

# Strukturen von DNA-Polymerasen mit 4'-alkylierten Nucleotiden im aktiven Zentrum\*\*

Karin Betz, Frank Streckenbach, Andreas Schnur, Thomas Exner, Wolfram Welte, Kay Diederichs und Andreas Marx\*

Professor Richard R. Schmidt zum 75. Geburtstag gewidmet

Die Integrität des Genoms basiert größtenteils auf der Fähigkeit von DNA-Polymerasen, die templatabhängige DNA-Synthese während der DNA-Replikation, -Reparatur und -Rekombination selektiv nach der Watson-Crick-Regel zu katalysieren. Manchen DNA-Polymerasen gelingt die selektive Informationsweitergabe an die Nachkommen nach der Watson-Crick-Regel mit einer intrinsischen Fehlerrate von nur einem Fehler pro eine Million synthetisierter Nucleotide.<sup>[1]</sup> Diese Rate liegt wesentlich unter dem Wert, den man erwarten würde, wenn man hauptsächlich die energetischen Unterschiede zwischen kanonischer (d. h. Watson-Crick-) und nichtkanonischer Paarung der Nucleobasen berücksichtigt.<sup>[1]</sup> Als maßgebend für die Selektivität von DNA-Polymerasen gelten weitgehend geometrische Faktoren.<sup>[1]</sup> So nimmt man an, dass sehr selektive DNA-Polymerasen kanonische Nucleotide aufgrund genauer sterischer Komplementarität des neu gebildeten Basenpaars zum aktiven Zentrum des Enzyms selektieren.

Synthetische Nucleotidanaloga mit gezielt entworfenen, neuen Eigenschaften kommen häufig zum Einsatz, um Mechanismen zu untersuchen, die für die Selektivität von DNA-Polymerasen verantwortlich sind.<sup>[2]</sup> So wurden isostere Nucleotide mit hydrophoben Nucleobasen entwickelt, um den Beitrag von Wasserstoffbrücken zur Selektivität von DNA-Polymerasen zu studieren.<sup>[1d,e,3]</sup> Zur Untersuchung sterischer Effekte bei der Wechselwirkung von DNA-Polymerasen mit ihrem Substrat haben wir 4'-Alkyl-modifizierte Nucleotide mit zunehmendem sterischem Anspruch entwickelt.<sup>[4]</sup> Die Modifikationen wurden am Zuckerrest eingeführt, da Struktur- und Funktionsstudien von DNA-Polymerasen ergaben, dass die Zuckerreste von Nucleotiden an der Substraterkennung beteiligt sind. Diese Wechselwirkungen könnten für das Enzym, zusätzlich zur Geometrie der Nucleobasen, eine Möglichkeit zur Selektion bieten. Es wurden Alkylgruppen verwendet, da so mögliche Auswirkungen auf die Wasser-

stoffbrücken und Konformationen der Nucleotide minimiert sind. Durch den Einsatz dieser vergrößerten Nucleotide in funktionellen Studien an DNA-Polymerasen konnte der Einfluss unterschiedlicher sterischer Parameter auf die Selektivität von DNA-Polymerasen untersucht werden. Hier zeigen wir die ersten Kristallstrukturen einer DNA-Polymerase im Komplex mit 4'-methyliertem oder 4'-ethyliertem Thymidin-5'-triphosphat.

Durch hochaufgelöste Kristallstrukturen der KlenTaq, einer N-terminal verkürzten Form der DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*,<sup>[5]</sup> konnten Waksman et al. bedeutende Erkenntnisse über den Einbaumechanismus von Nucleotiden während der DNA-Polymerisation gewinnen.<sup>[6]</sup> KlenTaq ist ein Mitglied der DNA-Polymerasen-Sequenzfamilie A, die in Pro- und Eukaryoten an der DNA-Replikation und -Reparatur beteiligt sind.<sup>[7,8]</sup> Da es noch keine Daten über das Verhalten der KlenTaq beim Einbau 4'-alkylierter Thymidin-5'-triphosphate (dT<sup>R</sup>TPs) gibt, untersuchten wir zuerst die Kinetik des Nucleotideinbaus mithilfe der Quench-Flow-Technik (Tabelle 1). Unsere Daten zeigen, dass KlenTaq die

**Tabelle 1:** Kinetische Daten der Nucleotideinbauten durch KlenTaq-Wildtyp und I614-Mutante.

dT <sup>R</sup> TP	$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{\text{pol}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{\text{pol}}/K_D$ [ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	rel. Eff. <sup>[a]</sup>
<i>Wildtyp</i>				
dT <sup>H</sup> TP	25.0 ± 3.1	8.80 ± 0.34	352 000	1
dT <sup>Me</sup> TP	119 ± 20	0.17 ± 0.01	1430	0.0041
dT <sup>Et</sup> TP	115 ± 16	0.13 ± 0.01	1130	0.0032
<i>I614A</i>				
dT <sup>H</sup> TP	6.83 ± 0.55	13.3 ± 0.3	1 950 000	1
dT <sup>Me</sup> TP	10.4 ± 0.8	3.62 ± 0.08	350 000	0.18
dT <sup>Et</sup> TP	4.44 ± 0.37	2.01 ± 0.04	450 000	0.23

[a] rel. Eff.: relative Effizienz; Effizienz:  $k_{\text{pol}}/K_D$ .

[\*] K. Betz,<sup>[†]</sup> F. Streckenbach,<sup>[†]</sup> Dr. A. Schnur, Prof. Dr. T. Exner, Prof. Dr. W. Welte, Prof. Dr. K. Diederichs, Prof. Dr. A. Marx Fachbereiche Chemie und Biologie, Konstanz Research School Chemical Biology, Universität Konstanz Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland) Fax: (+49) 7531-88-5140 E-Mail: andreas.marx@uni-konstanz.de

[†] Diese Autoren trugen zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit bei.

[\*\*] Wir danken der DFG für finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200905724> zu finden.

vergrößerten Nucleotide mit geringerer Effizienz ( $k_{\text{pol}}/K_D$ ,  $K_D$  = Dissoziationskonstante,  $k_{\text{pol}}$  = Polymerisationskonstante) als das natürliche Pendant (dT<sup>H</sup>TP) einbaut: Während der  $K_D$ -Wert nur 4–5-fach erhöht ist, wurde eine 51- und 67-fache Verringerung des  $k_{\text{pol}}$ -Wertes beobachtet. Für beide vergrößerten Nucleotide wurden ähnliche kinetische Werte erhalten. Die Veränderung der Einbaueffizienz durch Einführung einer zusätzlichen Methylengruppe in das natürliche Nucleotid ist deutlich größer als der Unterschied zwischen der

Methyl- und Ethylmodifikation. Ähnliche Effekte wurden bereits in Studien an Enzymen aus derselben Sequenzfamilie beobachtet.<sup>[4a,f,g]</sup>

Um die strukturellen Hintergründe für die Prozessierung von dT<sup>R</sup>TP durch KlenTaq aufzudecken, versuchten wir, Kristalle der Enzyme im Komplex mit Primer, Templat und eintretendem dT<sup>R</sup>TP zu erhalten. Tatsächlich konnten wir unter Verwendung einer beschriebenen Kristallisationsstrategie<sup>[6]</sup> mehrere Kristalle erhalten und ihre Strukturen lösen. Die Kristalle des ternären Komplexes der KlenTaq mit gebundenem dT<sup>R</sup>TP wurden aus einem Ansatz erhalten, der außer dem Enzym auch einen 11nt-Primer (nt = Nucleotid) sowie ein komplementäres 16nt-Templat mit einer 3'-GA-5'-Sequenz im Anschluss an das 3'-Ende des Primers enthielt. Zugabe von 2',3'-Didesoxycytidin-5'-triphosphat (ddCTP) und dT<sup>R</sup>TP führt zur Verlängerung des Primers und dem Einbau von 2',3'-Didesoxycytidin-5'-monophosphat. Da das neu gebildete Primerende am Zuckerrest keine 3'-OH-Gruppe trägt, wird eine weitere Verlängerung verhindert, und es wurde erwartet, dass das dT<sup>R</sup>TP an der dNTP-Bindungsstelle bindet.

Die erhaltenen Kristalle beugten bis zu einer Auflösung von 2.0 und 2.2 Å, und die Strukturen wurden durch Differenz-Fourier-Techniken gelöst (Details siehe Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen). Die Strukturen zeigen eine Momentaufnahme des Einbaus von dT<sup>Me</sup>TP bzw. dT<sup>Et</sup>TP gegenüber von einem Adenin im Templat.

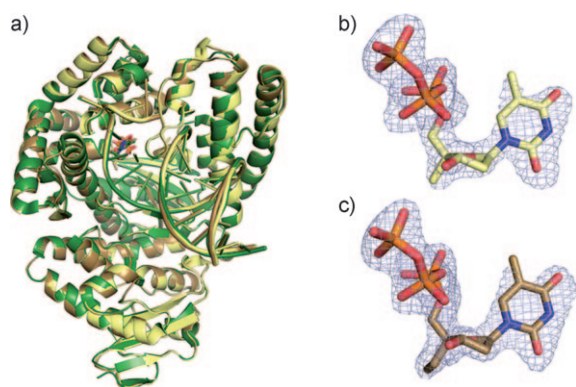
Die Strukturen der KlenTaq im Komplex mit dT<sup>Me</sup>TP und dT<sup>Et</sup>TP sind sehr ähnlich zur KlenTaq-Struktur im Komplex mit ddT<sup>H</sup>TP (PDB-Code: 1QTM), die schon früher beschrieben wurde<sup>[6c]</sup> (0.34 und 0.31 Å mittlere quadratische Abweichung für Cα-Atome). Dies zeigt, dass die Modifikationen nur eine geringe Auswirkung auf die Gesamtkonformation des Enzyms haben (Abbildung 1 a). Speziell im aktiven Zentrum zeigt das Aminosäurerückgrat nur minimale Abweichungen. Das Gleiche gilt für den Primer- und Templatstrang der DNA. Die DNA liegt größtenteils in der B-

Form vor. Eine Ausnahme bilden die drei Basenpaare am Ende des DNA-Duplexes in Nachbarschaft zum aktiven Zentrum: Diese weisen eine A-Form auf, wie es auch in den Strukturen mit nichtmodifizierten Nucleotiden gefunden wurde.<sup>[6]</sup> Die Elektronendichte in den früher publizierten Strukturen der KlenTaq im ternären Komplex mit einem 16nt-Templat hatte nur die Modellierung von 14 Nucleotiden ermöglicht,<sup>[6]</sup> während bei den nun von uns gelösten Strukturen das gesamte Templat aufgelöst wurde. Die zwei 5'-terminalen Nucleotide des Templatstrangs zeigen in Richtung der Daumendomäne der Polymerase und nehmen in den zwei Strukturen leicht unterschiedliche Orientierungen ein (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Die Differenzdichten in der Nucleotid-Bindungsstelle belegen, dass dT<sup>Me</sup>TP und dT<sup>Et</sup>TP tatsächlich in der Struktur vorhanden sind. Das verfeinerte Modell zeigt, dass die 2'-Desoxyribose des Nucleotids in der N-Konformation vorliegt (Abbildung 1 b,c), analog zu ddT<sup>H</sup>TP in der Struktur 1QTM. Weiterhin sind die Orientierung der Nucleobase in Bezug auf das codierende Adenin sowie die Triphosphateinheit ebenfalls vergleichbar mit den Daten, die mit dem natürlichen Nucleotid erhalten wurden (siehe Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen). Die Bindung des dNTP durch das Enzym wird begleitet von einer Umoorientierung der Struktur. Besonders die Bewegung der O-Helix wurde als entscheidender Punkt in dem Prozess diskutiert, bei dem das eintretende Nucleotid zum aktiven Zentrum gelangt. Das Schließen der O-Helix soll die nachfolgende Katalyse vorantreiben.<sup>[10]</sup> In den hier beschriebenen Strukturen ist die Konformation der jeweiligen O-Helix vergleichbar mit jener der publizierten Struktur mit ddT<sup>H</sup>TP (siehe Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen).

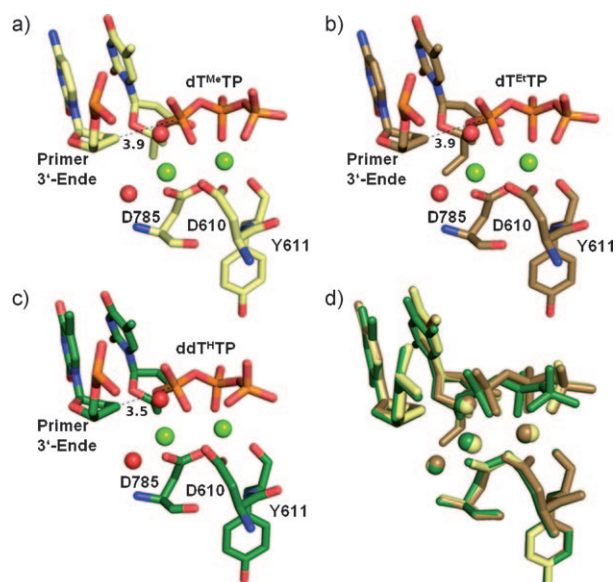
Die Daten für dT<sup>Me</sup>TP und dT<sup>Et</sup>TP zeigen, dass die Schließbewegung vollständig stattfinden kann und alle Komponenten des aktiven Zentrums richtig platziert sind, um dem Enzym die Katalyse einer Phosphodiester-Bindungsbildung zu ermöglichen (Abbildung 2).

Ähnliche Konformationen werden für die publizierte Struktur mit ddT<sup>H</sup>TP<sup>[6]</sup> gefunden. Für die Anordnung des eintretenden Nucleotids, der Magnesiumionen und der Wassermoleküle findet man ebenfalls nur minimale Unterschiede (Abbildung 2). Die Strukturen mit dT<sup>Me</sup>TP, dT<sup>Et</sup>TP und ddT<sup>H</sup>TP lassen sich gut überlagern, was darauf schließen lässt, dass das Enzym die Nucleotide nach einem ähnlichen Mechanismus einbaut. Unsere Kinetikstudien jedoch zeigen, dass die Phosphodiesterbindung zum eintretenden dT<sup>R</sup>TP mit bedeutend niedrigerer Effizienz gebildet wird (Tabelle 1). Zwischen der C3'-Position des Primerendes und dem Phosphoratom der α-Phosphateinheit des eintretenden dT<sup>R</sup>TP wird in den dT<sup>Me</sup>TP- und dT<sup>Et</sup>TP-haltigen Strukturen ein Abstand von 3.9 Å beobachtet. In der publizierten Struktur der KlenTaq im Komplex mit ddT<sup>H</sup>TP<sup>[6c]</sup> wurde ein kleinerer Abstand von 3.5 Å bestimmt. Auch wenn diese Zunahme der Abstände mit der Abnahme der Einbaueffizienzen korreliert, muss man beachten, dass die Strukturvariationen bei dieser Auflösung innerhalb des Fehlers der Modellverfeinerung liegen.

Neue Studien belegen, dass das Schließen der O-Helix zu schnell vonstatten geht, um in der Reaktion geschwindig-



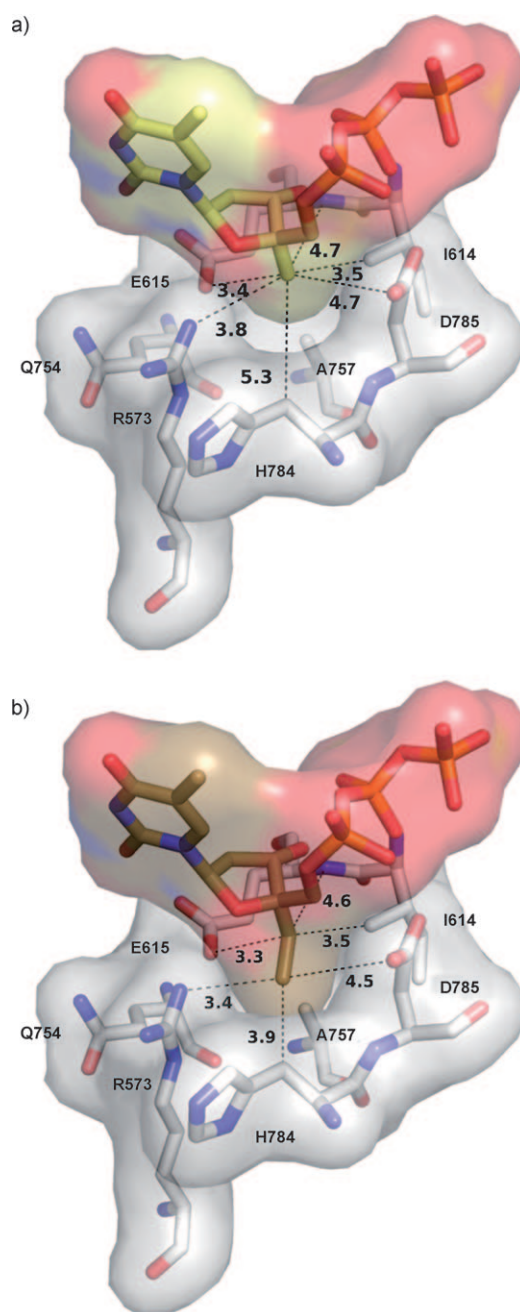
**Abbildung 1.** Strukturen der ternären Komplexe der KlenTaq-DNA-Polymerase. a) Überlagerung der Gesamtstrukturen der KlenTaq im Komplex mit Primer, Templat und dT<sup>Me</sup>TP (gelb), dT<sup>Et</sup>TP (braun) oder ddT<sup>H</sup>TP (grün). KlenTaq ist in Bänderdarstellung gezeigt, die 4'-alkylierten Nucleotide als Stabmodelle. b) dT<sup>Me</sup>TP (C gelb, O rot, N blau, P orange) und c) dT<sup>Et</sup>TP (C braun) im Komplex, überlagert mit der jeweiligen mFo-DFc simulated annealing omit map bei 4σ. Alle Abbildungen wurden mit PyMOL<sup>[9]</sup> erstellt.



**Abbildung 2.** Sicht auf das 3'-Ende des Primers, das eintretende Nucleotid und die Aminosäuren, die die zweiwertigen Kationen komplexieren; Farbcode der Stabmodelle wie in Abbildung 1 b,c. a) Struktur des ternären Komplexes der KlenTaq mit Primer, Templat und dT<sup>Me</sup>TP. Wassermoleküle (rot) und Magnesiumionen (grün) sind als Kugeln gezeigt. b) Wie in (a), für den ternären Komplex mit dT<sup>Et</sup>TP. c) Wie in (a), unter Verwendung der publizierten Struktur mit ddT<sup>H</sup>TP. d) Überlagerung der drei Strukturen in (a)–(c) nach dem Farbcode in Abbildung 1 a.

keitsbestimmend zu sein.<sup>[11]</sup> Damit sind andere Schritte, die nach dem Schließen der O-Helix und der richtigen Platzierung der eintretenden Nucleobase stattfinden, geschwindigkeitsbestimmend. Da es nicht möglich ist, andere Zwischenprodukte der chemischen Reaktion im Experiment abzufangen, können wir über den Grund der kinetischen Unterschiede nur spekulieren. Zuvor haben Warshel et al. empirische Valenzbindungsrechnungen an der T7-DNA-Polymerase durchgeführt, die zeigten, dass der nucleophile Angriff und nicht die Bildung des ternären Komplexes geschwindigkeitsbestimmend ist.<sup>[12]</sup> Die Simulationen legten ebenfalls nahe, dass sehr geringfügige Konformationsunterschiede, die aus falsch gepaarten Basen resultieren, zu steigenden Reaktionsbarrieren führen können. Theoretische Studien an DNA-Polymerase  $\beta$  kamen zum selben Ergebnis: Kleine Änderungen im Bindungsmuster des Substrats können zu starken Änderungen im Reaktionsmechanismus führen.<sup>[13]</sup> Auf ähnliche Weise könnte die sterische Hinderung, die von den zusätzlichen Alkylgruppen der Sonden verursacht wird, dazu führen, dass die Reaktion auf einem Weg mit einer größeren Reaktionsbarriere abläuft. Letztlich könnte auch der Öffnungsschritt durch den veränderten sterischen Anspruch beeinflusst sein.<sup>[14]</sup>

Um Einblicke in potenziell wichtige Wechselwirkungen der Modifikationen mit nahe gelegenen Aminosäureresten zu erhalten, untersuchten wir die Proteinumgebung genauer. Die 4'-Alkylmodifikationen zeigen in einen Spalt innerhalb der Nucleotidbindungstasche (Abbildung 3). Die kleinsten Abstände zwischen der Modifikation und den Aminosäure-



**Abbildung 3.** Aminosäurereste in der Nähe der 4'-Modifikationen von a) dT<sup>Me</sup>TP und b) dT<sup>Et</sup>TP; Farbcode wie in Abbildung 1 b,c. Zusätzlich zu den Stabmodellen sind transparent die Connolly-Oberflächen gezeigt.

resten befinden sich zwischen der 4'-Methylgruppe bzw. der Methyleinheit der 4'-Ethylgruppe und der Aminosäure I614 (3.5 Å für dT<sup>Me</sup>TP bzw. dT<sup>Et</sup>TP) sowie E615 (3.4 bzw. 3.3 Å). Diese Tatsache macht diese Reste zu primären Angriffspunkten für eine Mutationsanalyse. Gemäß einer älteren Arbeit ist ein Carboxylatrest an Position 615 für die Katalysfähigkeit des Enzyms erforderlich.<sup>[15]</sup> So konzentrierten wir unsere Untersuchungen auf I614, dessen Beitrag zur Selektivität und Zuckerkennung schon früher diskutiert wurde.<sup>[15,16]</sup> Durch zielgerichtete Mutagenese ersetzen wir



Isoleucin durch Alanin. Die I614A-Mutation sollte die sterische Hemmung im aktiven Zentrum der KlenTaq durch die Abwesenheit einer  $\beta$ -Alkylseitenkette aufheben. Die gereinigte Mutante wurde durch transiente Kinetiken, wie oben beschrieben, untersucht (Tabelle 1). Die I614A-Mutante baut die 4'-alkylierten Nucleotide dT<sup>M</sup>TP und dT<sup>E</sup>TP mit derselben Aktivität ein wie das Wildtypenzym das unmodifizierte dT<sup>H</sup>TP. Dies führt zu einer mehr als 240- bzw. 400-fach erhöhten Einbaueffizienz für die modifizierten Nucleotide und geht mit einer 6-fachen Zunahme der Prozessierung von dT<sup>H</sup>TP durch die I614A-Mutante im Vergleich zum KlenTaq-Wildtyp einher. Eine Herabsetzung des sterischen Anspruchs im aktiven Zentrum des Enzyms durch die Mutation der Aminosäure I614, die sich in der Nähe der 4'-Alkylmodifikation befindet, führt so zu einer starken Zunahme der Einbaueffizienz der größeren Nucleotide. Dieser Befund zeigt, dass I614 – ein von Bakterien bis zum Menschen in DNA-Polymerasen dieser Sequenzfamilie stark konservierter Rest (siehe Hintergrundinformationen) – eine wichtige Rolle bei der Zuckererkennung der KlenTaq spielt.

Wir haben hier über Strukturaspekte von vergrößerten Nucleotidsonden im aktiven Zentrum einer DNA-Polymerase berichtet. Die Nucleotidsonden nehmen fast identische Konformationen wie das unmodifizierte Substrat ein, und das Gleiche gilt für die Proteinseitenketten. Da sich die Kinetiken des Nucleotideinbaus von natürlichen und vergrößerten Nucleotiden signifikant unterscheiden, lässt die Tatsache, dass fast identische Konformationen von Enzym und Substrat gefunden werden, darauf schließen, dass mechanistische Schritte geschwindigkeitsbestimmend sind, die in den Kristallstrukturen nicht aufgelöst sind. Das Zusammenspiel mit verschiedenen Enzymseitenketten könnte dafür ursächlich sein. In der Tat erhöht die Mutation einer einzelnen Seitenkette nahe der 4'-Modifikation die Einbaueffizienz der vergrößerten Nucleotide bis auf den Wert des unmodifizierten Substrats. Weitere Strukturuntersuchungen des Wechselspiels von vergrößerten Nucleotiden mit DNA-Polymerasen werden gegenwärtig durchgeführt, um tiefere Einblicke in die veränderte Selektivität des Enzyms durch Mutation zu erhalten.

Eingegangen am 12. Oktober 2009,  
veränderte Fassung am 5. Januar 2010  
Online veröffentlicht am 22. Juni 2010

**Stichwörter:** DNA · DNA-Polymerasen · DNA-Replikation · Strukturaufklärung · Nucleotide

- [1] a) H. Echols, M. F. Goodman, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, 60, 477; b) M. F. Goodman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 10493; c) T. A. Kunkel, K. Bebenek, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 497; d) E. T. Kool, J. C. Morales, K. M. Guckian, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 1046; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 990; e) E. T. Kool, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, 71, 191; f) A. J. Berdis, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2862.
- [2] K.-H. Jung, A. Marx, *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, 62, 2080.
- [3] a) T. W. Kim, J. C. Delaney, J. M. Essigmann, E. T. Kool, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 15803; b) S. Mizukami, T. W. Kim, S. A. Helquist, E. T. Kool, *Biochemistry* **2006**, 45, 2772; c) T. W. Kim, L. G. Briebe, T. Ellenberger, E. T. Kool, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 2289; d) H. O. Sintim, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 396; e) H. O. Sintim, E. T. Kool, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 2008; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1974; f) A. P. Silverman, Q. Jiang, M. F. Goodman, E. T. Kool, *Biochemistry* **2007**, 46, 13874.
- [4] a) D. Summerer, A. Marx, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 3806; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3693; b) M. Strerath, D. Summerer, A. Marx, *ChemBioChem* **2002**, 3, 578; c) M. Strerath, J. Cramer, T. Restle, A. Marx, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11230; d) J. Cramer, M. Strerath, A. Marx, T. Restle, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 43593; e) F. Di Pasquale, D. Fischer, D. Grohmann, T. Restle, A. Geyer, A. Marx, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 10748; f) J. Cramer, G. Rangam, A. Marx, T. Restle, *ChemBioChem* **2008**, 9, 1243; g) F. Streckenbach, G. Rangam, H. M. Möller, A. Marx, *ChemBioChem* **2009**, 10, 1630.
- [5] W. M. Barnes, *Gene* **1992**, 112, 29.
- [6] a) S. Korolev, M. Nayal, W. M. Barnes, E. Di Cera, G. Waksman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 9264; b) Y. Li, S. Korolev, G. Waksman, *EMBO J.* **1998**, 17, 7514; c) Y. Li, V. Mitaxov, G. Waksman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 9491; d) Y. Li, G. Waksman, *Protein Sci.* **2001**, 10, 1225.
- [7] a) U. Hübscher, G. Maga, S. Spadari, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, 71, 133; b) M. F. Goodman, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, 71, 17; c) W. Yang, R. Woodgate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 15591.
- [8] M. Seki, C. Masutani, L. W. Yang, A. Schuffert, S. Iwai, I. Bahar, R. D. Wood, *EMBO J.* **2004**, 23, 4484.
- [9] PyMOL, W. L. DeLano, DeLano Scientific, Palo Alto, USA, **2002**.
- [10] a) H. Pelletier, M. R. Sawaya, A. Kumar, S. H. Wilson, J. Kraut, *Science* **1994**, 264, 1891; b) S. Doublié, S. Tabor, A. M. Long, C. C. Richardson, T. Ellenberger, *Nature* **1998**, 391, 251; c) H. F. Huang, R. Chopra, G. L. Verdine, S. C. Harrison, *Science* **1998**, 282, 1669; d) M. C. Franklin, J. Wang, T. A. Steitz, *Cell* **2001**, 105, 657; e) H. Ling, F. Boudsocq, R. Woodgate, W. Yang, *Cell* **2001**, 107, 91; f) H. Ling, F. Boudsocq, B. S. Plosky, R. Woodgate, W. Yang, *Nature* **2003**, 424, 1083.
- [11] P. J. Rothwell, V. Mitaksov, G. Waksman, *Mol. Cell* **2005**, 19, 345.
- [12] a) J. Florián, A. Warshel, M. F. Goodman, *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 5739; b) J. Florián, M. F. Goodman, A. Warshel, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8163; c) J. Florián, M. F. Goodman, A. Warshel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 6819.
- [13] a) K. Arora, W. A. Beard, S. H. Willson, T. Schlick, *Biochemistry* **2005**, 44, 13328; b) R. Radhakrishnan, T. Schlick, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 13245; c) R. Radhakrishnan, T. Schlick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 5970.
- [14] L. Yang, W. A. Beard, S. H. Wilson, B. Roux, S. Broyde, T. Schlick, *J. Mol. Biol.* **2002**, 321, 459.
- [15] P. H. Patel, L. A. Loeb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 5095.
- [16] P. H. Patel, H. Kawate, E. Adman, M. Ashbach, L. A. Loeb, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 5044.