demonstriert, dass eine ungepaarte Nucleobase gegenüber von der Verknüpfungsstelle bei PNA-Verknüpfungsreaktionen zu einer höheren Sequenzselektivität und einer verringerten Reaktionsgeschwindigkeit führen kann.<sup>[12]</sup> Daher haben wir die Abhängigkeit der Transferreaktion von der Flexibilität am Reaktionszentrum untersucht. Hierzu wurde die Zahl (*n*) der ungepaarten Nucleobasen (nt) zwischen den reaktiven Gruppen der Sonden **6** und **7** variiert und die Anfangsgeschwindigkeit der Transferreaktion untersucht. Vorangegangene Versuche mit einer Ziel-DNA (*n*=1 nt), deren Sequenz einen Bereich um die kanzerogene G12V-

[\*] T. N. Grossmann, Dr. L. Röglind, Prof. Dr. O. Seitz

Institut für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin  
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)  
Fax: (+49) 30-2093-7266  
E-Mail: oliver.seitz@chemie.hu-berlin.de

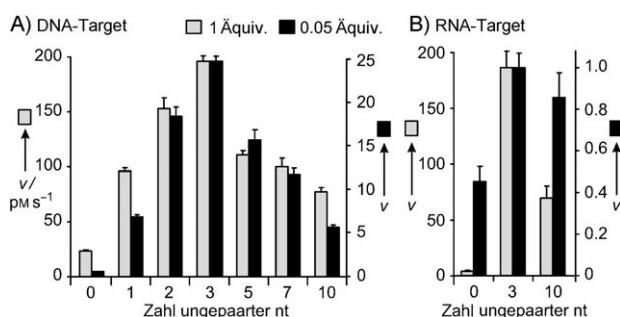
 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200801355> zu finden.



**Abbildung 1.** A) Katalysezyklus des Nucleinsäure-katalysierten Transfers einer Reportergruppe (**R**) von einer Überträgersonde **1** auf eine Akzeptorsonde **2** und die Hydrolysereaktion der Thioesterbindung in Sonde **1**; B) Art der Modifikationen für den Fluoreszenzlöscher- und Biotin-Transfer (FAM: 6-Carboxyfluorescein, Dabcyl: 4-(4-Dimethylamino-phenylazo)benzoyl, TMR: 5-Carboxytetramethylrhodamin).

Mutation des *ras*-Gens umfasst, ergaben eine hohe katalytische Aktivität bei 32°C.<sup>[8]</sup> In den Messungen zeigten äquimolare (grau) und substöchiometrische (schwarz) Mengen DNA interessanterweise ähnliche Abhängigkeiten von der Zahl der ungepaarten Nucleotide (Abbildung 2 A). Die maximalen Transfersgeschwindigkeiten wurden für beide Konzentrationen bei einem Abstand von  $n = 3$  nt beobachtet. So verlief der Transfer bei  $n = 3$  nt mehr als doppelt so schnell wie bei  $n = 1$  nt.<sup>[13]</sup> Vom auf 3 nt erhöhten Abstand profitierte besonders die katalytische Aktivität substöchiometrischer Mengen Ziel-DNA, die um mehr als das Dreifache gesteigert wurde.

Wir wollten auch die Anwendbarkeit der Transferreaktionen auf den Nachweis infektiöser oder pathogener RNA testen und untersuchten daher die Reaktivität der Sonden **6** und **7** an RNA-Templaten mit 0, 3 und 10 ungepaarten Nucleotiden. PNA-RNA-Duplexe sind stabiler als PNA-DNA-Duplexe; um den Strangtausch zu gewährleisten, wurde die Reaktionstemperatur daher auf 37°C erhöht. Unter diesen Bedingungen wurden bei äquimolaren RNA-Konzentrationen (grau, Abbildung 2 B) ähnliche Anfangsgeschwindigkeiten beobachtet wie bei äquimolaren DNA-Konzentrationen (grau, Abbildung 2 A). Von den untersuchten RNA-Templaten führte die RNA mit drei ungepaarten Nucleotiden zwischen den Erkennungssequenzen ( $n = 3$  nt)

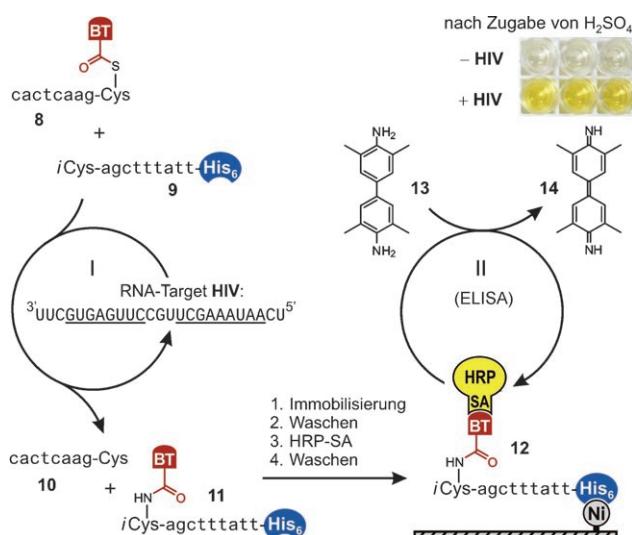


**Abbildung 2.** Anfangsgeschwindigkeiten  $v$  (Dreifachbestimmung) der Transferreaktion von Sonde **6** (FAM-AEEA-tctccccac-Cys(Dabcyl-Gly)-OH) und **7** (TMR-AEEA-Lys(iCys-cctacag)-NH<sub>2</sub>) in Gegenwart von DNA (A, 32°C) und RNA (B, 37°C) mit einer unterschiedlichen Zahl ungepaarter Nucleotide (nt); **Target** (für RNA: T=U): 5'GCGCTG-TAGGXTGGGGAGAGT3' (unterstrichen: Erkennungssequenzen); **X** (n): – (0), T (1), TT (2), TTA (3), TTATC (5), TTATCGA (7), TTATCGATTA (10); Bedingungen: 100 nm **6**, 100 nm **7**, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl, 1 mM Triscarboxyethylphosphin (TCEP), 0.2 mg mL<sup>-1</sup> Roche Blocking Reagent, pH 7.0 (für RNA: 0.1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> Ribolock).

zu den höchsten Reaktionsgeschwindigkeiten. In Gegenwart von substöchiometrischen Mengen RNA beobachteten wir langsamere Reaktionen und einen verringerten Einfluss der Flexibilität am Reaktionszentrum. Möglicherweise wird unter diesen Bedingungen der Strangtausch zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, ein Umstand, der im Allgemeinen auch bei Ribozymen beobachtet wird.<sup>[14]</sup> Diese Einschränkung für RNA-vermittelte Reaktionen kann durch die Verringerung der Sonden- und Target-Konzentrationen, durch erhöhte Reaktionstemperatur, durch kürzere Sonden oder verlängerte Reaktionszeiten kompensiert werden.

Wir wählten HIV-I-RNA als Zielsequenz und entschieden uns für einen hochkonservierten<sup>[15]</sup> Abschnitt (**HIV**) in einem zugänglichen Bereich<sup>[16]</sup> der 5'LTR-Region des HIV-I-Genoms. Für eine hohe Empfindlichkeit wäre es vorteilhaft, wenn sich die katalytische Aktivität der Ziel-RNA mit anderen Techniken zur Signalverstärkung kombinieren ließe. Viele hochempfindliche bioanalytische Nachweisverfahren basieren auf der nichtkovalenten Wechselwirkung von biotinylierten Sonden mit der Zielsequenz und einer anschließenden Immobilisierung von Streptavidin-Enzym-Konjugaten für die Katalyse einer charakteristischen Reaktion. Appella und Mitarbeiter nutzten beispielsweise PNA-Sonden zur Immobilisierung von Ziel-DNA auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten.<sup>[1b]</sup> Eine zweite, biotinylierte PNA-Sonde vermittelte die Bindung von Meerrettichperoxidase, welche die Bildung einer farbigen chinoiden Verbindung katalysierte.

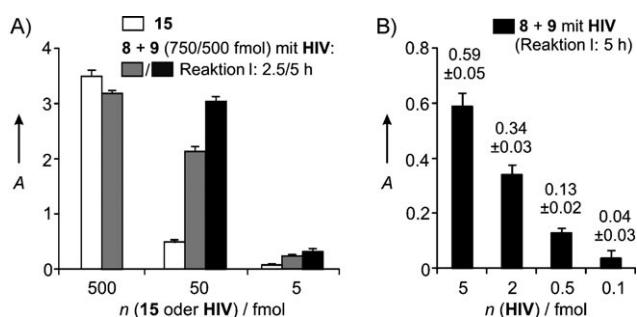
Wir haben eine RNA-katalysierte Transferreaktion entwickelt, die die kovalente Anbindung eines Biotin-Reporters ermöglicht. Dieses Nachweissystem (Abbildungen 3 und 1B) nutzt die PNA-Überträgersonde **8** mit einer biotinylierten Reportergruppe und die PNA-Akzeptorsonde **9**, die C-terminal einen His-Tag (**His**<sub>6</sub>) trägt. Beide Sonden wurden so gestaltet, dass sie in einem Abstand von drei Nucleotiden an die Ziel-RNA binden (unterstrichene Sequenzen in **HIV**). Bei der Transferreaktion (Reaktion I) wurden 500–750 fmol der Sonden in 50  $\mu$ L Puffer eingesetzt. In Gegenwart von **HIV**



**Abbildung 3.** Doppelverstärkungsstrategie mit der RNA-katalysierten Biotin (BT)-Transferreaktion zur Vorverstärkung (Reaktion I: 750 fmol **8** und 500 fmol **9** in 50  $\mu$ L) und einem modifizierten ELISA zur finalen Signalverstärkung (Reaktion II). Sechs Mikrotitervertiefungen (96er-Format) sind gezeigt (jede Reihe identische Bedingungen), die ohne RNA (−HIV) und mit RNA (+HIV) behandelt wurden.

wird die Reportergruppe (BT) übertragen, und die Produktsonden **10** und **11** werden gebildet. Die HPLC/MS-Analyse der Transferreaktion zeigte das Potenzial einer 10<sup>2</sup>-fachen Vorverstärkung (Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen). Transferprodukt **11** trägt sowohl den Biotin-Reporter als auch einen His-Tag. Da His-Tags stabile Komplexe mit Nickel bilden, kann Sonde **11** auf der Oberfläche nickelbeschichteter Mikrotiterplatten immobilisiert werden. Nach intensiven Waschschritten wurden die Platten mit einem Meerrettichperoxidase-Streptavidin-Konjugat (HRP-SA) behandelt und erneut gewaschen. Nur in den Vertiefungen mit Transferprodukt **11** konnte HRP-SA über die Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung immobilisiert werden (**12**). Das HRP-SA-Konjugat katalysiert anschließend die Oxidation (Reaktion II) von farblosem Tetramethylbenzidin (TMB, **13**) zur farbigen chinoiden Verbindung **14**. Diese Reaktion wurde mit kommerziell erhältlicher 1-step-Ultra-TMB-Lösung durchgeführt und durch die Zugabe von 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Die abgebildeten Vertiefungen wurden in Ab- (−HIV) und Anwesenheit (+HIV, 50 fmol) der Ziel-RNA wie beschrieben behandelt.

Um die Signalintensitäten zu bestimmen, wurde die Absorption bei 450 nm mit einem Plattenlesegerät gemessen. Abbildung 4 A zeigt die hintergrundkorrigierten Signale nach der Biotin-Transferreaktion (Reaktion I, 2.5 h) in Gegenwart von 5–500 fmol HIV, der Immobilisierung und der Behandlung mit 0.5  $\mu$ g mL<sup>−1</sup> HRP-SA (grau). In Gegenwart von 500 fmol einer zufälligen RNA-Sequenz wurde kein signifikantes Signal beobachtet (Tabelle S3 in den Hintergrundinformationen). Die Reaktionszeit für Reaktion I wurde für 50 fmol (0.1 Äquiv.) und 5 fmol (0.01 Äquiv.) bei sonst gleichen Bedingungen von 2.5 h auf 5 h verlängert. Dieses Vorgehen führte zu mehr als 30% höheren Signalintensitäten (schwarz, Abbildung 4 A), was auf den vorverstärkenden



**Abbildung 4.** Hintergrundkorrigierte Absorption bei 450 nm (Dreifachbestimmung), Bedingungen: Reaktion I: 750 fmol **8** und 500 fmol **9** in 50  $\mu$ L Puffer (10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl, 1 mM TCEP, 0.2 mg mL<sup>−1</sup> Roche Blocking Reagent, 0.2  $\mu$ g mL<sup>−1</sup> RiboLock, pH 7.0); Reaktion II: 80  $\mu$ L Ultra-TMB-Lösung für 25 min, anschließend Zugabe von 40  $\mu$ L 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A) Inkubation mit 0.5  $\mu$ g mL<sup>−1</sup> HRP-SA, Kontrollexperiment: Sonde **15** ohne Reaktion I (weiß); B) Inkubation mit 2  $\mu$ g mL<sup>−1</sup> HRP-SA.

Effekt der Reaktion I hindeutet. In einem Kontrollexperiment wurde der Einfluss von Reaktion I auf die Signalverstärkung genauer untersucht, indem ein Analogon des Transferprodukts **11**, die Biotin- und His<sub>6</sub>-modifizierte Sonde **15** (BT-Cys-agctttatt-His<sub>6</sub>), anstelle von Reaktion I eingesetzt wurde. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit 500, 50 bzw. 5 fmol Sonde **15** behandelt und die Signale (weiß, Abbildung 4 A) mit den Werten verglichen, die für die gleiche Menge an HIV mit 750 fmol Sonde **8** und 500 fmol Sonde **9** erhalten wurden. Hierbei lieferten 500 fmol **15** ein geringfügig intensiveres Signal als 500 fmol HIV (1 Äquiv.) mit den Sonden **8** und **9**. Diese Beobachtung kann mit einer unter Umständen nicht quantitativ verlaufenden Transferreaktion erklärt werden. Mit substöchiometrischen Mengen HIV (50 und 5 fmol) ergab die Transferreaktion (5 h, schwarz) mehr als dreimal so intensive Signale wie bei Einsatz entsprechender Mengen an Sonde **15** (weiß). Demnach muss die Menge des bei der RNA-katalysierten Transferreaktion gebildeten und anschließend immobilisierten Produkts **11** die Menge an Ziel-RNA übersteigen. Dieser Befund belegt den vorverstärkenden Effekt des RNA-katalysierten Biotin-Transfers.

Um die Empfindlichkeit des Reaktionssystems zu untersuchen, wurden HIV-Mengen von 0.1–5 fmol 5 h lang mit 750 fmol **8** und 500 fmol **9** umgesetzt. Nach der anschließenden Immobilisierung der His<sub>6</sub>-modifizierten Sonden wurde mit 2.0  $\mu$ g mL<sup>−1</sup> HRP-SA inkubiert. Dieses Vorgehen ermöglichte den Nachweis von nur 500 attomol HIV (Abbildung 4 B). Ein analoger Sandwichassay, in dem eine zweifach biotinylierte PNA-Sonde immobilisiert wurde und man anschließend mit monovalentem HRP-SA inkubierte, erlaubte lediglich den Nachweis von 1000 fmol DNA.<sup>[1b]</sup> Dies belegt deutlich die Vorteile einer Vorverstärkungsreaktion und des kovalenten Anbindens des Biotin-Reporters.

Der Nachweis von Nucleinsäuremengen im Zeptomolbereich würde eine Steigerung der Empfindlichkeit um das 10<sup>5</sup>-Fache erfordern. Für die Verwendung polyvalenter anstelle von monovalenter HRP-SA wurden Empfindlichkeitssteigerungen um den Faktor 10<sup>8</sup> berichtet.<sup>[1b]</sup> Darüber hinaus könnte die Signalverstärkung durch den Einsatz verbesserter

Enzyme und/oder chemilumineszenter Substrate in kleineren Mikrotiterplatten gesteigert werden. Auch der Transfer mehrfach biotinylierter Reportergruppen ist denkbar. Keine dieser Optionen würde die in der PCR notwendige Thermozyklierung erfordern.

Das Fazit lautet, dass der DNA- und RNA-katalysierte Transfer einer Reportergruppe zur Signalverstärkung genutzt werden kann. Der RNA-katalysierte Transfer eines Biotin-Reporters ist darüber hinaus als Vorverstärkungsreaktion für ein Enzym-basiertes Auslesen geeignet. Anders als beim Nucleinsäurenachweis über eine Sandwichhybridisierung nutzt unsere Strategie die Vorteile des kovalenten Anbindens der Reportergruppe. Mit der Doppelverstärkungsstrategie (Transfer + modifizierter ELISA) war es möglich, 500 attomol einer HIV-1-RNA-Sequenz nachzuweisen. Dies übersteigt die Empfindlichkeiten bisheriger nucleinsäurekatalysierter chemischer Reaktionen.<sup>[5-8]</sup> Bemerkenswerterweise wurde diese hohe Empfindlichkeit durch Bestimmung der optischen Dichte mit einem üblichen Plattenleser und unter Verwendung von Reagentien erreicht, die in jedem klinischen Diagnostiklabor verfügbar sind. Die meisten empfindlichen Nachweismethoden benötigen dagegen spezielle, weit weniger verbreitete Geräte.

Eingegangen am 20. März 2008,  
veränderte Fassung am 8. Mai 2008  
Online veröffentlicht am 1. August 2008

**Stichwörter:** Analytische Methoden · Nucleinsäuren · RNA · Signalverstärkung · Templatkatalyse

- [1] a) B. Shlyahovsky, V. Pavlov, L. Kaganovsky, I. Willner, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4933–4937; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4815–4819; b) N. Zhang, D. H. Appella, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8424–8425; c) D. M. Kolpashchikov, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2934–2935; d) D. M. Hammond, A. Manetto, J. Gerlach, V. A. Azov, P. M. E. Gramlich, G. A. Burley, M. Maul, T. Carell, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4262–4265; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4184–4187.
- [2] a) Y. Zhang, A. Pothukuchi, W. Shin, Y. Kim, A. Heller, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4093–4097; b) B. Munge, G. Liu, G. Collins, J. Wang, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4662–4666.
- [3] X. Zhao, R. Tapec-Dytioco, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11474–11475.
- [4] a) J.-M. Nam, S. I. Stoeva, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5932–5933; b) S. I. Stoeva, J.-S. Lee, C. S. Thaxton, C. A. Mirkin, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3381–3384; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3303–3306.
- [5] a) H. Abe, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13980–13986; b) C. Dose, S. Ficht, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5495–5499; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5369–5373; c) H. Abe, Y. Kondo, H. Jinmei, N. Abe, K. Furukawa, A. Uchiyama, S. Tsuneda, K. Aikawa, I. Matsumoto, Y. Ito, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 327–333.
- [6] a) Z. Ma, J.-S. Taylor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 11159–11163; b) Z. Ma, J. S. Taylor, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2501–2510; c) J. Brunner, A. Mokhir, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12410–12411; d) F. H. Zelder, J. Brunner, R. Krämer, *Chem. Commun.* **2004**, 902–903; e) I. Boll, R. Krämer, J. Brunner, A. Mokhir, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7849–7856; f) J. Cai, X. Li, J. S. Taylor, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 751–754.
- [7] a) J. Cai, X. Li, X. Yue, J. S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16324–16325; b) Z. L. Pianowski, N. Winssinger, *Chem. Commun.* **2007**, 3820–3822.
- [8] T. N. Grossmann, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15596–15597.
- [9] S. Ficht, A. Mattes, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9970–9981.
- [10] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.
- [11] a) Z. J. Gartner, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6961–6963; b) Z. J. Gartner, M. W. Kanan, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1874–1878; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1796–1800.
- [12] a) A. Mattes, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3277–3280; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3178–3181; b) S. Ficht, C. Dose, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2098–2103.
- [13] Im Prinzip sollte die lokale Flexibilität immer dann von Vorteil sein, wenn die reaktiven Gruppen nicht optimal angeordnet sind. Wir glauben, dass Transferreaktionen andere Anforderungen haben als Verknüpfungsreaktionen. Nach dem wahrscheinlich geschwindigkeitsbestimmenden Thiolaustausch bleiben bei den Verknüpfungen beide Sonden hybridisiert, da sie bereits verknüpft vorliegen. Dagegen sind beim Transfer die Sonden nach dem Thiolaustausch nicht verknüpft und können den Komplex verlassen. Somit sollten Abweichungen von der Duplexgeometrie bei Transferreaktionen besser toleriert werden, da diese den Übergangszustand weniger stören. In Analogie zu den Baldwin-Regeln sollte es einen optimalen Abstand der reaktiven Gruppen geben, der für den Transfer bei 3 nt liegt.
- [14] a) J. A. McSwiggen, T. R. Cech, *Science* **1989**, *244*, 679–683; b) N. Paul, G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12733–12740.
- [15] C. Drosten, M. Panning, J. F. Drexler, F. Hansel, C. Pedroso, J. Yeats, L. K. D. Luna, M. Samuel, B. Liedigk, U. Lippert, M. Sturmer, H. W. Doerr, C. Brites, W. Preiser, *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 1258–1266.
- [16] M. R. Jakobsen, C. K. Damgaard, E. S. Andersen, A. Podhajska, J. Kjems, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e67.