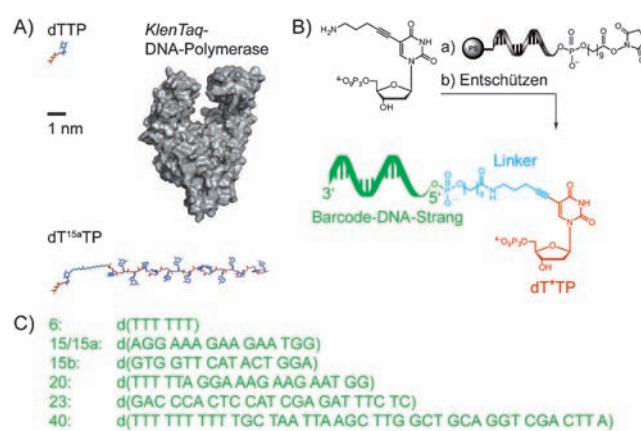


# Barcode-modifizierte Nukleotide\*\*

Anna Baccaro, Anna-Lena Steck und Andreas Marx\*

DNA als Informationsspeichersystem ist einfach zu verstehen, aber gleichzeitig komplex. Die Komplexität entsteht durch die vielen verschiedenen Anordnungsmöglichkeiten der vier natürlichen Nukleotide.<sup>[1]</sup> Die DNA-Synthese katalysiert durch DNA-Polymerasen ist faszinierend, da diese Enzyme in der Lage sind, die Verlängerung eines Primerstranges durch die Erkennung des DNA-Templats und die Auswahl des passenden Nukleotids zu katalysieren.<sup>[1b,2]</sup> Diese Fähigkeit kann genutzt werden, um die Variationsmöglichkeit des Vier-Basen-Codes durch den Austausch der natürlichen Substrate mit modifizierten Analoga zu erhöhen.<sup>[3]</sup> Nukleotid-Analoga, die mit verschiedensten detektierbaren Gruppen (z.B. Farbstoffen, Tags oder Spinmarkierungen)<sup>[4]</sup> versehen sind, können in durch DNA-Polymerasen katalysierten Reaktionen eingesetzt werden, um das Anwendungsspektrum der DNA zu erhöhen (beispielsweise zur Strukturcharakterisierung, Sequenzierung oder Immobilisierung).<sup>[4d,5]</sup> Die Information, die durch die detektierbare Gruppe eingebracht wird, ermöglicht es, durch die Auswertung des erhaltenen Signals, Rückschlüsse zu ziehen. Ein immenser Vorteil könnte durch eine detektierbare Gruppe erreicht werden, die die Eigenschaften eines Barcode-Etiketts trägt. Typischerweise enthält das Barcode-Etikett (ein Begriff, der in anderen Kontexten schon im Zusammenhang mit DNA verwendet wurde) selbst keine Information, sondern es besteht aus einer Reihe von Symbolen, die einer hinterlegten Information zugeordnet werden können.<sup>[6]</sup> Um ein möglichst breites Anwendungsspektrum abzudecken, sollte das Barcode-Etikett einfach aufgebaut und leicht angebracht werden können und eine zuverlässige Zuordnung zur hinterlegten Information gewährleisten. Oligodesoxynukleotide (ODNs) erfüllen diese Anforderungen in großem Maße, da sie durch einen einfachen Code aufgebaut sind und Eigenschaften wie Selbstorganisation und Hybridisierung eine eindeutige Zuordnung gewährleisten. Um dieses Barcode-Etikett in DNA einzubringen ist ein enzymatischer Ansatz, ausgehend von ODN-modifizierten Nukleotiden

(Barcode-markierten Nukleotiden) wünschenswert.<sup>[7]</sup> Allerdings sollte der sterische Anspruch dieser modifizierten Nukleotide den enzymatischen Einbau erschweren. Es ist uns gelungen, trotz des erhöhten sterischen Anspruchs, die enzymatische Synthese von Barcode-markierter DNA durchzuführen. Dafür wurden ODN-modifizierte Nukleotide eingesetzt, die bis zu 40fach größer als die natürlichen Nukleotide und erheblich länger als der Durchmesser einer DNA-Polymerase sind (Abbildung 1 A).



**Abbildung 1.** A) Schematischer Vergleich der Größenverhältnisse. dTTP versus dT<sup>15a</sup>TP verglichen mit KlenTaq-DNA-Polymerase. B) Reaktionspfad zur Synthese der ODN-modifizierten dTTP. Ausbeuten und DNA-Sequenzen sind in Tabelle S1 gelistet. C) Sequenzen der Barcode-DNA-Stränge; die Zahlen geben die Oligonukleotidlänge wieder.

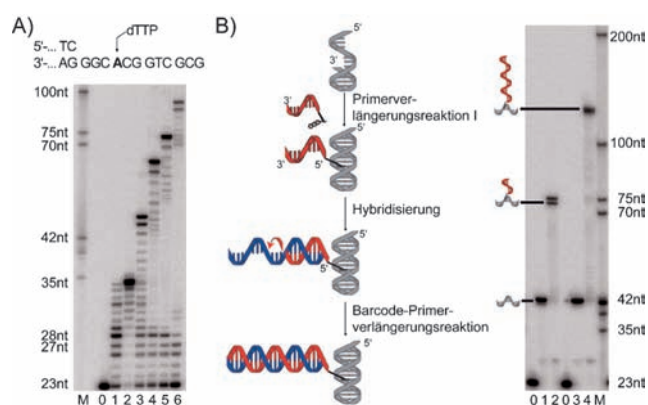
Wir berichten hier über 2'-Desoxyribonukleotid-Analoga, die einen ODN-Strang an der Nukleobase tragen (Abbildung 1B) und als Substrate für durch DNA-Polymerasen katalysierte Reaktionen dienen. Wir wählten die C5-Position der Pyrimidine und die C7-Position der 7-Desazapurine um den DNA-Einzelstrang anzubringen, da Modifikationen an diesen Stellen bereits in mehreren Fällen von DNA-Polymerasen akzeptiert wurden.<sup>[3,8]</sup> Um Nukleotide mit einem Barcode-Etikett zu versehen, wurde ein an der festen Phase immobilisierter ODN-Strang mit einem kommerziell erhältlichen Carboxylierungsreagens am 5'-Ende modifiziert und anschließend mit aminfunktionalisierten 2'-Desoxynukleosidtriphosphaten gekuppelt (Abbildung 1B, weitere Informationen befinden sich in den Hintergrundinformationen). Nach dem Entschützen und Abspalten der festen Phase wurden diese ODN-modifizierten Nukleotide in durch DNA-Polymerasen katalysierten Primerverlängerungsreaktionen untersucht (Ausbeuten und DNA-Sequenzen sind in Abbildung 1C und Tabelle S1 aufgeführt).

[\*] Dr. A. Baccaro,<sup>[†]</sup> Dipl.-Chem. A.-L. Steck,<sup>[†]</sup> Prof. Dr. A. Marx  
Fachbereich Chemie und Konstanz Research School Chemical  
Biology, Universität Konstanz  
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)  
E-Mail: andreas.marx@uni-konstanz.de  
Homepage: <http://www.chemie.uni-konstanz.de/~agmarx/>

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

[\*\*] Wir bedanken uns für die Unterstützung seitens der Konstanz Research School Chemical Biology, bei der Arbeitsgruppe C. Hauck, Universität Konstanz, für die Benutzung ihrer Ausstattung und beim Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst, Baden-Württemberg, für finanzielle Unterstützung innerhalb des Programms Bionik.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201105717> zu finden.



**Abbildung 2.** A) Teilabbildung der DNA-Sequenzen des Primers und des Templats (weitere Informationen befinden sich in den Hintergrundinformationen) und PAGE-Analyse der Primerverlängerungsstudie unter Benutzung der *Therminator*-DNA-Polymerase, einem 23-nt-Primer, einem 35-nt-Templat und 10 µM dNTPs. M: DNA-Leiter; Spur 0: 5'-<sup>32</sup>P-markierter Primer; Spur 1: Primerverlängerungsreaktion in Gegenwart von dATP, dCTP und dGTP; Spur 2: wie Spur 1, aber in Gegenwart von dTTP; Spur 3: wie Spur 1, aber in Gegenwart von dT<sup>15a</sup>TP; Spur 4: wie Spur 1, aber in Gegenwart von dT<sup>23</sup>TP; Spur 5: wie Spur 1, aber in Gegenwart von dT<sup>40</sup>TP. B) Verlängerung eines einzelnen eingebauten dT<sup>23</sup>MP. Linke Seite: In diesem Experiment durchgeführte Reaktionsabfolge (weitere Informationen befinden sich in den Hintergrundinformationen). Rechte Seite: PAGE-Analyse der Primerverlängerungsreaktion unter Benutzung der *KlenTaq*-DNA-Polymerase. M: DNA-Leiter; Spur 0: 5'-<sup>32</sup>P-markierter Primer, Spur 1: Primerverlängerungsreaktion I in Gegenwart von dATP, dCTP, dGTP und dTTP; Spur 2: in Gegenwart von dATP, dCTP, dGTP und dT<sup>23</sup>TP; Spur 3: Barcode-Primerverlängerungsreaktion unter Benutzung von natürlichen dNTPs und unmodifizierter DNA; Spur 4: Barcode-Primerverlängerungsreaktion unter Benutzung von natürlichen dNTPs und dT<sup>23</sup>MP-modifizierter DNA.

Zunächst wurde die Akzeptanz der ODN-modifizierten Thymidine als Substrat für DNA-Polymerasen in Primerverlängerungsreaktionen untersucht (Abbildung 2A für *Therminator*-DNA-Polymerase, Abbildung S1 für *KlenTaq*-DNA-Polymerase). Hierfür benutzten wir einen am 5'-Ende radioaktiv markierten, 23 Nukleotide langen (nt) Primer und ein 35-nt-Templat. Das Templat trägt an Position 27 ein A, das für den Einbau eines Tymidinanalogs codiert, nachdem der Primer um 3 Nukleotide verlängert wurde (Abbildung 2A). Reaktionen mit DNA-Polymerase in Abwesenheit eines Tymidinanalogs pausierten hauptsächlich bei Position 27 und danach, ohne signifikante Mengen an Vollängenprodukt zu generieren (Abbildung 2A, Spur 1). Reaktionen, denen alle vier natürlichen dNTPs zugesetzt wurden, zeigten Vollängenprodukt (Abbildung 2A, Spur 2). Tauscht man natürliches Thymidin durch eines der modifizierten Triphosphate aus (dT<sup>6</sup>TP, dT<sup>15a</sup>TP, dT<sup>23</sup>TP oder dT<sup>40</sup>TP; Hinweis: die hochgestellte Ziffer gibt die Barcode-Etikettenlänge wieder. DNA-Sequenzen sind in Abbildung 1c und in Tabelle S1 gelistet), erhält man Vollängenprodukt (Abbildung 2A, Spuren 3–6). Doppelbanden wurden aufgrund von bereits bekanntem templatunabhängigem Nukleotideinbau am 3'-Ende erhalten.<sup>[9]</sup> Wie erwartet, bewegen sich die Reaktionsprodukte auf dem denaturierenden Polyacrylamidgel (PAGE) deutlich langsamer als die unmodifizierten Vollängenprodukte.

Daraus lässt sich schließen, dass die sterisch anspruchsvollen Nukleotide zur DNA-Synthese verwendet worden sind. Die Mobilität nimmt mit zunehmender Barcode-Etikettenlänge ab, was durch den Unterschied im Molekulargewicht und den zusätzlichen sterischen Anspruch des eingebauten Barcode-DNA-Strangs erklärt wird. Über Veränderungen der Laufgeschwindigkeit modifizierter Reaktionsprodukte wurde bereits berichtet.<sup>[10]</sup>

Um die Effizienz des Nukleotideinbaus der modifizierten Nukleotide im Vergleich zu den entsprechenden natürlichen Nukleotiden zu untersuchen, führten wir Einzeleinbaustudien durch. Dabei konkurrierten die modifizierten Nukleotide (dT<sup>6</sup>TP, dT<sup>20</sup>TP) direkt mit den entsprechenden natürlichen Nukleotiden um den Einbau (Abbildung S2). Der Anteil des unmodifizierten und modifizierten Nukleotideinbaus wurde mittels PAGE-Analyse ermittelt, da aufgrund der sterisch anspruchsvollen Modifikation unterschiedliche Retentionszeiten vorlagen. Dieser Versuchsaufbau wurde bereits für den gleichen Zweck<sup>[8a]</sup> und für DNA-Selektivitätsstudien<sup>[11]</sup> verwendet. Die *Therminator*-DNA-Polymerase baut die neu entwickelten Nukleotide ungefähr 6- und 16fach schlechter ein, verglichen mit den natürlichen Nukleotiden; die *KlenTaq*-DNA-Polymerase dagegen mit 33- und 66fach schlechterer Effizienz. Die erhaltenen Effizienzen sind im ähnlichen Bereich, wie sie für die kürzlich untersuchten C5-modifizierten dTTP-Analoga gefunden wurden.<sup>[8a]</sup>

Zusätzlich untersuchten wir den Mehrfacheinbau modifizierter Nukleotide (Abbildung S3). Verwendet man in Primerverlängerungsreaktionen dT<sup>20</sup>TP und ein Templat, das für den Einbau von 46 TMPs codiert, so wird ein hochverzweigtes Reaktionsprodukt mit mindestens 7 hintereinander folgenden modifizierten Nukleotiden erhalten. Ermutigt durch diese Ergebnisse synthetisierten wir auch dATP-, dCTP- und dGTP-Analoga (weitere Informationen befinden sich in den Hintergrundinformationen) und untersuchten sie ebenfalls in Primerverlängerungsreaktionen (Abbildung S4). Alle Analoga wurden von der *Therminator*-DNA-Polymerase akzeptiert und ergaben Vollängenprodukt.

Des Weiteren untersuchten wir, ob der eingebaute Barcode-DNA-Strang von DNA-Polymerasen als Primer in Primerverlängerungsreaktionen genutzt werden kann. Deshalb führten wir zunächst eine Kontrollreaktion mit natürlichen dNTPs und eine Reaktion mit dT<sup>23</sup>TP anstelle von dTTP durch. Wir benutzten hierfür einen 24-nt-Primer und ein 42-nt-Templat, das für den Einbau eines dTMP-Analogs codiert. Diese Reaktionsprodukte wurden mit einem weiteren Templat (69-nt), das komplementär zum eingebauten Barcode-DNA-Strang ist, hybridisiert und mit einer DNA-Polymerase und dNTPs für 1 h bei 60°C inkubiert, um die Barcode-Primerverlängerungsreaktion durchzuführen (Abbildung 2B). Wir beobachteten das vollständige Verschwinden der ursprünglichen Bande (Abbildung 2B, Spuren 2 und 4) und das Erscheinen einer neuen Bande, deren Retention deutlich verzögert war. Dadurch zeigte sich, dass der eingebaute Barcode-DNA-Strang als Primer verwendet und zur Volllänge verlängert wurde (Abbildung 2B, Spur 4). Wie zu erwarten war, konnte keine Mobilitätsänderung der Kontrollreaktion mit natürlichen dNTPs beobachtet werden. Zusätzlich haben wir die Verlängerung des eingebauten

DNA-Strangs mittels Rolling Circle Amplifikation<sup>[12]</sup> (RCA) in Lösung untersucht und fanden hier ebenfalls, dass eine Verlängerung stattgefunden hat (Abbildung S5).

Als nächstes untersuchten wir, ob diese ODN-modifizierten Nukleotide als diagnostisches Mittel bei enzymatischen Reaktionen an der festen Phase eingesetzt werden können. Dafür untersuchten wir die Möglichkeit Einzelnukleotidvariationen im Sequenzkontext des B-Typ-Raf-Kinasengens (BRAF) zu detektieren. Die BRAF-somatische T1796A-Mutation konnte vermehrt bei Patienten mit malignen Melanomen und in anderen Krebszellen gefunden werden.<sup>[13]</sup> Genomische Verschiedenheiten, wie beispielsweise Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP), sind häufig die Ursache für Prädispositionen für Krankheiten<sup>[13,14]</sup> und individuumabhängige Arzneimittelwirksamkeit<sup>[15]</sup>.

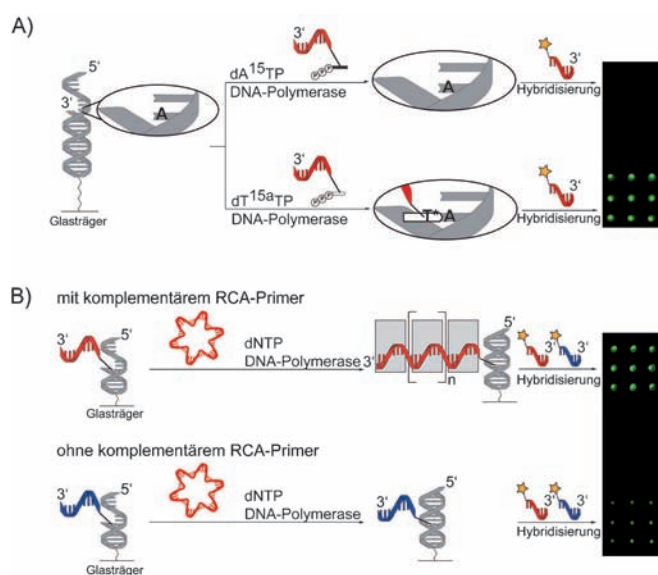
Für das SNP-Detektionssystem wurden die Primerstränge auf mit aminopropyliertem PDICT (1,4-Phenylendiisothiocyanat) aktiviertem Glaträger immobilisiert.<sup>[16]</sup> Im ersten Schritt wurde der Einbau der ODN-modifizierten Nukleotide mit einem Templat, das für einen Einbau eines dTMP codiert, durchgeführt (Abbildung 3A). In zwei Reaktionsblöcken wurden jeweils 9 Primerspots mit DNA-Polymerase, Templat und mit dA<sup>15</sup>TP bzw. dT<sup>15a</sup>TP inkubiert. Anschließend wurden die Glaträger gewaschen und mit Cy3-markierten Oligonukleotidsträngen, die an den Barcode-Strang eines eingebauten dT<sup>15a</sup>MP binden, inkubiert. Natürlich wurde ein starkes Fluoreszenzsignal nur dort detektiert, wo das kanonische dT<sup>15a</sup>MP eingebaut wurde. Um Signalverstärkung zu erhalten, inkubierten wir die Barcode-modifizierte DNA mit

einer DNA-Polymerase in Gegenwart eines zirkulären Templats, das an den Barcode-DNA-Strang bindet (Abbildung 3B). Das zirkuläre Templat ermöglicht die Verlängerung des komplementären Primers um zahlreiche Kopien der Sequenz, die im zirkulären Templat codiert ist. Dieser Prozess wird Rolling Circle Amplifikation genannt. Anschließend wurde zur Signalgenerierung mit Cy3-markierten Oligonukleotidsträngen inkubiert. Wie erwartet, konnte nur an Positionen mit dem zum zirkulären Templat komplementären Barcode-Strang eine signifikante Signalverstärkung detektiert werden.

Wir haben Barcode-markierte Nukleotide als Substrate für DNA-Polymerasen entwickelt und konnten zeigen, dass kommerziell erhältliche DNA-Polymerasen in der Lage sind, modifizierte Nukleotide mit einem 40fachen Größenanspruch im Vergleich zum natürlichen Substrat prozessieren zu können. Der sequenzspezifische Einbau der Barcode-modifizierten Nukleotide und die Adressierbarkeit der DNA durch einfache Hybridisierung der komplementären DNA-Stränge birgt großes Potential und wird Anwendung in vielen Applikationen finden. Da diese Methode äußerst flexibel ist, können verschiedene Techniken zur weiteren DNA-Manipulation und weitere Detektionsmethoden wie z.B. Biotin-Streptavidin-Chemie,<sup>[16a]</sup> Nanopartikel<sup>[17]</sup> oder verzweigte DNA-Signalverstärker (z.B. TSA-Detektionskit, bDNA-Verstärker)<sup>[18]</sup> verwendet werden. Das System hat das Potential, zu einem Vierfarben-Detektionssystem ausgebaut zu werden. Dazu werden Nukleotidanaloge mit individuellen Sequenzen und die dazu passenden farbstoffmarkierten komplementären DNA-Stränge verwendet. Die herausragende Kombination der Microarray-Technik mit dem sequenzspezifischen enzymatischen Einbau der Barcode-modifizierten Nukleotide eröffnet ungeahnte Möglichkeiten für zukünftige Anwendungen.

Eingegangen am 12. August 2011,  
veränderte Fassung am 15. September 2011  
Online veröffentlicht am 14. November 2011

**Stichwörter:** DNA-Polymerase · Enzymatische Synthese · Microarray · Nukleotide · Oligonukleotide



**Abbildung 3.** Microarray-basiertes Detektionssystem für Einzelnukleotidvariationen. A) Reaktionsablauf auf dem DNA-Microarray. Rechte Seite: Auswertung bei 532 nm nach der Hybridisierung mit Cy3-markierten Oligonukleotiden. Alle Reaktionen wurden unter den gleichen Bedingungen und auf dem gleichen Glaträger durchgeführt. B) Signalverstärkung durch Rolling Circle Amplifikation. Oben: mit komplementärem zirkulärem DNA-Templat. Unten: mit nicht-komplementärem zirkulärem DNA-Templat. Rechte Seite: Auswertung bei 532 nm nach der Hybridisierung mit einem Cy3-markierten Oligonukleotidstrang. Alle Reaktionen wurden unter den gleichen Bedingungen und auf dem gleichen Glaträger durchgeführt.

- [1] a) C. Bancroft, T. Bowler, B. Bloom, C. T. Clelland, *Science* **2001**, 293, 1763; b) E. T. Kool, J. C. Morales, K. M. Guckian, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 1046; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 990.
- [2] a) J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737; b) Y. Li, S. Korolev, G. Waksman, *EMBO J.* **1998**, 17, 7514.
- [3] a) R. N. Veedu, B. Vester, J. Wengel, *ChemBioChem* **2007**, 8, 490; b) D. Summerer, A. Marx, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 3806; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3693; c) F. Seela, M. Zulauf, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 1781; d) P. Kielkowski, H. Macickova-Cahova, R. Pohl, M. Hocek, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 8886; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 8727.
- [4] a) Z. R. Zhu, J. Chao, H. Yu, A. S. Waggoner, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 3418; b) T. Ohbayashi, M. Kuwahara, M. Hasegawa, T. Kasamatsu, T. Tamura, H. Sawai, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 2463; c) A. R. Kore, *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 793; d) S. Obeid, M. Yulikov, G. Jeschke, A. Marx, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 6886; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 6782; e) T. S. Seo, X. Bai, D. H. Kim, Q. Meng, S. Shi, H. Ruparel, Z. Li, N. J. Turro, J. Ju, *Proc.*



- Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 5926; f) U. Asseline, *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 491.
- [5] a) D. R. Bentley et al., *Nature* **2008**, *456*, 53; b) T. D. Harris et al., *Science* **2008**, *320*, 106; c) R. Drmanac et al., *Science* **2010**, *327*, 78; d) P. R. Langer, A. A. Waldrop, D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 6633; e) S. P. Liu, S. H. Weisbrod, Z. Tang, A. Marx, E. Scheer, A. Erbe, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3385; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3313.
- [6] a) S. H. Um, J. B. Lee, S. Y. Kwon, Y. Li, D. Luo, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 995; b) N. J. Woodland, B. Silver, US 2612994, **1952**; c) J. Waugh, *Bioessays* **2007**, *29*, 188; d) J. M. Nam, S. I. Stoeva, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5932; e) J. M. Nam, C. S. Thaxton, C. A. Mirkin, *Science* **2003**, *301*, 1884.
- [7] S. H. Weisbrod, A. Marx, *Chem. Commun.* **2008**, 5675.
- [8] a) S. Obeid, A. Baccaro, W. Welte, K. Diederichs, A. Marx, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 21327; b) O. Thum, S. Jäger, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4112; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3990; c) G. F. Kaufmann, et al., *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2182; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2144; d) M. Hocek, M. Fojta, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2233; e) S. Ikonen, H. Macickova-Cahova, R. Pohl, M. Sanda, M. Hocek, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1194; f) H. Weizman, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1568; g) G. Giller, T. Tasara, B. Angerer, K. Muhlegger, M. Amacker, H. Winter, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2630; h) J. P. Anderson, B. Angerer, L. A. Loeb, *Biotechniques* **2005**, *38*, 257; i) P. M. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8478; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350; j) S. Kumar, A. Sood, S. Rao, J. Nelson, US 7109316, **2006**; k) S. Jäger, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3399; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3337; l) P. Brázdilová, M. Vrabel, R. Pohl, H. Pivonkova, L. Havran, M. Hocek, M. Fojta, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9527; m) F. Seela, Y. M. Chen, *Chem. Commun.* **1996**, 2263; n) G. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid, H. Nir, S. Tal, Y. Eichen, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1398; o) P. M. Gramlich, C. T. Wirges, J. Gierlich, T. Carell, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 249; p) J. Gierlich, K. Gutsmedl, P. M. Gramlich, A. Schmidt, G. A. Burley, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9486.
- [9] a) J. M. Clark, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 9677; b) J. M. Clark, C. M. Joyce, G. P. Beardsley, *J. Mol. Biol.* **1987**, *198*, 123; c) K. A. Fiala, J. A. Brown, H. Ling, A. K. Kshetry, J. Zhang, J. S. Taylor, W. Yang, Z. Suo, *J. Mol. Biol.* **2007**, *365*, 590; d) H. Hwang, J. S. Taylor, *Biochemistry* **2004**, *43*, 14612; e) J. A. Peliska, S. J. Benkovic, *Science* **1992**, *258*, 1112; f) S. Obeid, N. Blatter, R. Kranaster, A. Schnur, K. Diederichs, W. Welte, A. Marx, *EMBO J.* **2010**, *29*, 1738.
- [10] S. Jäger, G. Rasched, H. Kornreich-Leshem, M. Engeser, O. Thum, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15071.
- [11] J. G. Bertram, K. Oertell, J. Petruska, M. F. Goodman, *Biochemistry* **2010**, *49*, 20.
- [12] a) Z. Cheglakov, Y. Weizmann, A. B. Braunschweig, O. I. Wilner, I. Willner, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 132; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 126; b) E. T. Kool, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, *25*, 1; c) Z. Deng, Y. Tian, S. H. Lee, A. E. Ribbe, C. Mao, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3648; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3582; d) J. S. Hartig, S. Fernandez-Lopez, E. T. Kool, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1458; e) C. Lin, M. Xie, J. J. Chen, Y. Liu, H. Yan, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7699; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7537; f) C. Lin, X. Wang, Y. Liu, N. C. Seeman, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14475.
- [13] H. Davies et al., *Nature* **2002**, *417*, 949.
- [14] a) S. A. DelRio-LaFreniere, R. C. McGlennen, *Mol. Diagn.* **2001**, *6*, 201; b) H. Engel, L. Zwing, H. H. van Vliet, J. J. Michiels, J. Stibbe, J. Lindemans, *Thromb. Haemostasis* **1996**, *75*, 267.
- [15] X. Wei, H. L. McLeod, J. McMurrough, F. J. Gonzalez, P. Fernandez-Salguero, *J. Clin. Invest.* **1996**, *98*, 610.
- [16] a) R. Kranaster, A. Marx, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4696; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4625; b) R. Kranaster, P. Ketzer, A. Marx, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 694; c) J. Gaster, G. Rangam, A. Marx, *Chem. Commun.* **2007**, 1692.
- [17] J. J. Storhoff, A. D. Lucas, V. Garimella, Y. P. Bao, U. R. Muller, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 883.
- [18] a) D. Kern et al., *J. Clin. Microbiol.* **1996**, *34*, 3196; b) M. L. Collins et al., *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2979.