

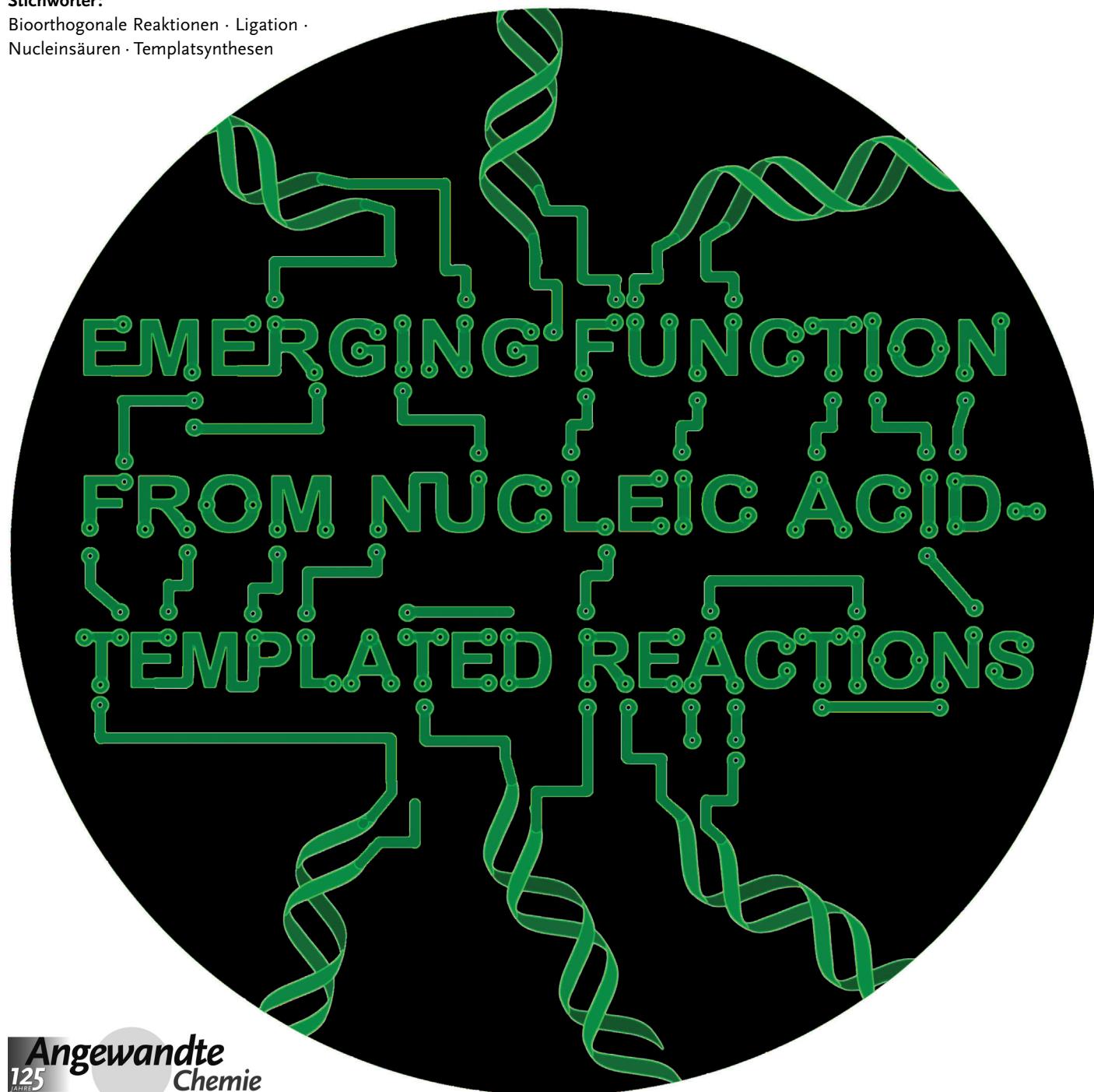
Reaktionen an Nucleinsäuretemplaten: mehr Methoden zur Übersetzung Oligonucleotid-basierter Informationen in neue Funktionen

Katarzyna Gorska und Nicolas Winssinger*

Stichwörter:

Bioorthogonale Reaktionen · Ligation ·

Nucleinsäuren · Templantsynthesen



Die Programmierbarkeit der Oligonucleotid-Erkennung bietet eine vielversprechende Plattform, um die Anordnung von Reaktanten zu steuern. Sowohl bei der Bandbreite chemischer Umwandlungen als auch beim funktionalen Ergebnis der Reaktion wurden kürzlich erhebliche Fortschritte erzielt. Hier fassen wir diese jüngsten Fortschritte zusammen und erläutern ihre Anwendungen, z. B. die Übersetzung von Oligonucleotid-Informationen in Funktionsmaterialien und neuartige Architekturen (leitende Polymere, Nanomuster, neuartige Oligonucleotid-Kreuzungen) oder – mithilfe zellulärer RNA – in fluoreszierende oder bioaktive Moleküle; zur Untersuchung von Sekundärstrukturen oder Oligonucleinsäuren; sowie in ein synthetisches Oligomer.

1. Einleitung

Templat-gestützte chemische Reaktionen haben eine lange Geschichte, die bis in die präbiotische Chemie zurückreicht. Das Interesse am Ursprung des Lebens^[1] veranlasste Pioniere, wie Gilham^[2] und Orgel,^[3] zu zeigen, dass ein Oligonucleotid als Templat für die Ligation komplementärer Stränge mit aktivierten Phosphodiesteren wirken könnte. Zu weiteren grundlegenden Erfolgen bei Nucleinsäure-gestützten Reaktionen gehören der Nachweis, dass eine RNA-gestützte Amidligation zwischen zwei Peptidnucleinsäure-(PNA)-Strängen erreicht werden kann,^[4] die Ligation eines 3'-Phosphorothioats mit 5'-Tosylat,^[5] die Templat-gestützte Bildung eines dynamischen Iminsurrogats der nativen Phosphodiesterbindung mit nachfolgendem irreversiblem Abfangen durch Reduktion^[6,7] sowie der Nachweis, dass eine Peptidacylkette eines Thioesters an 5'-Position eines Strangs auf eine Aminogruppe an 3'-Position eines benachbarten Strangs übertragen werden kann.^[8] Alle diese Beispiele nutzen das hohe Maß an Präorganisation, das sich bei Reaktionen ergibt, die bei der Templatreaktion die Geometrie der nativen Bindung beim Anknüpfen an den benachbarten Strang nachahmen. Das 21. Jahrhundert markierte die Entwicklung neuer Reaktionen an Nucleinsäuretemplaten, die nicht mit der Rückgratimitierung verwandt sind, und deren Fokus auf der Verwendung des Templat liegt, um verschiedene Funktionen – von der Synthese kleiner Moleküle bis hin zur Nucleinsäureerkennung und zu Nucleinsäure-basierten Anordnungen – zu implementieren.

Die spezifische Bindung der Basenpaare bildet die Grundlage genetischer Information. Dieses hoch programmierbare, supramolekulare System, ob auf Basis von DNA, RNA oder ihren synthetischen Analoga, bietet eine geeignete Plattform, um Anordnungen zu entwerfen, die dazu in der Lage sind, die zugrunde liegenden, in Sequenzen verschlüsselten Informationen in Strukturen, Moleküle und funktionale Ergebnisse (beispielsweise Fluoreszenz, Bioaktivität, Bewegung und logische Operationen) zu übersetzen. Auf struktureller Ebene erwies sich die DNA als enorm vielseitige Grundlage für den Bottom-up-Aufbau von Strukturen im Nanometerbereich. So wurde die programmierbare und spezifische Bindung zwischen DNA-Basenpaaren genutzt, um

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	6957
2. Interstrangvernetzung	6958
3. Templat-gestützte Strangligation	6959
4. Templat-gestützte Umwandlungen ohne Ligation	6966
5. Übersetzung von DNA in ein nichtnatürliches Polymer	6976
6. Zusammenfassung und Ausblick	6977
7. Addendum (21. Mai 2013)	6977
8. Abkürzungen	6978

die Selbstorganisation von zwei- und dreidimensionalen Objekten zu steuern.^[9–13] Die Fähigkeit, Reaktionen durch Templatfixierung zur Bildung neuartiger Strukturen zu führen, kann dabei besonders wichtig werden. Hinsichtlich der Synthese kleiner Moleküle haben Liu et al. im Zusammenhang mit DNA-gestützten Synthesen (DTS) eine große Bandbreite an Reaktionen beschrieben.^[14,15] Große Aufmerksamkeit galt Templatreaktionen zur RNA- und DNA-Erkennung^[16–18], angefangen von Ligationsreaktionen zwischen zwei Strängen mit wechselwirkenden Farbstoffen bis hin zu neueren Entwicklungen, die eine Transferreaktion nutzen, um ein profluoreszierendes Molekül in Gegenwart eines katalytischen Templat umzuwandeln.

Templatreaktionen werden unter Bedingungen durchgeführt, unter denen die spontane Reaktion nicht abläuft, bis die reaktiven Gruppen durch ein Templat angeordnet sind, wodurch die effektive Konzentration und damit die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht werden. Wie Abbildung 1 zeigt, können Nucleinsäure-gestützte Reaktionen allgemein in drei Kategorien unterteilt werden: Interstrangvernetzung, Strangligation und Transformation ohne Ligation. Diese Klassifizierung spiegelt wichtige Unterschiede im Reaktionsverhalten wider: Bei der Interstrangvernetzung wird der supramolekulare Komplex kovalent gebunden, was stöchiometrische Mengen beider Partner erforderlich macht. Bei der Strangligation werden die reaktiven Gruppen auf zwei komplementären Strängen an einem Templat ausgerichtet, worauf

[*] Dr. K. Gorska, Prof. N. Winssinger
 Institut de Science et Ingénierie Supramoléculaires
 (ISIS-UMR 7006), Université de Strasbourg-CNRS
 8 allée Gaspard Monge, 67000 Strasbourg (France)
 und
 Department of Organic Chemistry,
 University of Geneva (Schweiz)
 E-Mail: nicolas.winssinger@unige.ch

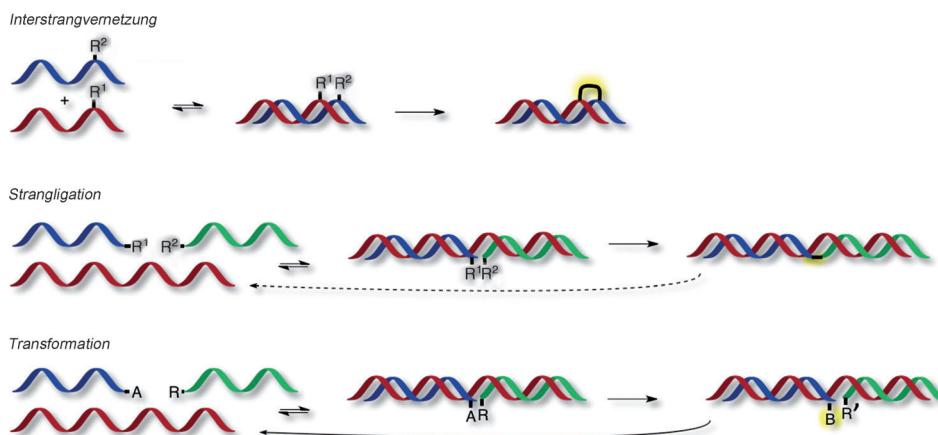


Abbildung 1. Allgemeines Konzept einer Templatreaktion. Hybridisierung an ein Templat erhöht lokal die effektive Molarität der Substrate und beschleunigt somit die Reaktion.

die Ligation der Fragmente folgt, auch wenn der resultierende Duplex noch dissoziieren kann. Das Produkt zeigt eine höhere Affinität zum Templat als jedes der Ausgangsmaterialien, aber dennoch kann durch Strangablösung oder Temperaturzyklen ein Turnover des Templat-Materials bei geringem Umsatz erreicht werden. Bei der Transformation ohne Ligation erfolgt schließlich eine Reaktion wegen der Nähe der reaktiven Gruppen innerhalb der supramolekularen Anordnung, obwohl keine Ligation stattfindet. Daher hat dieses Reaktionsdesign das größte Potenzial in Bezug auf den Turnover und die Amplifizierung der Nucleinsäureinformationen. Die Reaktionen werden im Allgemeinen mit Konzentrationen von 1–10 µm oder weniger durchgeführt. Bei diesen Konzentrationen sind bimolekulare Reaktionen normalerweise vernachlässigbar. Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt ab vom Grad der Präorganisation im System und der innerhalb der supramolekularen Anordnung erreichten effektiven Konzentration; je nach Reaktion und Versuchsbedingungen kann jedoch der Hybridisierungsschritt geschwindigkeitsbestimmend sein.^[19]

Das Ziel dieses Aufsatzes ist es, die neuesten Entwicklungen bei Nucleinsäure-gestützten Reaktionen zusammenzufassen, wobei der Schwerpunkt auf den chemischen Reaktionen und deren Anwendungen liegt. Die meisten In-vitro-

Methoden wurden mit synthetischer DNA unter Verwendung von DNA- oder PNA-Sonden^[20] entwickelt. Wegen der vergleichbaren Duplex-Stabilität zwischen DNA:DNA und DNA:RNA oder PNA:DNA und PNA:RNA verlaufen Templatreaktionen mit RNA-Vorlagen ähnlich gut. Etliche Reaktionen wurden nun mit zellulärer RNA als Templat durchgeführt.

2. Interstrangvernetzung

Bei der Interstrangvernetzung wird eine kovalente Bindung zwischen komplementären Strängen gebildet. Frühe Anwendungen nutzten solche Vernetzungsreaktionen, um RNA-Konformation und -Bindung zu untersuchen. Mit einem Phenylazid wurde eine Photovernetzung über ein kurzlebiges und unselektives Nitrenelektrophil erreicht, das mit benachbarten Nucleobasen reagierte.^[21,22] Neuere Arbeiten konzentrierten sich auf selektivere Reaktionen, um komplementäre Stränge chemoselektiv zu verknüpfen. Wie in Abbildung 2 gezeigt, kann dieses kovalente Einfangen entweder reversibel oder irreversibel ablaufen und durch zwei verschiedene externe Stimuli, Licht und Oxidation, ausgelöst werden. Fujimoto et al. verwendeten die Photovernetzung zwischen aneinandergelagerten DNA-Strängen ausgiebig zur Genotypisierung von Einzelnucleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs). Ihre erste Strategie zur Interstrangphotovernetzung führte über eine [2+2]-Cycloaddition zwischen einem *p*-Carbamoylvinylphenol-Nucleosid (angeregt durch Licht von 366 nm) und einem Adenosinrest auf dem komplementären Strang zur irreversiblen Verbindung beider Stränge (Abbildung 2.1).^[23] Mit einer Fängersonde, die das veränderte Nucleosid enthielt und auf der Oberfläche eines Objektträgers fixiert war, konnte der Analytstrang (mit Biotin markiert) auf der Oberfläche festgehalten werden. Unter Verwendung von Oligonucleotidse-



Nicolas Winssinger erhielt seinen BS von der Tufts University (USA), bevor er für seine Promotion zu K. C. Nicolaou an das Scripps Research Institute wechselte. Er blieb dort als Postdoktorand in der Gruppe von P. G. Schultz. 2002 begann er seine eigenständige Karriere am Institut de Science et Ingénierie Supramoléculaires der Université de Strasbourg (früher Université Louis Pasteur) und erhielt später einen Ruf an das Institut Universitaire de France (IUF). 2012 ging er an die Universität Genf, wo er gegenwärtig Professor für organische Chemie ist. Ein Schwerpunkt seiner Forschung ist die Verwendung von Oligonucleotiden zur Kodierung von Molekülen und zur Programmierung räumlicher Organisation und Reaktionen.



Katarzyna Gorska erhielt 2007 Abschlüsse in Chemie und Biotechnologie an der Universität Warschau (Polen). Sie wechselte anschließend in die Arbeitsgruppe von N. Winssinger an der Université de Strasbourg als Boehringer Ingelheim Fonds Fellow und promovierte 2011. Ihre Arbeit zur Visualisierung von RNA und der programmierten Freisetzung von Biomolekülen unter Verwendung der Templatchemie wurde mit dem Dissertationspreis der Université de Strasbourg sowie einem DSM Science & Technology Award ausgezeichnet. Derzeit ist sie Postdoktorandin bei K. Johnsson an der École Polytechnique Fédérale de Lausanne (Schweiz).

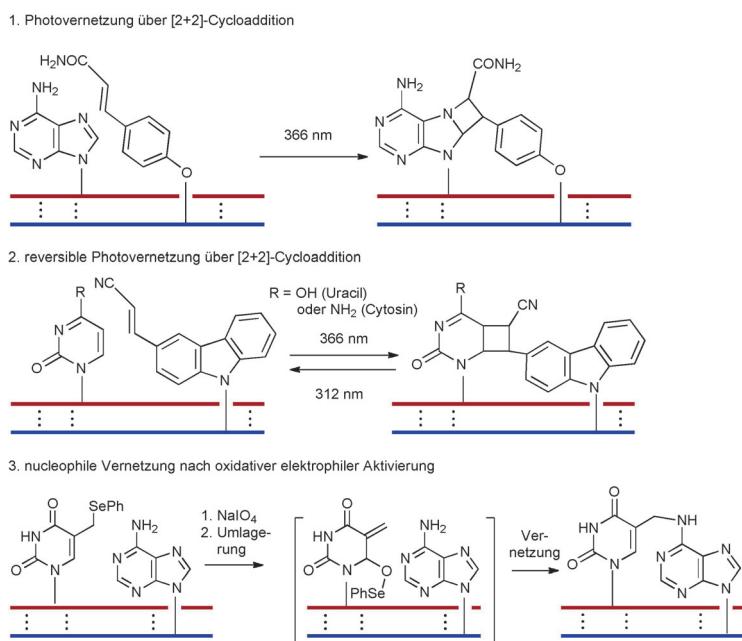


Abbildung 2. Templat-gestützte Interstrangvernetzung.

quenzen, die von H-Ras und dessen onkogenen Mutanten abstammen, zeigten die Autoren, dass die Kinetik der Reaktion stark von einem perfekt passenden Duplex aus immobilisiertem Strang und Analyt abhing. Die Reaktionen mit perfekt angepasstem Duplex erreichten bei 45-minütiger Bestrahlung einen Umsatz von 50%, wogegen die Einführung einer Punktmutation in den Duplex den Umsatz größtenteils oder gänzlich verhinderte. Aus diagnostischer und analytischer Sicht übertraf die mit der Vernetzung erreichte Spezifität diejenige einfacher Hybridisierungsverfahren. Dieselbe Arbeitsgruppe beschrieb ein alternatives System, mit dem eine komplementäre Ziel-RNA reversibel photovernetzt wurde (Abbildung 2.2).^[24,25] Ein 3-Cyanvinylcarbazol-Nucleotid-Surrogat (Abbildung 2.2) reagierte mit Pyrimidinen des komplementären Strangs unter Bestrahlung bei 366 nm, während die Retro-Cycloaddition bei Bestrahlung mit 312-nm-Licht ablief. Diese Methode ist geeignet, um aus einer komplexen Mischung hoch spezifisch eine Ziel-micro-RNA (miRNA) auf einer Polymerkugel zu fangen und später mithilfe einer Retro-Cycloaddition wieder freizusetzen.^[25] Peng und Greenberg entwickelten eine alternative Vernetzungsstrategie (Abbildung 2.3) unter Verwendung eines Phenylselenederivats von Thymidin. Nach milder oxidativer Umsetzung mit NaIO_4 lieferte das Phenylselenoxid über eine [2,3]-sigmatrope Umlagerung ein starkes Elektrophil, das mit einer Adenosin-Nucleobase des komplementären Strangs reagieren konnte.^[26] Die durch Vernetzung von 16 Nucleotidsäuren mit ihren Zielen erreichte Sequenzspezifität wurde an einem Modell, das auf dem Exon 7 des p53-Gens basiert, getestet; in Krebszellen wird häufig ein G → A-Wechsel im Codon 248 dieses Exons beobachtet. Reaktionen mit perfekten Match- und Mismatch-Templaten (mit Mutationen, die zwei Basen von der erwarteten Vernetzungsstelle entfernt sind) wurden mithilfe von Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) analysiert. Bei optimaler Reaktionstem-

peratur (45 °C) wurde für einen perfekten Match-Fall eine 24–214-fach höhere Selektivität als beim Mismatch-Fall bei >20% Gesamtumsatz erzielt. Eine Reaktionsführung bei niedrigerer Temperatur ergab einen höheren Umsatz, beeinträchtigte jedoch die Selektivität. Die für die Mismatch-Erkennung validierten Bedingungen wurden anschließend zur Detektion von SNPs in Plasmid-DNA eingesetzt. Mit Biotin-markierter DNA konnte das chemisch vernetzte Produkt auf einer Mikroplatte mithilfe enzymatischer Amplifizierung mit einem Empfindlichkeitsgrenzwert von 250 fmol nachgewiesen werden. Das gleiche Verfahren war geeignet, um zwei Stränge innerhalb einer Triplex-DNA zu vernetzen.^[27] Diese [2,3]-Selenoxidumlagerung wurde später bei der katalytischen Photoaktivierung an Templaten zur Bildung von Singuletsauerstoff (${}^1\text{O}_2$) als Oxidationsmittel eingesetzt (siehe Abbildung 11.12 in Abschnitt 4.4).

3. Templat-gestützte Strangligation

Die Templat-gestützte Strangligation war die erste Reaktion mit Nucleinsäuren als Templat, die wegen ihrer Bedeutung für den Ursprung des Lebens Aufmerksamkeit erhielt; diese Reaktion stand im Mittelpunkt der grundlegenden Publikationen, die in der Einleitung besprochen wurden. Einige Reaktionen mit unterschiedlichen Graden an Orthogonalität, Biokompatibilität und Effizienz erweisen sich heute als zweckdienlich.

3.1. Photoligationen

Die Verwendung der Photoligation steht für eine natürliche Wahl in der Ligationschemie, da ultraviolettes (UV-)Licht die [2+2]-Cycloaddition zwischen Pyrimidinen fördert kann. Allerdings schädigen die kurze Wellenlänge (> 260 nm) und die benötigte hohe Intensität die Nucleinsäuren und verringern die Brauchbarkeit dieser Reaktion für Templat-gestützte Prozesse. Taylor und Liu ersetzten ein Thymidin am Ende eines DNA-Fragments durch ein Thiothymidin und verwendeten 366-nm-Licht, um eine Photoreaktion von Thiothymidin mit einem T auf dem benachbarten Fragment zu begünstigen.^[28] Fujimoto et al. bereiteten den Weg für die Verwendung von 5-Vinyldeoxyuridin zur photoreversiblen Ligation mit einem benachbarten Pyrimidin-terminierten Strang, die über eine [2+2]-Photoaddition erfolgt.^[29] Die Verwendung von 5-Carboxyvinyldeoxyuridin (Abbildung 3.1) verbesserte das Reaktionsverhalten (senkte die Reaktionsdauer von 6 h im Fall von 5-Vinyldeoxyuridin auf 15 min) und zeigte eine bemerkenswerte Selektivität für ein Einzelnucleotid-Mismatch im Templat (10³-fach erhöht). Dieses System erwies sich für Ziel-DNA^[30,31] wie auch -RNA^[32] als geeignet, und das Reaktionsverhalten blieb auch bei Verwendung von genomischer DNA anstelle eines synthetischen Templat erhalten.^[33] Diese Templatreaktion wurde auch im Microarray-Format durchgeführt; dabei

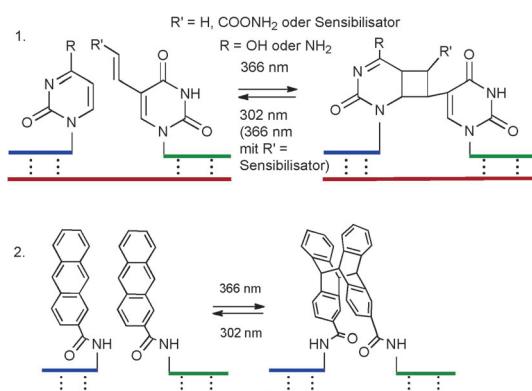
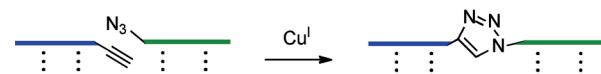


Abbildung 3. Templat-gestützte Photoligation.

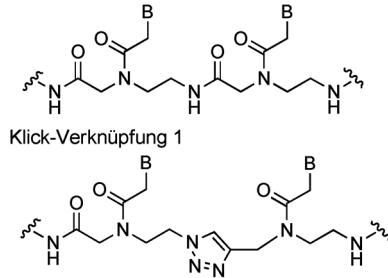
steuerte eine Analyt-Nucleinsäure als Templat die Reaktion zwischen dem Oberflächen-fixierten Strang und den verschiedenen Carboxyvinylsträngen, die mit spektral aufgelösten Fluorophoren (den Cyaninfarbstoffen Cy3 und Cy5) markiert waren.^[34] Kürzlich wurde die Reaktion verwendet, um mehrere Fragmente mit Überhängen entlang eines Templat zu verbinden und so eine Kammarchitektur zu generieren.^[35] Eine weitere Verbesserung wurde durch einen kovalent an Vinyldesoxyuridin gebundenen Sensibilisator erreicht, der die Spaltung der Oligonucleotide verhinderte und das System bei Bestrahlung mit 366-nm-Licht reversibel machte.^[36] Jyo et al. schlugen eine alternative Methode für die Photoligation von Oligodesoxynucleotiden an einem Templat durch Photodimerisierung angehängter Anthracenmarker vor (Abbildung 3.2). Bei der Durchführung mit einem perfekt passenden DNA-Strang als Templat und der optimalen Anthracengeometrie erreichte diese Reaktion innerhalb von Minuten einen hohen Umsatz.^[37] Dieses System erwies sich auch als nützlich für die SNP-Erkennung. Zudem ist die Reaktion kompatibel mit Temperaturzyklen, und nach zehn Durchläufen konnte eine annähernd fünffache Signalverstärkung erzielt werden. Eine gründliche Untersuchung der Templat-gestützten Photoligation zeigte, dass die Ausbeute der Ligation stark von der Mismatch-Position beeinflusst wurde, was vermuten lässt, dass die lokale Struktur sehr wichtig für das Reaktionsverhalten ist.^[38]

3.2. Azid-Alkin-Cycloaddition („Klick-Reaktion“)

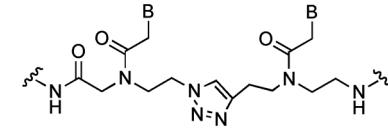
Der Erfolg der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) in vielen Bereichen^[39–42] hat einige Arbeitsgruppen dazu veranlasst, diese Reaktion im Kontext von Templatereaktionen zu untersuchen. Da das bei einer CuAAC entstehende Triazol ein Isoster der nativen Amidbindung in PNAs ist, wurde untersucht, inwieweit mit dieser Reaktion zwei PNA-Fragmente verbunden werden können, um eine Surrogat-PNA-Verknüpfung herzustellen (Abbildung 4.1).^[43] Es wurde gefunden, dass die Klick-Verknüpfung 1 ein Oligomer mit vergleichbarer Affinität und Spezifität zu einer unmodifizierten PNA ergab, während der Klick-Linker 2 ein Oligomer mit verminderter Affinität lieferte. Die Reaktion lief in DNA-gestützter Weise mit guter Sequenzspezifität ab.



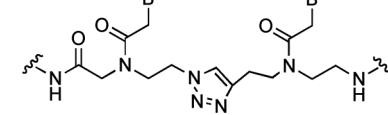
1. Standard-PNA-Verknüpfung



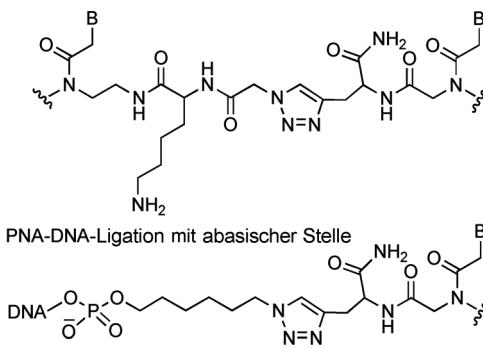
Klick-Verknüpfung 1



Klick-Verknüpfung 2



2. PNA-PNA-Ligation mit abasischer Stelle



3. Cu-freie Ligation mit gespanntem Alkin

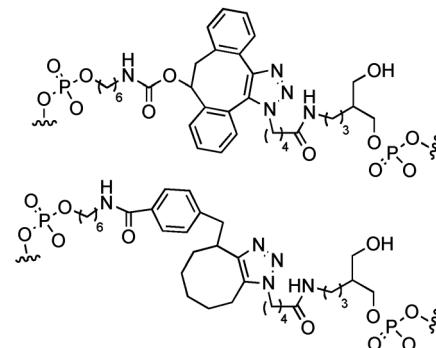


Abbildung 4. Templat-gestützte Alkin-Azid-Cycloaddition. 1–3 zeigen Reaktionsprodukte aus verschiedenen Templat-gestützten Alkin-Azid-Reaktionen.

Dieselbe Reaktion wurde genutzt, um PNA- und DNA-Fragmente über einen längeren Linker, der eine abasische Stelle auf dem komplementären Strang überbrückte, zu verbinden (Abbildung 4.2).^[44] Durch Einbau eines Alkins an einem Ende und eines Azids am anderen kann diese Strategie zu verlängerten PNA-Oligomeren ohne cyclische Nebenprodukte führen. Eine Beschränkung der CuAAC besteht darin,

dass der Katalysator (Kupfer) reaktive Sauerstoffspezies generiert, die Nucleinsäureoxidationen zur Folge haben. Zudem können die verbleibenden Kupferspuren für nachfolgende Anwendungen, wie die Produktion von Nanobauteilen oder biologische Anwendungen, problematisch sein. Daher wurde eine metallfreie Version der Reaktion, die durch die Spannung eines Cycloalkinsubstrats^[45] gefördert wird, an Templatbedingungen^[46] angepasst und bietet eine interessante Alternative (Abbildung 4.3), auch wenn die gebildete Verknüpfung signifikant sperriger ist, was die resultierende Nucleinsäurestruktur beeinflussen kann.

Wegen ihrer Robustheit wird die CuAAC-Ligation zur Nucleinsäure-Erkennung sowie zum kovalenten Auffangen von Nucleinsäure-basierten Aggregaten verwendet.^[47] Jentsch und Mokhir beschrieben einen Naphthalinimid-Alkin-Profluorophor, der nach Umsetzung zum Triazol aktiviert

wird (Abbildung 5.1). Unter Verwendung von DNA-Fragmenten, die mit dem Alkin-Profluorophor und einem Azid an den 3'- bzw. 5'-Enden derivatisiert waren, lief die Reaktion sequenzspezifisch in Templat-gestützter Weise bei geringen Templatkonzentrationen von 20 nm ab.^[48] Ein Überschuss an Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin-Ligand half, den Kupfer-induzierten Abbau der Reaktanten zu verhindern, störte jedoch die Fluoreszenzdetektion. Verlässliche Ergebnisse wurden nach thermischer Denaturierung oder Entfernung des Kupfers mit Natriumsulfid erhalten.

Der Aufbau komplexer Nanostrukturen würde von Strukturelementen profitieren, die an der Verbindungsstelle Topologien ermöglichen, die über die einfache Ligation zweier linearer Elemente hinausgehen. Eine Drei-Wege-Kreuzung ist das einfachste Beispiel eines Verzweigungselementes. Gothelf et al. zeigten, dass ein solcher Verzweigungspunkt zwischen einem DNA-Fragment mit zwei Alkintermini und zwei anderen DNA-Fragmenten, die Azide enthalten, erhalten werden kann (Abbildung 5.2). Die benötigte ternäre Anordnung wurde durch einen starken Triplex-DNA-Binder (Naphthylcholin) induziert und förderte die doppelte CuAAC.^[49]

Ohne Triplex-DNA-Binder erfolgte die Ligation streng zwischen den komplementären Strängen. Die Bildung von Catenanstrukturen mit mehrfach verflochtenen Strängen wurde ebenfalls mit einer Templat-gestützten Alkin-Azid-Cycloaddition erreicht. Der Aufbau einer sechsfach verflochtenen Doppelstrangstruktur (Pseudohexagon) mit 4 nm Länge wurde unter Verwendung der zirkulären Oligonukleotid-gestützten Ligation mehrerer difunktionaler Sonden demonstriert (Abbildung 5.2).^[50]

Die DNA-gestützte Anordnung mit anschließender kovalenter Ligation komplexerer funktionaler Elemente wurde ebenfalls beschrieben. Gothelfs Gruppe nutzte DNA-gestützte Klick-Chemie zur Herstellung organisierter Strukturen von PAMAM-Dendrimeren (Abbildung 5.3).^[51] DNA-markierte und mit Aziden und Alkinen funktionalisierte Dendrimere wurden auf verschiedenen DNA-Templaten, einschließlich DNA-Origami, angeordnet und anschließend über CuAAC vernetzt. Die DNA-kontrollierte Selbstorganisation alternierender Azid- und Alkindendrimere erwies sich als schnell und zuverlässig und sollte zur Produktion von Mustern im Nanobereich nützlich sein.

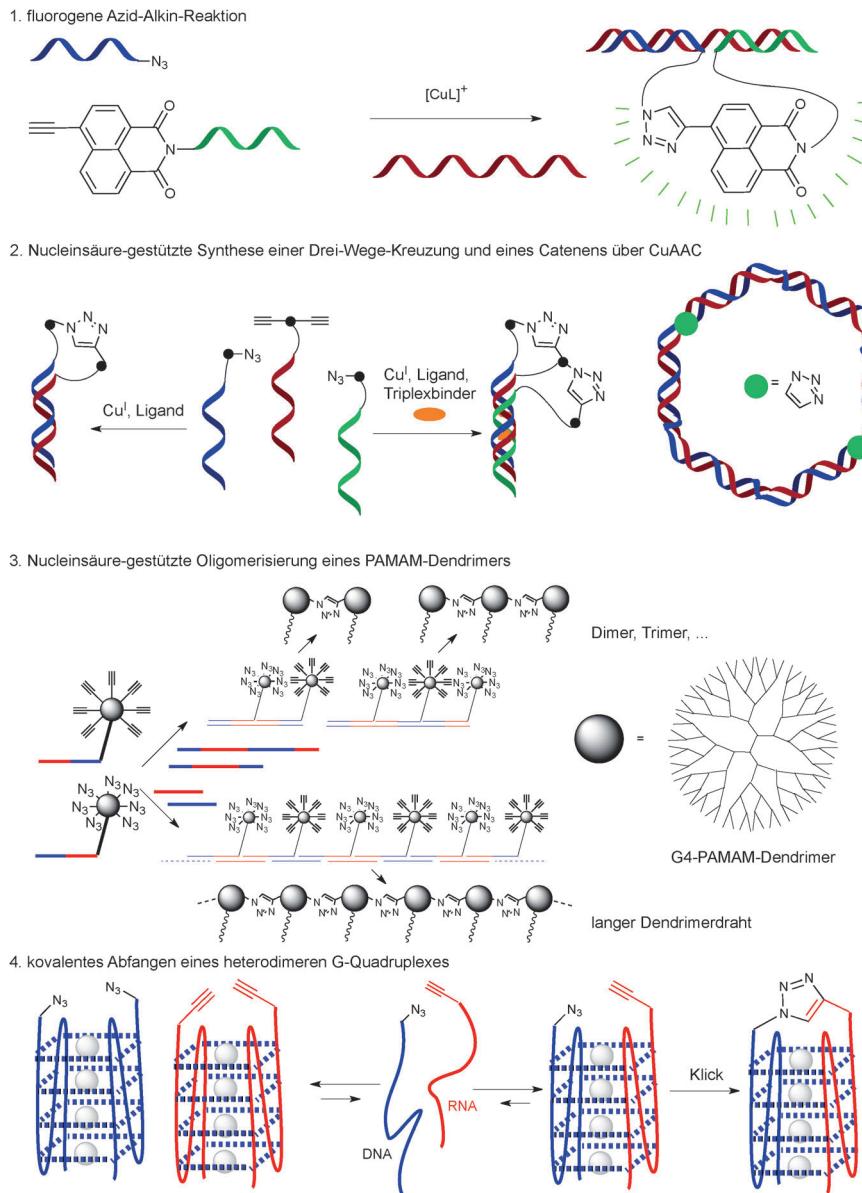


Abbildung 5. Anwendung einer Templat-gestützten CuAAC. PAMAM = Poly(amidoamin)-Dendrimer (4. Generation).

Templat-gestützte CuAAC-Reaktionen wurden von Komiyama et al. verwendet, um G-Quadruplexstrukturen zu untersuchen und Informationen über die verschiedenen verfügbaren Topologien zu erhalten. Dazu wurden Sequenzen, die entweder ein Alkin oder ein Azid enthalten, unter verschiedenen Bedingungen angeordnet und mithilfe von Kupferkatalysatoren umgesetzt, um ihre räumliche Nähe zu sondieren und Informationen über ihre Anordnung zu erlangen (Abbildung 5.4). Dieser Ansatz führte zur Entdeckung, dass die DNA-RNA-Hybrid-Quadruplexstrukturen, die für humane telomere DNA- und RNA-Sequenzen vermutet wurden, tatsächlich möglich sind.^[52]

3.3. Nucleophile Substitutionen, Kondensationen und Cycloadditionen

Templat-gestützte nucleophile Substitutionen und Kondensationen waren wegen ihrer möglichen Bedeutung für die präbiotische Chemie unter den ersten erforschten Templatreaktionen; sie würden für die enzymfreie Vervielfältigung des genetischen Materials benötigt. Die in der Einleitung erwähnten Pionierarbeiten regten die erste Anwendung der Templat-gestützten Ligation zur Nucleinsäure-Erkennung an. Kool et al. verwendeten eine Phosphorothioat-Iodid-Kombination (Abbildung 6.1), um zwei Stränge zu verbinden, die mit Fluorophoren derivatisiert waren, die einen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) nach Ligation der DNA-Fragmente ermöglichen.^[53] Kool et al. berichteten später, dass die Reaktion durch Verwendung von nucleophilerem Phosphorodithioat und Phosphorotriothioat gegenüber der ursprünglichen Reaktion mit Phosphoromonothioat-Nucleophilen beschleunigt werden kann, wodurch sich die Detektionszeit für ribosomale RNA in Bakterien verringert (20 min gegenüber 1–2 h).^[54]

Czapinski und Sheppard demonstrierten eine effiziente Metallosalensynthese an Nucleinsäuretemplaten, indem sie DNA-Fragmente, die mit 2-Salicylaldehyden funktionalisiert waren, in Gegenwart von Ethylendiamin und Ni^{2+} oder Mn^{2+} umsetzten (Abbildung 6.2).^[55] Diese bahnbrechende Reaktion wurde im Anschluss verwendet, um konjugierte Strukturen zu synthetisieren (siehe Abbildung 7 in Abschnitt 3.4).^[56]

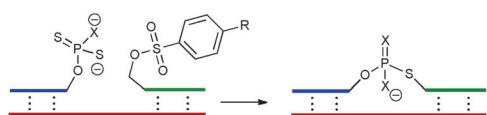
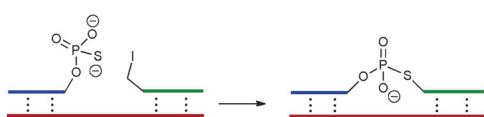
Seitz et al. entwickelten eine leistungsfähige Methode, um PNA-Fragmente mithilfe nativer chemischer Ligation^[58] (NCL) Templat-gestützt zu verbinden (Abbildung 6.3).^[57] Vermutlich erfolgen dabei eine rasche und reversible Thiomusterung und eine anschließende, irreversible S- zu N-Acylverschiebung zwischen den beiden PNA-Fragmenten, von denen eines einen Cysteinrest am N-Terminus und das andere einen Glycinthioester am C-Terminus trägt. Die neu gebildete Peptidbindung weist eine Bindungsgeometrie auf, die zu einer abasischen Stelle auf der Matrize passt. Die Reaktion verlief schnell (55 % Umsatz in 22 min) sowie mit Einzelnucleotid-Auflösung und konnte direkt mit doppelsträngiger DNA (dsDNA) in Gegenwart zusätzlicher PNA-Fragmente, die die Wiederanlagerung der dsDNA-Matrize blockierten, durchgeführt werden. Die Reaktionsspezifität wurde beeinträchtigt, wenn die PNA-Fragmente in direkter Nachbarschaft an das Templat hybridisiert wurden, lief aber

bei optimaler Anordnung mit vergleichbarer Effizienz ab wie eine enzymatische Ligation.^[59] Eine Weiterentwicklung dieses Systems war die Verwendung von Isocystein anstelle von Cystein am N-Terminus der PNA bei der Ligation. Das Produkt hatte eine ungünstigere Bindungsgeometrie, was den Templat-Turnover im Vergleich zum Produkt der Cysteinligation vereinfachte (ein mehr als vierfach höherer Turnover wurde erzielt), ohne dabei die Reaktionsspezifität zu beeinträchtigen. Zur Erleichterung der Analyse des Ligationsprodukts wurden die beiden PNA-Fragmente mit Fluorophoren, die ein FRET-Signal ergeben, markiert.^[60] Beeindruckenderweise wurde zwischen dem perfekt angepassten sowie dem Mismatch-haltigen Templat ein mehr als 100-facher Selektivitätsunterschied beobachtet.^[61]

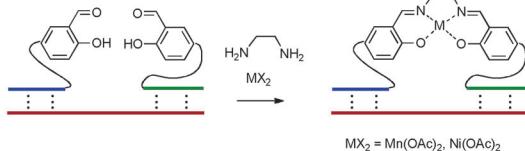
Auch wenn die üblicherweise nahezu neutralen Bedingungen bei Templat-gestützten Hybridisierungsreaktionen ungünstig für Aldolkondensationen sind, gelang es Huang und Coull, in Gegenwart eines Diaminkatalysators den Farbstoff Hemicyanin aus zwei *p*-Aminobenzaldehyd- und Indolinium-derivatisierten DNA-Fragmenten zu bilden (Abbildung 6.4).^[62] Diese Reaktion ist besonders reizvoll, da keines der Ausgangsmaterialien fluoreszierende Eigenschaften hat, während das Produkt hochfluoreszierend ist. Deshalb kann die Templatreaktion in Echtzeit durch Fluoreszenzüberwachung verfolgt werden, was die Gegenwart eines gegebenen Nucleinsäuretemplats anzeigen kann. Die Verwendung eines Katalysators mit zwei Aminen war wichtig, um eine schnelle Reaktion zu erhalten, was darauf schließen lässt, dass sowohl der Iminium-, als auch der Basenkatalysator an der Reaktion beteiligt sind. Mit 10 mM Katalysator und jeweils 200 nm Matrize und Sonde wurden binnen 2 h Umsätze von 25–50 % erzielt. Die Reaktion erwies sich als serumkompatibel und könnte daher nützlich für die Diagnostik sein. In einem konzeptionell verwandten Ansatz beschrieben Ladame et al. eine ähnliche Strategie, um aus einem PNA-Fragment, das mit einem nichtfluorogenen Aldehyd und einem Enamin derivatisiert war, einen Cyaninfarbstoff zu gewinnen (Abbildung 6.5). Ein wichtiger Unterschied ist, dass diese Reaktion keinen externen Katalysator benötigt, um die Aldolisierung/Kondensation zu vermitteln. Die Reaktion wurde an einem parallelsträngigen G-Quadruplex-DNA-Templat in sequenz- und strukturspezifischer Weise durchgeführt (dieselbe DNA-Matrize konnte die Reaktion ohne G-Quadruplex-Induktion nicht vermitteln).^[63] Die Verwendung verschiedener Indolinderivate ergab Cyaninfarbstoffe mit spektral aufgelöster Fluoreszenz.

Liu et al. demonstrierten, dass DMTMM (siehe Abbildung 6.6 für die Struktur) für die DNA-vermittelte Amidbildung bei DTS-Reaktionen verwendet werden kann.^[19] Kürzlich nutzten Seeman, Canary et al. diese Reaktion, um DNA-Fragmente effizient zu verbinden (> 95 % Ausbeute), die angehängt an die 2'-Position einer Ribose eine Aminogruppe und eine Säurefunktion tragen (Abbildung 6.6).^[64] Bei Raumtemperatur verlief die Reaktion mit gleicher Effizienz für den Fall benachbarter DNA-Fragmenten wie für denjenigen von Fragmenten, die durch drei Nucleotide getrennt waren. Bei 4 °C jedoch war die Ligation auf benachbart hybridisierte DNA-Fragmente beschränkt. Bemerkenswert ist, dass bei einer solchen Verbrückungsstrategie nicht die ter-

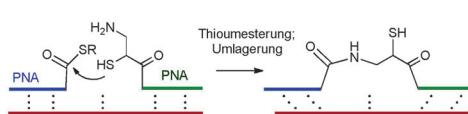
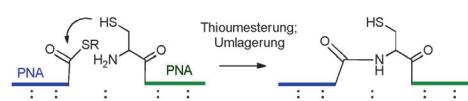
1. nucleophile Substitution



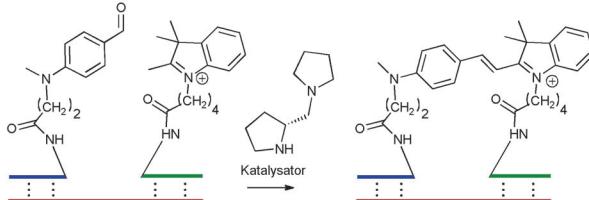
2. Templat-gestützte Metallosalenbildung



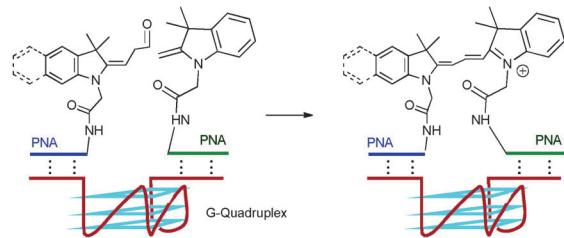
3. Templat-gestützte native chemische Ligation von PNAs



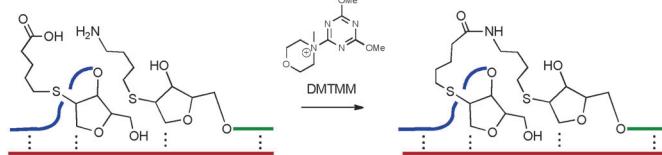
4. Amin-katalysierte Kondensation zur Templat-gestützten Hemicyaninbildung



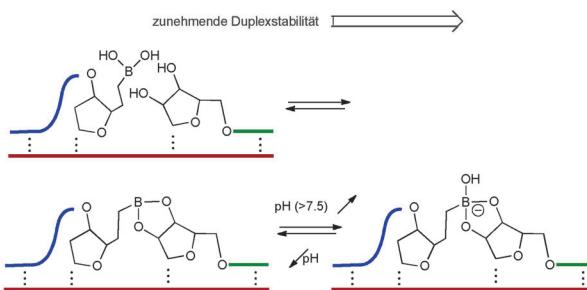
5. G-Quadruplex-gestützte Cyaninbildung über Aldolkondensation



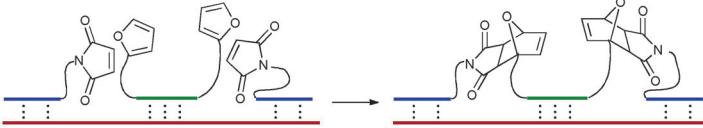
6. Templat-gestützte Amidierung zwischen 2'-Substituenten an der Ribose



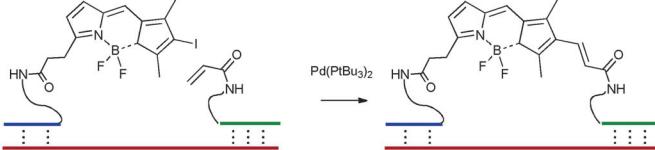
7. Templat-gestützte Boronatbildung



8. Templat-gestützte Diels-Alder-Ligationen



9. Templat-gestützte Heck-Kreuzkupplung



10. Templat-gestützte Bildung eines aktiven Palladiumkatalysators

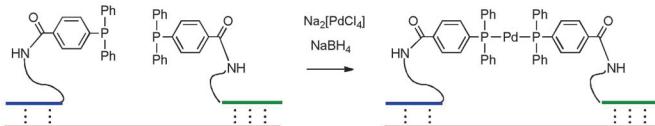


Abbildung 6. Templat-gestützte Ligation über nucleophile Substitution, Kondensation, Cycloaddition und Kreuzkupplung.

minalen 3'- und 5'-Positionen beteiligt sind, sodass diese für weitere Modifizierungen verfügbar sind, die für den Aufbau komplexerer Verzweigungen und damit für die Bildung von Nanostrukturen nötig sein könnten.

Alle bisherigen Ligationsreaktionen beruhten auf irreversiblen Umwandlungen. Smietana, Vasseur et al. beschrieben allerdings ein alternatives System, das eine kovalente, aber dennoch hoch reversible Templatreaktion ermöglichte. Dies gelang durch Austausch der endständigen Phosphatgruppe an der 5'-Position gegen Boronsäure, die mit angrenzenden Nucleinsäurefragmenten mit einer Ribose am 3'-Ende Boronsäureester bilden kann (Abbildung 6.7). Das Gleich-

gewicht dieser Reaktion konnte durch Temperatur- und pH-Veränderungen verschoben werden. Ein höherer pH-Wert führte zur Bildung einer Hydroxyboronatbindung (Rehybridisierung des Bors von sp^2 zu sp^3) mit höherer Duplexstabilität als der entsprechende Boronsäureester.^[65] Ein ähnlicher Effekt wurde in Gegenwart von Cyaniden beobachtet. Das ligierte System war unempfindlich gegen einen großen Überschuss an externem Diol (Fructose). Die Reaktivität der Borbindungen innerhalb von Nucleinsäuresträngen gegenüber externen Stimuli kann für die Entwicklung biologisch relevanter dynamischer Systeme nützlich sein.^[66]

Die Diels-Alder-Reaktion von Furan mit Maleimid ist wegen ihrer Orthogonalität zur in Nucleinsäuren vorhandenen Funktionalität und wegen ihrer Effizienz für die Ligation von DNA-Fragmenten interessant. Brown et al. beschrieben eine äußerst schnelle und effiziente Templat-vermittelte Ligation von Oligonucleotiden, die mit diesen beiden Einheiten derivatisiert waren (Abbildung 6.8). Diese Methode ermöglichte es, drei Oligonucleotide auf kontrollierte Weise gleichzeitig zu verbinden; die Reaktion lief binnen 1 min bei Raumtemperatur ab, während nicht-Templat-gestützte Reaktionen langsam und unvollständig waren.^[67]

Liu et al. zeigten, dass die Palladium-katalysierte Kreuzkupplung DNA-gestützt durchgeführt werden kann.^[68] Vor kurzem beschrieben Herrmann et al. eine Anwendung dieser Reaktion, um Iod-Bor-Dipyrromethen-Fluorophore durch eine Heck-Reaktion zu modifizieren, was zu einer höheren Fluoreszenz-Quantenausbeute für das Produkt der Heck-Kupplung führte (Abbildung 6.9).^[69]

Herrmann et al. demonstrierten auch, dass eine DNA-Matrize verwendet werden kann, um Phosphangruppen auszurichten und so die Bildung eines katalytisch aktiven Palladiumkomplexes zu steuern (Abbildung 6.10).^[70] Die Templat-gestützte Bildung des Katalysators wurde durch Desiodierung von profluoreszierendem Iod-Bodipy bestätigt. Beeindruckenderweise konnte der Katalysator beinahe 1000 Äquivalente des Profluorophors umwandeln und somit eine sehr große Signalverstärkung erzielen.

3.4. Anwendung der Templat-gestützten Ligation

Obwohl die besprochenen Kondensationsreaktionen offensichtlich eine effiziente Ergänzung für DNA-basierte Nanoanordnungen sowie für die Übersetzung von Nucleinsäure-Informationen in definierte Materialien sind, haben sich die meisten Beiträge bisher auf die methodischen Aspekte der Templatreaktionen konzentriert. Gothelf et al. beschrieben hochinteressante Anwendungen der Metallosalenkondensation (Abbildung 6.2). Sie demonstrierten z. B., dass sich molekulare Module, die ein bis drei Salicylaldehydeinheiten mit Oligonucleotidmarken enthalten, durch Hybridisierung selbstorganisieren und durch Diamin- und Mn^{+2} -Addition kovalent verknüpft werden können, wodurch der Bottom-up-Aufbau vorab festgelegter Nanomatrizen möglich ist.^[56] Mit dieser Methode wurden kürzlich Nanostäbchen-Fragmente nach Anleitung eines DNA-Templats verbunden (Abbildung 7).^[71] Wegen der Programmierbarkeit sowie des großen Interesses an modularen, monodispersen makromolekularen Strukturen ist dieser Ansatz vielversprechend für die Nanowissenschaften.

Verdrängungsreaktionen waren auch die ersten nichtenzymatischen Reaktionen, die für die Nucleinsäure-Erkennung verwendet wurden. Kool et al. nutzten Templat-ver-

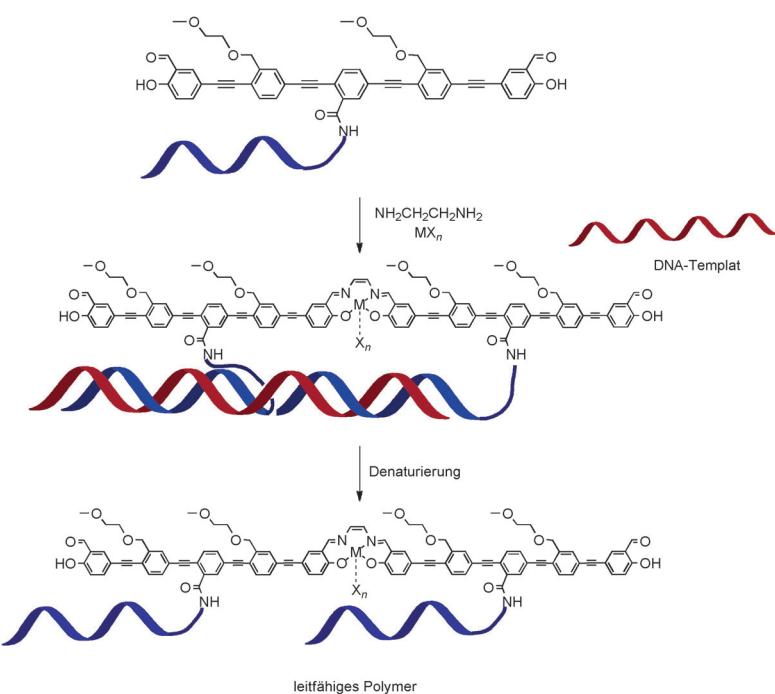


Abbildung 7. Templat-gestützte Synthese von leitfähigen Polymeren über Metallosalen-kondensation.

mittelte Phosphorothioat-Iodid-Ligationen zur Detektion und Identifizierung von RNA- und DNA-Sequenzen.^[53] Das System der ersten Generation, das durch die Arbeit von Lestinger et al.^[5] angeregt wurde, beruhte auf einem hohen Grad an Präorganisation für die Herstellung eines $-OP(O_2^-)S-$ -Surrogats der nativen Phosphodiesterbindung.^[72] Die Kombination der Ligationspezifität mit der Hybridisierungsspezifität des ligierten Produkts ergab eine starke Diskriminierung von Mutationen in der Templatsequenz ($> 10^4$ -fach). Im Unterschied zur enzymatischen Ligation war die Ligation gleichermaßen produktiv mit DNA- und RNA-Templaten. Durch Verwendung verschiedener Fluorophore, die auf den entsprechenden Ligationsfragmenten ein FRET-Signal ergeben, konnte die Reaktion über die Fluoreszenz beobachtet werden. Die zweite Generation dieser Technik fußte auf einer modifizierten Abgangsgruppe: Ein Tosylat-surrrogat mit Dabsylgruppe lösche die Fluoreszenz eines benachbarten Fluorophors. Durch nucleophile Ligation wurde der Quencher entfernt, und das Produkt wurde fluoreszierend.^[73] Dieses gequenchede Autoligations(QUAL)-Sonden-system wurde für den direkten, sequenzspezifischen Nachweis von RNA in Bakterien und ganzen Zellen eingesetzt,^[74,75] was die Detektion von ribosomalen Sequenzen und β -Aktin-mRNA in eukaryotischen Zellen ermöglichte^[75] (Sonden wurden durch porenbildende Streptolysin-O-Peptide eingeführt). Weiterhin gelang durch Detektion mithilfe von Zwei-Farben-Fluoreszenzmikroskopie eine schnelle Diskriminierung von Paaren ähnlicher Bakterienstämme, deren rRNA sich in einem einzelnen Nucleotid unterschied.^[76] Ein modifiziertes System beruhte auf zwei Quencherresten pro Fluorophor-markierte DNA-Sonde (Abbildung 8).^[77,78] Als Ergebnis waren in diesem Doppelverdrängung

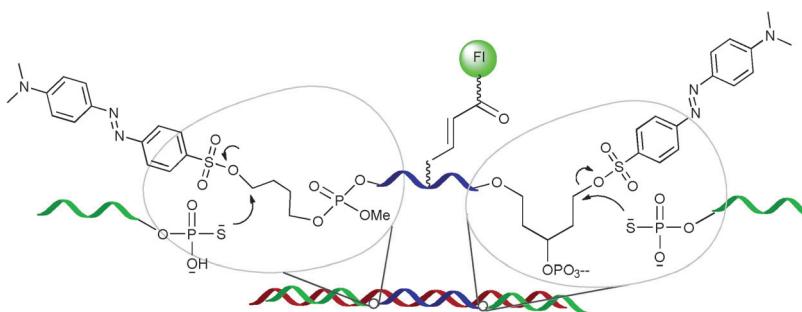


Abbildung 8. Sandwich-gequenchte Autoligation (QUAL) (Fl=Fluorescein); die Ligation verdrängt die Quenchergruppe (Dabsyl).

gungssystem die Hintergrundfluoreszenz sowie das Ausmaß des nicht-Templat-vermittelten Quencherverlusts infolge von Hydrolyse durch externe Nucleophile verringert. Die vollständige Entfernung der Quencher von den „Sandwichsonden“, die an den 3'- und 5'-Enden reaktive Gruppen tragen, ist nur nach Reaktion und Hybridisierung zweier unterschiedlicher Phosphorothioatsonden strangaufwärts und strangabwärts am selben Templat möglich. Dieses System ergab sogar in Gegenwart von 50 μ M Dithiothreitol (DTT) eine spezifische Templatreaktion, während die einzelne Quenchersonde unter diesen Bedingungen durch starke Hintergrundreaktionen beeinträchtigt wurde. In einer Erweiterung der Templat-gestützten Verdrängungsreaktion für die Nucleotiderkennung nutzten Kool et al. miRNA, um eine lineare, 5'-Iodid und 3'-Phosphorothioat enthaltende Vorstufe Templat-vermittelt zu cyclisieren. Das cyclisierte Produkt konnte durch Rolling-Circle-Amplifikation mit einer Polymerase amplifiziert und über eine fluorogene Templatreaktion nachgewiesen werden. miRNA ist eine Klasse von RNA, die eine entscheidende regulatorische Funktion in der Zelle ausübt und deren anomale Expression mit zahlreichen krankhaften Veränderungen in Verbindung gebracht wurde. Die Kombination aus enzymatischer Amplifikation und Templat-vermittelter fluorogener Reaktion ermöglicht eine Nachweisgrenze von 200 pm in Lösung.^[79]

Die in Abschnitt 3.3 erwähnte, von Ladame et al. entwickelte Kondensation von Fluorophorvorstufen zum Cyaninfarbstoff (Abbildung 6.5)^[63] wurde ursprünglich entwickelt, um die Bildung von G-Quadruplexen durch Templat-gestützte Kondensation zu detektieren. Diese Strategie wurde kürzlich auf die Untersuchung anderer Sekundärstrukturen erweitert.^[80] Es wird vermutet, dass außer der reichlich vorhandenen doppelsträngigen, helicalen Form der DNA auch sekundäre DNA-Strukturen am Transkriptions-Regulations-Mechanismus beteiligt sein könnten.^[81] Beispielsweise können selbstkomplementäre oder palindromic Sequenzen Haarnadelstrukturen bilden, während Guanincluster-reiche Fragmente monovalente, Kation-stabilisierte Guaninquadrate bilden, die zu G-Quadruplexen gestapelt sind. Eine Computeranalyse des Genoms lässt auf eine Anreicherung solcher Sequenzen mit Potenzial zu alternativer Faltung in wichtigen regulatorischen Regionen, wie Genpromotoren oder Replikationsursprüngen, schließen. Daher ist die Entwicklung von Methoden zur Erkennung spezifischer Sekun-

därstrukturen in biologischen Systemen äußerst interessant. Ladame et al. beschrieben eine Fluoreszenzmethode zur Unterscheidung zwischen ähnlichen DNA-Matrizen, die voneinander in ihrer Fähigkeit zur Quadruplexbildung abweichen, indem Sonden für flankierende Regionen einer möglichen viersträngigen Anordnung verwendet wurden. Mehrere Sondenbindungsmuster wurden für die Erkennung von Haarnadelmotiven (Abbildung 9) getestet und ergaben ein spezifisches Fluoreszenzsignal in Gegenwart der DNA-Schleifenstruktur. Die stärkste Fluoreszenz fand sich jedoch bei einer Architektur, bei der die Reaktion in Nachbarschaft

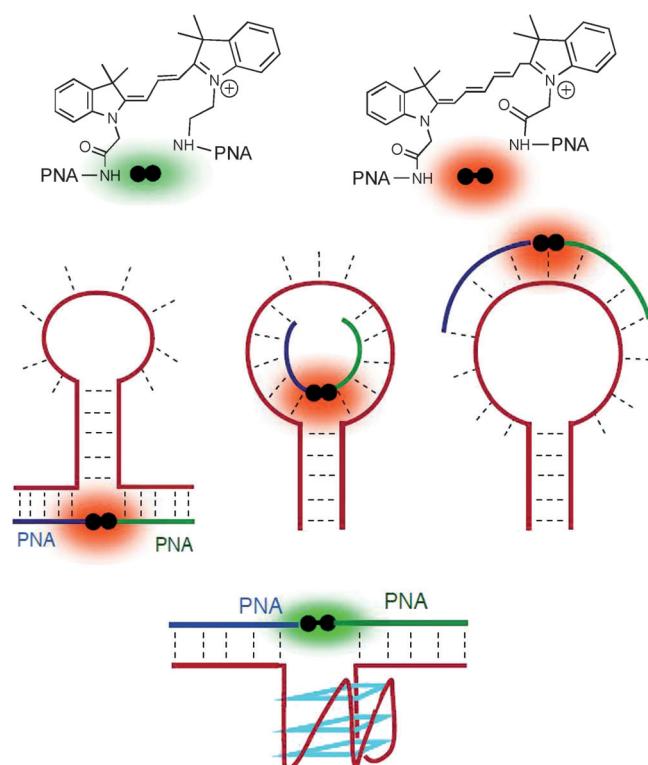


Abbildung 9. Templat-gestützte Synthese von Cyaninfluorophoren mit verschiedenen DNA-Templat-Architekturen.

zum Haarnadelstamm abließ. Die Reaktion wurde auch auf einen länger emittierenden Cyaninfarbstoff bis in den Nahinfrarottbereich ausgedehnt, wodurch sich unterschiedliche DNA-Architekturen mit einem Zwei-Farben-Detektionssystem bestimmen lassen könnten.

3.5. Umsatz bei Templat-gestützter Ligation mithilfe von Temperaturzyklen

Die besprochenen Beispiele verdeutlichen, dass Oligonucleotidtemplate die konzipierten Reaktionen erleichtern, indem sie funktionelle Gruppen in großer Nähe aus-

richten, eine hohe effektive Konzentration bewirken und somit die Umsetzung beschleunigen. Eine Einschränkung Templat-gestützter Ligationen ist allerdings, dass die Produkte längere Oligonucleotidsequenzen sowie eine höhere Affinität zum Templat aufweisen als jedes der Startfragmente. Amplifizierung von Nucleinsäure-Informationen erfordert einen Turnover des Templat. ^[82] Wenn gleich bei geringer Ausbeute ein gewisser Templat-Turnover infolge Strangverdrängung des Produktes durch die noch in hohem Überschuss vorhandenen Ausgangsfragmente auftreten kann, wird dieser Prozess im Verlauf der Reaktion schnell abgeschwächt. Mit einer katalytischen Menge an Templat in einer Ligationreaktion einen hohen Umsatz zu erreichen, bleibt ein anspruchsvolles Ziel. Der einfachste Ansatz nutzt analog zur Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Temperaturzyklen, um die Trennung des Templat-Produkt-Duplexes auszulösen. Es muss allerdings zwischen dem besseren Umsatz und der Tatsache abgewogen werden, dass hohe Temperaturen auch eine Nicht-Templatreaktion begünstigen können. Kool et al. untersuchten den Nutzen der Temperaturkreislaufführung für die Ligation einer 3'-Phosphorothioat-5'-Iodid-Sonde (13-mer bzw. 7-mer) und fanden nur einen marginalen Vorteil (1.5-facher Anstieg). ^[53] Abe et al. nutzten die Ligation von Phosphorothioat-Iodacetat, ^[83] die bekanntlich innerhalb von Minuten Templat-vermittelt abläuft, um den Vorteil eines Temperaturkreislaufs zu erforschen (Abbildung 10). ^[84] Die Tatsache, dass als Produkt dieser Reaktion ein geringfügig längerer Linker als bei der natürlichen Verknüpfung resul-

ständig ab, womit sie sich gut für eine schnelle Kreislaufführung eignet. Nach 10 Zyklen Bestrahlung und Denaturierung wurde eine fünfzehnfache Amplifizierung erreicht, während ohne Temperaturzyklen keine Vervielfältigung stattfand. ^[85] Die schnelle Kinetik in Kombination mit der möglichen Amplifizierung macht diese Methode zu einer interessanten Alternative für enzymatische Ligationsstrategien, deren Effizienz erheblich schwanken kann. ^[86]

4. Templat-gestützte Umwandlungen ohne Ligation

Templat-gestützte *Ligationen* sind für die enzymfreie Vervielfältigung von Genmaterial erforderlich, es werden aber Templat-vermittelte *Umwandlungen* gebraucht, um die Nucleinsäure-Information in ein funktionales Molekül (z. B. bei der Proteinsynthese) zu übersetzen. In einer bahnbrechenden Arbeit beschrieben Joyce et al. den Templat-gestützten Transfer einer Peptidkette von einem 5'-Thioester auf die 3'-Aminogruppe eines benachbarten Nucleinsäurefragments mithilfe einer Acyltransferreaktion. ^[8] Die Anregung zu dieser Reaktion lieferte der rasche Acyltransfer, der bei der natürlichen chemischen Ligation nach Thioumestierung von Cystein beobachtet wurde. Der Templat-gestützte Acyltransfer eines Peptids verlief innerhalb von 15 h zu 70%. In einer Reihe grundlegender Veröffentlichungen beschrieben Liu et al. einige neue DTS-Reaktionen, die eine Translation von Nucleinsäuresequenzen in kleine Moleküle und Polymere ermöglichen. Ein signifikanter Unterschied zwischen Nucleinsäure-gestützten Transferreaktionen und Ligationen besteht darin, dass erstere weniger empfindlich gegen Produktinhibition sind, da das Reaktionsprodukt keine Affinität für das Templat entwickelt (Abbildung 1).

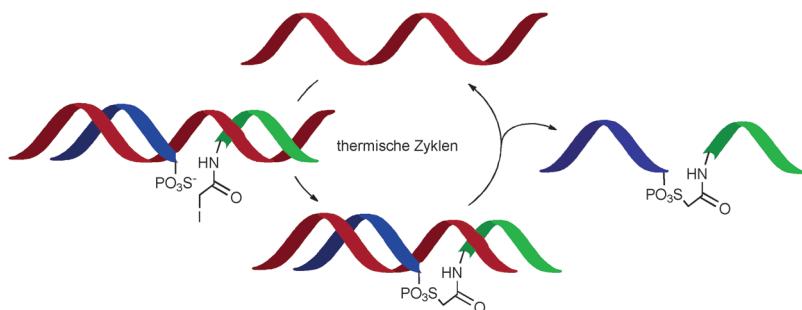


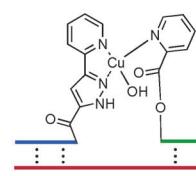
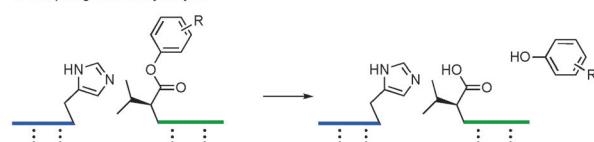
Abbildung 10. Templat-gestützte Ligation, amplifiziert durch Temperaturzyklen.

tiert, wirkt nicht signifikant destabilisierend. Mit RNA-Matrizen lief die Ligation zu 70% in 5 s mit einem stöchiometrisch eingesetzten Templat bei 35°C ab. Durch sorgfältige Optimierung der Zyklenbedingungen (10 s Ligation bei 35°C und 10 s Denaturierung bei 60°C; 99 Zyklen in 100 min) wurde mit 0.1% Templat (1 nm; 6% Umsatz) eine 60-fache Vervielfältigung erreicht, während ohne Temperaturzyklen keine Amplifizierung erfolgte. Diese Amplifizierungen fallen geringer aus als bei der PCR, da die Amplifizierung nicht exponentiell erfolgt. Trotzdem kann die Reaktion einfach in einem gewöhnlichen PCR-Thermocycler durchgeführt werden. Mit einer ähnlich effizienten Templatreaktion (Photodimerisierung von Anthracen-markierten DNA-Fragmenten; Abbildung 3.2) erreichten Ihara et al. ebenfalls eine erfolgreiche Amplifizierung über Temperaturzyklen. Die Templatreaktion läuft nach Bestrahlung 1 min lang nahezu voll-

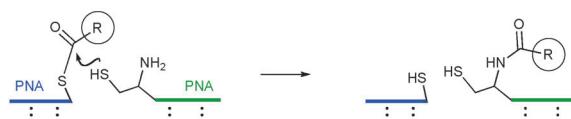
4.1. Hydrolyse und Acyltransfer an Templaten

Taylor und Ma beschrieben das erste Beispiel einer Reaktion mit einem Turnover eines Nucleinsäuretemplats unter isothermen Bedingungen. Die Hydrolyse eines Nitrophenylesters, gebunden am 3'-Ende eines 8-meren DNA-Fragments durch ein Imidazol, das wiederum mit dem 5'-Ende eines 15-meren DNA-Fragmentes verknüpft ist, gelang in Gegenwart eines katalytischen DNA-Templats (Abbildung 11.1). Diese Reaktion war gedacht als Modellsystem für die Prodrug-Hydrolyse, ausgelöst durch eine spezifische mRNA-Sequenz, die mit einem Krankheitszustand assoziiert ist. ^[87] Die Reaktion erreichte 50% Umsatz binnen 5 h mit 10% Templat-Imidazol-Konjugat und war empfindlich gegenüber einem einzelnen Mismatch. Im Anschluss wurde die Reaktion mit einem profluoreszierenden Cumarinester durchgeführt, um die Nucleinsäure-Erkennung bei diagnostischen Anwendungen zu ermöglichen. ^[88] Diese Phenolester waren jedoch labil gegen im Plasma vorkommende Hydrolasen, was die Anwendung der Methode in komplexeren biologischen Umgebungen ausschloss. Mokhir, Krämer et al. beschrieben eine

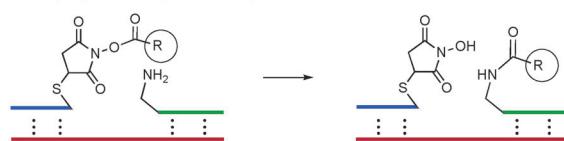
1. Templat-gestützte Hydrolyse



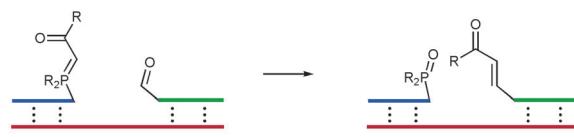
2. Templat-gestützter Acyltransfer über native chemische Ligation



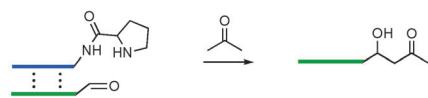
3. Templat-gestützter Acyltransfer ausgehend von NHS-Ester



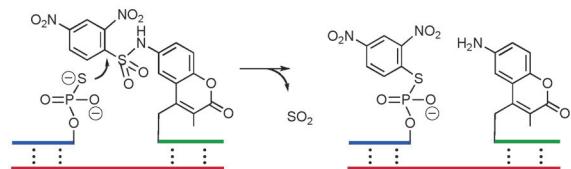
4. Templat-gestützte Wittig-Olefination



5. Templat-gestützte, Prolin-katalysierte Aldolreaktion

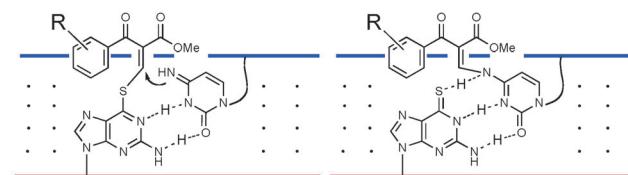


6. Templat-gestützter S_NAr-Transfer

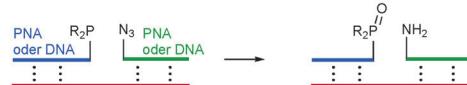


7. Templat-gestützte, metallorganische Heterocyclenbildung mit resultierendem Fluorophor

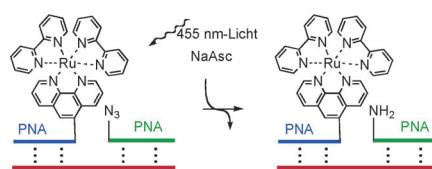
8. Templat-gestützter Interstrangtransfer über eine Michael-Addition und Eliminierung



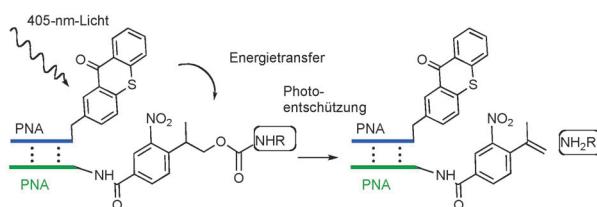
9. Templat-gestützte Staudinger-Reaktion



10. Templat-gestützte Reduktion eines Azids mit Ru-Katalysator und Natriumascorbat als stöchiometrischem Reduktionsmittel



11. Templat-gestützte Photospaltung



12. Templat-gestützte Photooxidation

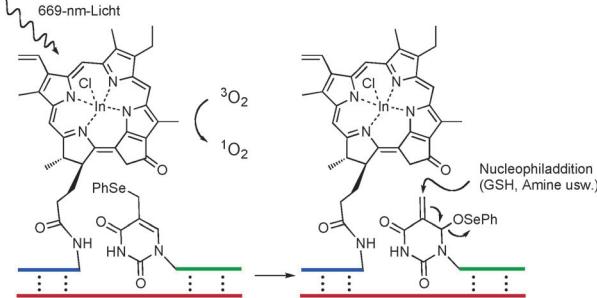


Abbildung 11. Templat-gestützte Transferreaktionen.

Nucleinsäure-gestützte Hydrolyse mit einem Metallkatalysator (Abbildung 11.1), die durch die einfache Kupfer-katalysierte Hydrolyse von Picolinat angeregt wurde. In diesem System waren ein Kupfer(II)-Chelat bildender Pyri-

dylpyrazolylrest am N-Terminus eines PNA-Fragments und ein Pyridin-2-carboxyester am C-Terminus eines zweiten PNA-Fragments gebunden. Die Hydrolyse ergab mit katalytischer DNA-Matrize (20 %) einen Umsatz von über 80 %

innerhalb von 50 min.^[89] Dieser Ansatz unterschied zwischen Templaten mit einem einzelnen Mismatch mit >100-facher Selektivität (besser als die einer T-4-DNA-Ligase) und einer Nachweisgrenze von 10 fmol bei Verwendung von einzelsträngiger DNA (ssDNA)^[90] und konnte auch mit dsDNA durchgeführt werden.^[91] Eine alternative Strategie, bei welcher der Katalysator zunächst in einem inaktiven zweizähnigen Komplex mit einer cyclischen Sonde vorliegt und anschließend durch Hybridisierung dekomplexiert (aktiviert) wird, wurde ebenfalls beschrieben. Die Reaktion verlief unter milden Bedingungen mit günstiger Kinetik, aber signifikanter Hintergrundreaktion (weniger als ein dreifacher Unterschied als Reaktion auf das Vorhandensein eines einzelnen Mismatch).^[92]

Die in Abschnitt 3 besprochene NCL (Abbildung 6.6) wurde an eine Acyltransferreaktion mit hoher Turnover-Frequenz angepasst (Abbildung 11.2).^[93] Ein mit einem Thioester derivatisierter PNA-Strang wirkt dabei als Acyl-donor. Durch Angriff des N-terminalen Isocysteinrests einer Akzeptor-PNA wird ein neuer Thioester mit dem Acylrest einer Donor-PNA-Sonde gebildet. Diese Zwischenstufe lagert sich schnell nach einem S-zu-N-Acyltransfer um. Die Leistungsfähigkeit dieser Reaktion hat eine Reihe von Anwendungen zur Nucleinsäure-Erkennung und Nucleinsäure-ausgelösten Synthese bioaktiver Moleküle ermöglicht (siehe Diskussion in Abschnitt 4.5 und Abbildung 12). In parallelen Studien testeten Stulz et al. außer Aminen noch weitere Nucleophile, die an Acyltransferreaktionen mit Thioestern teilnehmen könnten. Sowohl Thioester als auch Nucleophil waren über relativ lange Anker (>10 Atome) an DNA-Fragmente gebunden, was dem Reagens nach der Templat-vermittelten Ausrichtung ein großes Maß an Freiheit ließ. Generell lieferte keines der untersuchten Nucleophile binnen 48 h bei 38°C und pH-Werten von 6.5 bis 9.5 mehr als 20% Umsatz, was die Bedeutung des hohen Präorganisationsgrads des von Joyce et al.^[8] entwickelten Systems bestätigt und den Vorteil der NCL-Strategie unterstreicht. Bemerkenswerterweise wurde mit einem Hydrazid ein moderater Acyltransfer (12% Ausbeute) bei pH 6.5 beobachtet, während ein Amin und ein Hydroxylamin unter diesen Bedingungen praktisch unreaktiv waren. Diese Beobachtung kann dem niedrigeren pK_s -Wert des Hydrazids zugeschrieben werden.^[94]

Mit stärker aktivierten Acyldonoren – DNA-NHS-Ester-konjugaten (Abbildung 11.3) – wurde kürzlich die Nucleinsäure-gestützte Bildung von Amidbindungen in mehrstufigen DTS-Reaktionen beschrieben (siehe auch Abbildung 13 in Abschnitt 4.5). Die Reaktion ergab >75% Ausbeute innerhalb von Minuten.^[95,96]

4.2. Templat-gestützte Wittig-Reaktion und andere Transferreaktionen mit nucleophiler Verdrängung

Wittig-Reaktionen an DNA-Template (Abbildung 11.4) wurden erstmals von Liu et al. beschrieben und ausgedehnt in DTS-Reaktionen eingesetzt.^[68,97,98] Kürzlich nutzten Turberfield, O'Reilly und Mitarbeiter diese Reaktion in einer mehrstufigen Eintopf-DNA-Synthese (siehe Abbildung 14.2 und 14.3 in Abschnitt 4.6).^[99–101] Diese Reaktion wurde auch

eingesetzt, um mit PNA-Sonden ein Fluorophor zu bilden (Abbildung 14.3).^[102]

Marx und Tang beschrieben eine Kreuzaldolreaktion an DNA-Template mit einem DNA-Strang, der mit Prolin derivatisiert war und mit einem Keton in Lösung ein Enamin bildete; das Enamin reagierte wiederum mit einem komplementären Strang, der ein Aldehyd trug (Abbildung 11.5).^[103] Die Reaktion lief in 2 h nahezu vollständig ab, und das Prolin-DNA-Konjugat konnte mehrere Kondensationen katalysieren, vor allem bei der Anwendung von Temperaturzyklen.

DNA-Fragmente mit einem Phosphorothioat wurden von Kool et al. ausgiebig bei nucleophilen Ligationsreaktionen verwendet (Abbildungen 6.1 und 8). Ito et al. nutzten die Nucleophilie des Phosphorothioats für eine nucleophile aromatische Substitution (S_NAr) an einem 2,4-Dinitrosulfonamid (Abbildung 11.6).^[104] Das Dinitrosulfonamid war an Cumarin gekuppelt, wodurch dessen Fluoreszenzquantenausbeute um das 70-Fache gesenkt wurde. Wesentlich war, dass sich dieses neue fluorogene Cumarinsubstrat bei pH 5–10 und Temperaturen bis zu 90°C als stabil erwies. Die Templatreaktion zeigte gute Unterscheidung eines Einzelnucleotid-Mismatch; die Reaktionsgeschwindigkeit war jedoch deutlich geringer als jene der Ligationsreaktion, und der mögliche Templat-Turnover wurde nicht untersucht.

Kool und Franzini erforschten die metallorganische Templat-gestützte Aktivierung von profluoreszierendem Rhodamin B (Abbildung 11.7).^[105] In Gegenwart eines passenden Template reagierte das DNA-konjugierte, profluoreszierende Phenylthiocarbazid-Derivat von Rhodamin mit dem *p*-Mercuriobenzoat-DNA-Konjugat, und das Spirolactam wurde durch die resultierende Cyclisierung geöffnet. Obwohl dieser neue Ansatz möglicherweise ein hohes Turn-on-Verhältnis (Fluoreszenzsteigerung bei Reaktion) aufweist, funktionierte er weniger gut als andere Reaktionen, die von der gleichen Arbeitsgruppe zur Unterscheidung von Mismatch-Template entwickelt wurden. Dennoch verlaufen Reaktionen von Thiolen mit organischen Quecksilberverbindungen schnell und reversibel und könnten bei verschiedenen Anwendungen von Nutzen sein.

Eine weitere potenziell nützliche Strategie von Sasaki et al. setzt auf die präzise Modifizierung einer ausgewählten Stelle in Nucleinsäureanordnungen. Die spezifische kovalente Modifizierung eines gegebenen Punktes auf dem Nucleinsäurestrang kann durch Hybridisierung einer komplementären Sonde mit einer reaktiven Gruppe, die nachfolgend auf die komplementäre Nucleobasenposition im Zielstrang übertragen wird, erreicht werden. Obwohl diese Reaktion über den Duplex hinweg stattfindet, was der bereits besprochenen (Abschnitt 2) Interstrangvernetzungsmethode ähnelt, beruht das von Sasaki et al. vorgestellte System auf einem nucleophilen Additions-/Eliminierungsmechanismus. Die Reaktion findet zwischen der Aminogruppe eines Cytosins und dem α,β -ungesättigten System eines S-funktionalisierten 6-Thioguanosindons statt (Abbildung 11.8).^[106] Durch die enge Nachbarschaft der Reaktanten im Duplex wird ein effizienter Funktionalitätstransfer gefördert und führt zu >50% Umsatz in 10 h. Auf diese Weise wurden verschiedene, an die Vinylphenylcarbonyleinheit konjugierte Marker (R) unter physiologischen Bedingungen selektiv an RNA ge-

kuppelt. Ein solcher Ansatz bietet eine Alternative zum direkten Einbau von modifiziertem Phosphoramidat während der Oligonucleotidsynthese.

4.3. Templat-gestützte Azidreduktion

Die Orthogonalität und Biokompatibilität der Staudinger-Reaktion^[107] haben mehrere Gruppen animiert, den Nutzen dieser Reaktion für Templat-gestützte Prozesse auszuloten (Abbildung 11.9).^[79,108–121] Die Reaktion erwies sich sowohl mit DNA- als auch mit RNA-Strängen als höchst effektiv und verläuft innerhalb von 30 min mit hohem Umsatz. Ein Schwerpunkt war die Verwendung dieser Reaktion bei der Nucleinsäure-Erkennung. Die Reaktion zeigt den von nichtligierten Fragmenten erwarteten Umsatz und ergibt daher eine bemerkenswerte und nützliche Signalverstärkung. Bei der ersten veröffentlichten Arbeit^[108] fand ein Fluorescein Verwendung, das mit einem 2-Carboxytriphenylphosphan verestert war, wodurch die Fluoreszenz gelöscht wurde. Nach Einleitung der Templat-gestützten Reaktion fand eine Staudinger-Ligation^[122] statt, die zum Transfer des Phosphanrestes führte und somit die Fluorescein-Fluoreszenz ermöglichte. Eine Einschränkung ist die unerwünschte Luftoxidation des Phosphans, die eine vollständige Umsetzung des Profluorophors verhindert. Alternativ haben einige Arbeitsgruppen neue Fluorophore beschrieben, die durch Azidreduktion aktiviert werden (Abbildung 15.1, siehe Diskussion in Abschnitt 4.7).^[109–111,118–121] Der Hauptvorteil dieser Strategie ist, dass ein Überschuss an Phosphan eingesetzt werden kann, um die partielle Oxidation des Phosphans unter aeroben Bedingungen zu vermeiden. Analog wurden Azid-basierte immolative Linker gewählt, um einen Fluorophor und seinen Quencher zu trennen oder ein Profluorophor oder andere bioaktive Moleküle freizusetzen (Abbildung 15.2).^[112,114]

Eine beträchtliche Einschränkung der Staudinger-Reaktion bleibt die Oxidationsempfindlichkeit des Phosphans, wenn die Templatreaktion an Luft stattfindet. Dies wird im Allgemeinen durch einen Überschuss an Phosphansonde relativ zum Azidpartner umgangen. Diese Lösung ist aber nicht ideal, da ein Überschuss der Phosphansonde die nicht-Templat-gestützte biomolekulare Reaktion begünstigt. Liu et al. beschrieben die photokatalysierte Reduktion von Aryl- und Alkylaziden mit einem $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ -Katalysator und stöchiometrischem Ascorbat oder NADPH als Reduktionsmittel.^[123] Unsere Arbeitsgruppe implementierte diese neue Methode für die Templat-gestützte Reduktion von Aziden. Mit handelsüblichem 5-Isocyanatphenanthrolin ($[\text{Ru}(\text{bpy})_2(5\text{-NCOPh})]^{2+}$) als Ersatz für den Rutheniumkatalysator gelang die einfache Konjugation an die Aminogruppe einer Nucleinsäure (Abbildung 11.10).^[124] Diese katalysierte Variante kommt mit nur 2 % der Ru-derivatisierten Sonde aus, anstelle eines Überschusses an Phosphansonde wie bei der Templat-gestützten Staudinger-Reaktion. Dieses katalytische System war hoch effizient hinsichtlich der Reduktion von Azidocumarin sowie dem Auslösen der Spaltung eines Azid-basierten immolativen Linkers (Abbildung 15.2).

4.4. Templat-gestützte Photoentschützung und Photooxidation

Photolabile Gruppen bieten ein einzigartiges Orthogonalitätsprofil, das routinemäßig zur Desaktivierung von bioaktiven Molekülen oder Reportern in biologischen Systemen genutzt wird. Angeregt durch die Tatsache, dass der Triplettsensibilisator Thioxanthonen die Entschützung solcher photolabilen Gruppen signifikant beschleunigt, erforschten wir den Templat-gestützten Energietransfer vom Sensibilisator auf eine photolabile Gruppe (Abbildung 11.11).^[125] Der Sensibilisator wurde mit einer 405-nm-LED angeregt, und ein elektronendefizienter 2-(2-Nitrophenyl)propyloxycarbonyl-(NPPOC)-Rest wurde wegen der geringen direkten Photospaltung mit Licht einer Wellenlänge > 300 nm ausgewählt. Die Templat-gestützte Reaktion zeigte eine mehr als 20-fache Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber dem Hintergrund. Diese Templat-gestützte Reaktion wurde zusammen mit einer Strangverdrängung verwendet, um Vier-Komponenten-Systeme zu bilden, die unterschiedlich auf DNA-Analyte reagieren (Abbildung 17 in Abschnitt 4.8).

Mokhir et al. beschrieben eine katalytische photochemische Templatreaktion mit einem Indium-basierten Photosensibilisator, der mit rotem Licht (669 nm) angeregt wird.^[126] Durch Anregung des Sensibilisators wurde $^1\text{O}_2$ generiert, das ein benachbartes Phenylselenenthyminderivat oxidierte, das durch [2,3]-sigmatrope Umlagerung ein reaktives Elektrophil bildete (Abbildung 11.12).^[127] Dieses Elektrophil konnte wiederum von verschiedenen Nucleophilen, wie Aminen oder Thiolen, abgefangen werden. Die Reaktion erfolgte in 30 min nahezu vollständig, während ohne Templat nur eine unwe sentliche Reaktion bei einer Konzentration von $1\text{ }\mu\text{M}$ der Reaktanten stattfand. Die Reaktion zeigte bis zu 45 % Umsatz des Phenylselenenthyminderivats bei Verwendung von lediglich 10 % Templat und Photosensibilisator. Obwohl das während der Reaktion gebildete Elektrophil bekanntermaßen mit dem komplementären Strang reagiert (Abbildung 2.3), erfolgte keine Interstrangvernetzung mit Nucleinsäuren, die das Phenylselen am terminalen Rest tragen, was die schnellere Dynamik eines terminalen Rests bei der Duplexbildung widerspiegelt. Die Nucleinsäure-ausgelöste Bildung von $^1\text{O}_2$ führte ebenfalls zur Umwandlung gelöster Fluorophore, was eine Nucleinsäure-Erkennung ermöglicht (Abbildung 16 in Abschnitt 4.8).^[128,129]

4.5. Anwendung Templat-gestützter Acyltransferreaktionen

Die Templat-gestützte native chemische Ligation ist eine robuste und schnelle Reaktion. Erste Arbeiten konzentrierten sich auf die Ligation, meist mit Isocystein (Abbildung 12.1), dessen Ligationsprodukt eine Bindungsgeometrie aufweist, die den Duplex destabilisiert und den Templat-Turnover ermöglicht.^[60,61] Der Fortschritt der Reaktion wurde per FRET zwischen Fluorophoren (Fluorescein und Tetramethylrhodamin) auf den individuellen Ligationssonden verfolgt. Mit dem Ziel, die Amplifikation der durch die Templatreaktion erzeugten Signale zu verbessern, wurden Transferreaktionen untersucht (Abbildung 12.2 und 12.3). Dazu wurde ein Fluoreszenzquencher (Dabsyl) von einem

Strang durch NCL auf den zweiten Strang übertragen (Abbildung 12.2), während beide Stränge mit einem spektral aufgelösten Fluorophor derivatisiert waren.^[93,130,131] Dieser Quenchertransfer ermöglichte die Verfolgung sowohl der Thioesterhydrolyse als auch des erwünschten Transfers der Quenchergruppe. Mit einem Äquivalent des Templatstrangs war die Reaktion nach 90 min beinahe vollständig abgelaufen. Wichtig war, dass die Reaktion mit einer signifikanten Signalverstärkung einherging. Die Verwendung von 10% Templat ergab sieben Turnovers binnen einer Stunde. Bei sehr niedriger Templatkonzentration (0.0001 Äquivalente; 10 pm) wurde eine Zahl von 402 Turnovers in 24 h errechnet (zweifach gegenüber dem Hintergrund). Allerdings führte die Templat-unabhängige Hydrolyse des Thioesters zu einer erheblichen Hintergrundfluoreszenz. Bei einer alternativen Strategie zur Verfolgung der Reaktion wurde ein Pyrenrest auf einen Pyren-markierten PNA-Strang übertragen, wodurch ein Pyren-Excimer gebildet wurde, das bei 340 nm

beobachtet werden kann.^[132] Auf diese Weise ist die Signalentstehung auf die erwünschte Ligation beschränkt. Es wurde festgestellt, dass die Empfindlichkeit und die Sequenzspezifität der Transferreaktion durch kleinste Änderungen der Thioesterstruktur stark beeinflusst werden können. Thioester vom Benzoyltyp oder lange Thiolanhänge werden langsamer übertragen, aber mit besserer Unterscheidung zwischen passenden und mutierten Templatsträngen.^[132] RNA-Template sind bei diesen Reaktionen genauso effektiv wie DNA. Der RNA-katalysierte Transfer eines Biotinreporters auf eine His-markierte PNA ermöglichte die Voramplifizierung viraler RNA für eine ELISA-Analyse (Abbildung 12.3).^[130] Diese Tandemamplifizierung ergab eine Nachweisgrenze von 500 attomol RNA des Humanen Immundefizienz-Virus I bei einfacher kolorimetrischer Ablesung.

Seitz et al. beschrieben den Nutzen der Templat-gestützten NCL für die Synthese bioaktiver Peptide (Abbildung 12.4).^[133] Der X-gebundene Inhibitor des Apoptose-

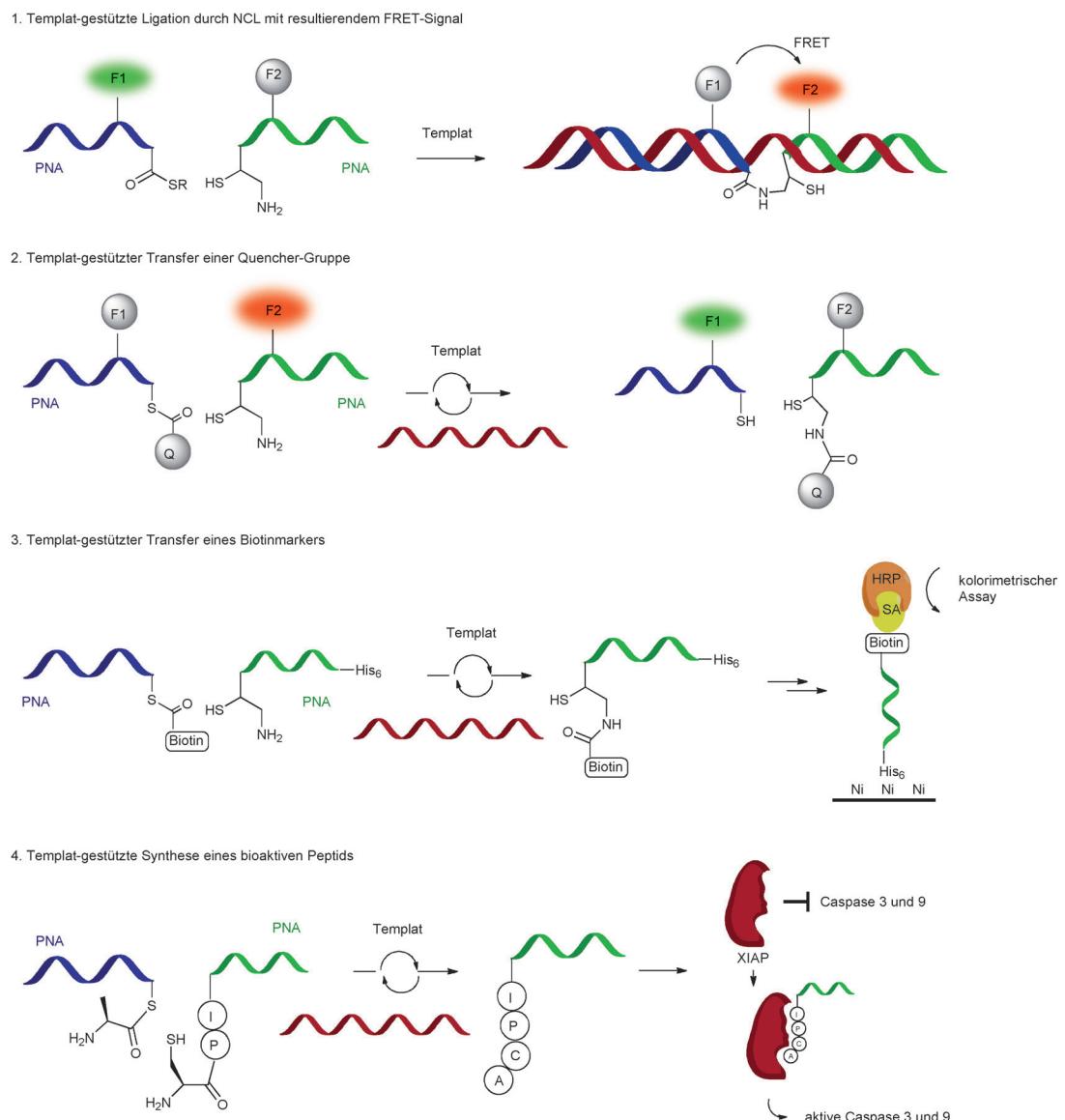


Abbildung 12. Anwendung von Templat-gestützten NCL-Reaktionen. HRP = Meerrettichperoxidase, SA = Streptavidin.

Proteins (XIAP) wird in Tumorzellen häufig überexprimiert, was eine Resistenz gegen apoptotische Stimuli durch Hemmung der Caspase-9 bewirkt. Durch ein Peptidmotiv, das direkt mit dieser Interaktion konkurriert, kann die antiapoptotische Aktivität von XIAP verringert werden. Eine Templat-gestützte Peptidkupplungsreaktion wurde entwickelt, um das bioaktive Peptid als Reaktion auf ein Templat bereitzustellen, das eine onkogene Mutation im Ras-kodierenden Gen verbirgt. Bei Verwendung roher Zell-Lysate zeigten PNA-Sonden keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptose; in Gegenwart eines hinzugesetzten DNA-Templats wurde die apoptotische Aktivität wiederhergestellt (45 % mit 1.0 Äquiv., 23 % mit 0.5 Äquiv.). Wie wegen der verschiedenen Präorganisationsgrade zu erwarten war, beeinflussten Länge und Beschaffenheit des Peptids die Reaktionsgeschwindigkeit, wobei längere Peptide allgemein langsamere Reaktionsgeschwindigkeiten aufwiesen.^[134]

Liu und He verwendeten eine sequenzielle Strategie zur Strangverdrängung, um eine sechsstufige, DNA-gestützte Eintopsynthese mit bemerkenswerter Effizienz durchzuführen (83 % Ausbeute im Durchschnitt, Abbildung 13).^[96] Diese Synthese nutzte den Vorteil einer sequenziellen Überhangverdrängung – der Fähigkeit einer ssDNA, in dsDNA einzudringen und daraus ein kleineres Fragment durch Hybridisierung an den Duplexrand zu verdrängen. Mit sechs nacheinander hinzugesetzten (30-min-Zyklus) DNA-NHS-Ester gebundenen Aminen wurde das DNA-Templat in ein Peptid mit sechs Resten übersetzt. Ein wichtiger Punkt ist, dass das Produkt mit dem DNA-Templat, das die Information für seine Synthese enthält, assoziiert bleibt und so einen praktischen Marker zur Identifizierung der Produktstruktur nach seiner Auswahl aus einer Bibliothek liefert. Eine notwendige Voraussetzung ist, dass das NHS-Ester-gebundene Amin geometrisch eingeschränkt ist, sodass es nicht cyclisiert.

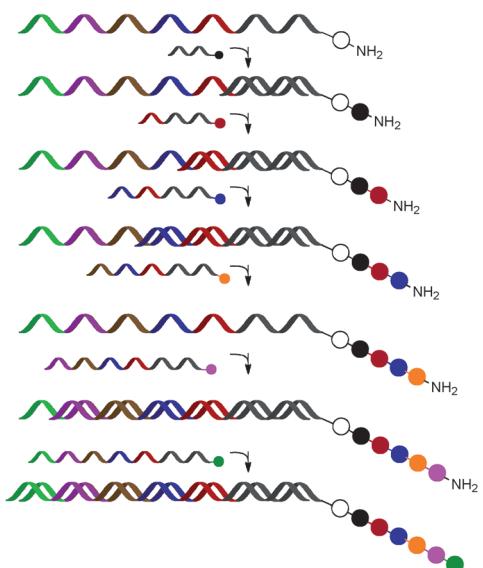
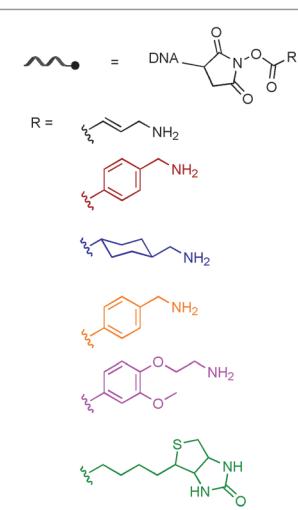


Abbildung 13. Sechsstufige, DNA-gestützte Eintopsynthese mit sequenzieller Strangverdrängung.



4.6. Anwendung Templat-gestützter Wittig-Transferreaktionen

Die erste Untersuchung der DNA-gestützten reiterativen Oligomerisierung mit difunktionellen Reagentien wurde von Turberfield, O'Reilly et al. über Templat-gestützte Wittig-Olefinition mit einem difunktionellen Ylid-Aldehyd durchgeführt (Abbildung 14.1).^[99] Die geordnete Oligomerisierung wurde durch sequenzielle Addition der Reagentien und nachfolgende Zugabe einer „Abfallsequenz“ erreicht, die das verbrauchte Reagens abtrennte und so das Templat für die nächste Reagentienzugabe freisetzte. Die Templat-vermittelten Kupplungen wurden an derselben Hybridisierungsstelle („Adapterregion“) durchgeführt, während die Entfernung des verbrauchten Reagens durch die Abfallsequenz über Strangverdrängung mit einer dem eingesetzten Reagens entsprechenden Überhangregion erreicht wurde. Ein Nachteil dieses Ansatzes ist, dass die Sequenz des Oligomerproduktes von der Reihenfolge der Reaktantenzugabe und nicht vom Templat abhängt. Damit sind Anwendungen wie die molekulare Evolution, die auf der Beibehaltung einer am Produkt angebrachten, DNA-kodierten Sequenzaufzeichnung beruhen, ausgeschlossen. Die Templat-gestützte Wittig-Reaktion ergab für ein Tetramer binnen 2 h eine Gesamtausbeute von 72 % (90 % Durchschnittsausbeute). Diese Methode wurde genutzt, um die Synthese langer Oligomere zu realisieren, wobei Decamere in 23–31 % Ausbeute entstanden.^[101] Dieselbe Arbeitsgruppe beschrieb eine alternative Strategie mit anderen Templatarchitekturen (Abbildung 14.2).^[100] Diese Strategie ermöglichte einen Hin- und Rücktransfer, der mit konvergenten Segmentkupplungen kompatibel ist, wodurch die Gesamtzahl der Herstellungs schritte für ein Oligomer verringert und eine konstante Reaktionsumgebung aufrechterhalten werden. Als Machbarkeitsnachweis wurde in drei Reaktionsschritten ein hexameres Olefin aufgebaut.

Seitz et al. schilderten ein Konzept zur Nucleinsäure-Erkennung auf Grundlage einer konsekutiven Signalverstärkung, zuerst durch eine Templat-vermittelte Reaktion und anschließend durch eine Wirt-Gast-Wechselwirkung des Produktes.^[102] Über eine Templat-gestützte Wittig-Reaktion wurde ein Stilben erhalten, das bei 380 nm fluoresziert und durch α -Cyclodextrin erkannt wird (Abbildung 14.3). Die optimale Reaktionstemperatur lag bei 65 °C mit 50 und 84 % Ausbeute innerhalb von 2 bzw. 12 h. Mit 0.02 % Templat wurden 1.7 % Ausbeute (84-facher Templat-Turnover, ohne Korrektur bezüglich Hintergrundreaktion) erzielt. 10 % Templatbeladung ergab einen vierfachen Turnover. Die enge Bindung mit α -Cyclodextrin stabilisiert die planare Konformation des *trans*-Stilbens und führt zu einer verstärkten Fluoreszenzemission. Mit 100 mM α -Cyclodextrin wurde ein bis zu 30-facher An stieg der Fluoreszenz beobachtet. Für diese doppelte Amplifizierungsmethode wurde eine Detektionsgrenze von 40 pm Templat beschrieben (1.6-fach über dem Hintergrund).

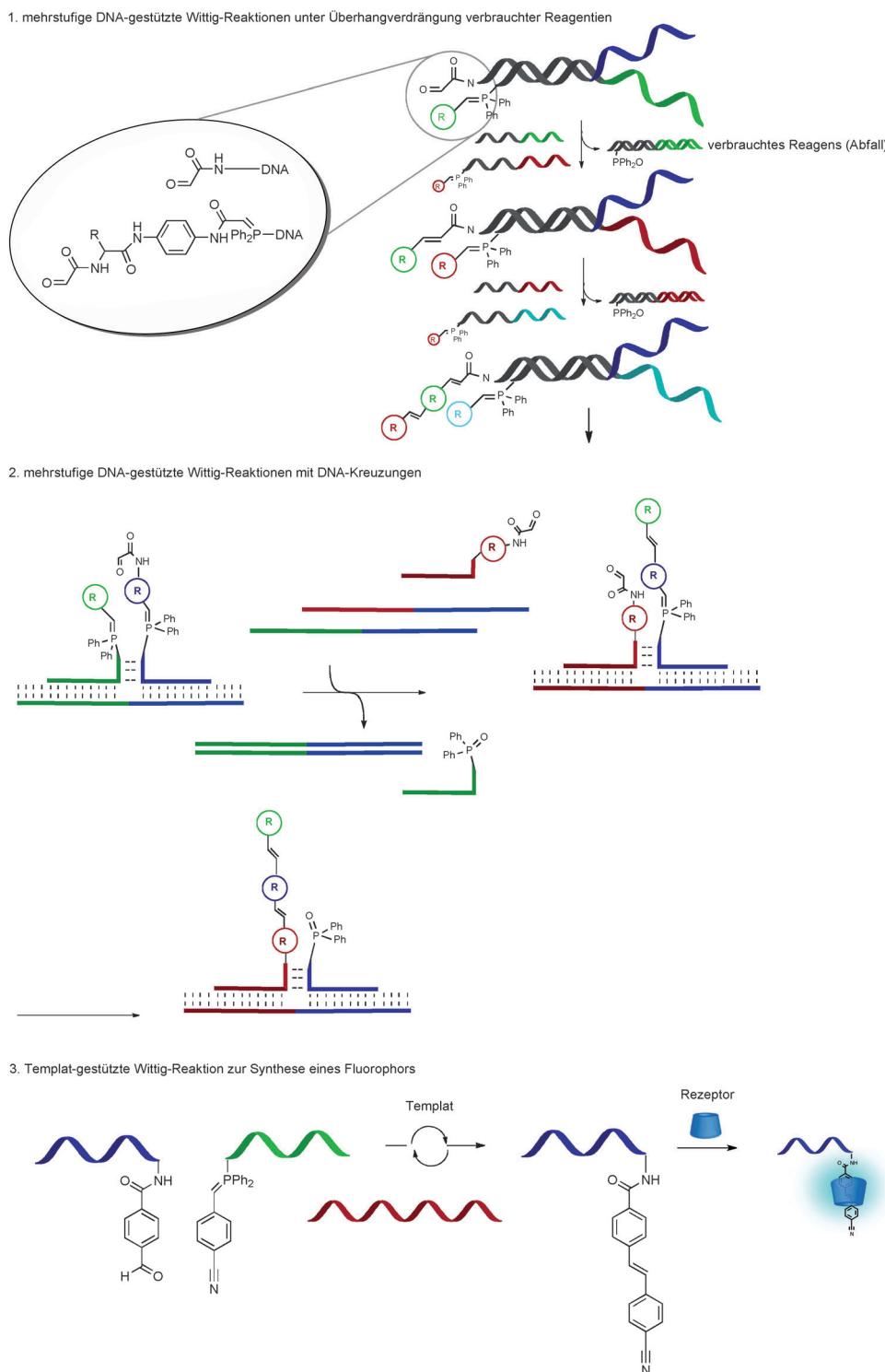


Abbildung 14. Anwendung von Wittig-Transferreaktionen bei der DNA-gestützten Synthese und Nukleinsäure-Erkennung.

4.7. Anwendung Templat-gestützter Azidreduktionen

Die Staudinger-Reaktion ist wegen ihrer Bio-Orthogonalität und Kompatibilität mit zellulären Prozessen wichtig für die chemische Biologie. Einige Anwendungen in lebenden Zellen auf Basis von Staudinger-Ligationen wurden be-

Sonden. Dieses System wurde mit einem zweiten Fluorophor (Fluorescein) ergänzt, um eine Emission größerer Wellenlänge durch FRET zu erhalten. In diesen ersten Beispielen wurde die Fluoreszenz des Cumarsins durch Umwandlung der elektronenliefernden Gruppe – Aminogruppe oder Phenolrest – in eine Azidgruppe bzw. Azidomethylethergruppe stark

schrieben.^[107] Vom Erfolg dieser Chemie angespornt, haben einige Arbeitsgruppen auf der Staudinger-Reaktion basierende Strategien zur Nukleinsäure-Erkennung mit dem Ziel entwickelt, diese Reaktion in Zellen durchzuführen. Zwei Strategien erhielten besondere Aufmerksamkeit: Die Entwicklung Azid-gequenchter Profluorophore (Abbildung 15.1) und das Auslösen der Abspaltung des Linkers nach der Azidreduktion (Abbildung 15.2).

Der erste beschriebene, Azid-basierte Profluorophor war ein Azidocumarin (Abbildung 15.1).^[109] Nach Reduktion des Azids wurde ein 22-facher Anstieg der Fluoreszenz beobachtet. Die Templat-gestützte Reaktion eines 4-Carboxytriphenylphosphan-derivatisierten mit einem Azidocumarin-derivatisierten PNA ergab eine schnelle Reaktion (35 % Umsatz in weniger als 15 min). Die Zugabe von Formamid beschleunigte die Reaktion weiter und steigerte die Effizienz. Das Templat wirkte katalytisch, mit über 20 Turnovers innerhalb von 30 min (1 % Katalysatorbeladung) bei einer Nachweisgrenze von 1 nM Templat (niedrigere Konzentrationen wurden nicht untersucht). Die Reaktion erzeugte geringe Fluoreszenz, wenn ein einzelner Nukleotid-Mismatch im Templat vorhanden war. Kurz darauf wurde mit Azidomethoxycumarin^[113] ein höherer Anstieg der Fluoreszenz nach Reduktion gemessen (62-facher Anstieg). Eine Templat-gestützte Reaktion mit DNA-Sonden zeigte eine ähnliche Kinetik, Umsatzfrequenz und Sequenzspezifität wie im Fall von Azidocumarin und PNA.

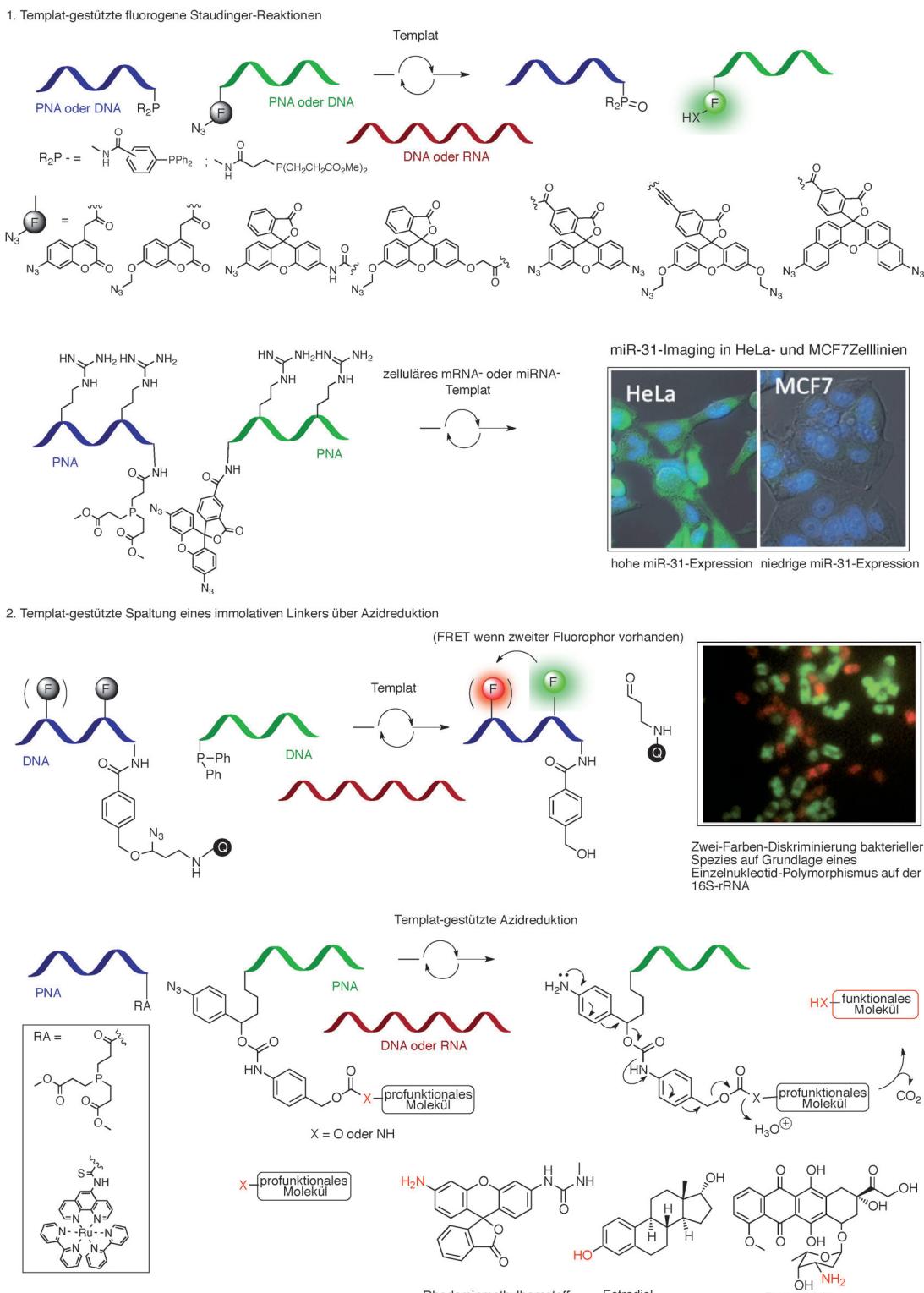


Abbildung 15. Anwendung der Templat-gestützten Azidreduktion.

abgeschwächt. Die gleiche Logik wurde auf Fluorophore mit rotverschobener Emission angewendet: Azidorhodamin,^[110,118] Azidomethylfluorescein,^[119] Bisazidorhodamin,^[111] Bis(azidomethyl)fluorescein^[121] und Bis(azido)naphthorhodamin (Abbildung 15.1).^[120] Die Reaktion von Azidorhodamin mit Triphenylphosphan lieferte ein überraschend stabiles

Aza-Ylid, das im Verlauf der Templatreaktion nicht hydrolysierte (die Templatreaktion lief innerhalb von 30 min vollständig ab, und die Halbwertszeit des Aza-Ylid-Abbaus betrug etwa 24 h).^[118] Die Aza-Ylid-Zwischenstufe fluoreszierte (Emission bei 550 nm gegenüber 520 nm für Rhodamin), allerdings führte die Templatreaktion zu einer Ligation,

die den Templat-Turnover verlangsamte. Dennoch diente die Reaktion zur Erkennung von 23S-rRNA in Paraformaldehydfixierten Bakterien (*E. coli*). Azidorhodamin konnte auch mit Dithiolen, wie DTT, reduziert werden, und eine Templat-gestützte Version der Thiolreduktion ergab das gewünschte Rhodaminprodukt, allerdings mit niedrigerer Reaktionsgeschwindigkeit. Wesentlich war, dass das Azidorhodamin bei pH 5–10 und bei hohen Temperaturen (90 °C) stabil war. Ein anschließender Bericht zeigte, dass eine Phosphanreduktion von Azidorhodamin tatsächlich möglich war, jedoch anstelle eines Triphenylphosphankonjugats ein reaktiveres Trialkylphosphan erforderte.^[110] Die Templatreaktion war sehr schnell (vollständig in 6 min mit einem Äquivalent Templat) und verlief mit 2% Templat innerhalb von 20 min unter siebenfacher Signalverstärkung.

Ein langjähriges Ziel der Verwendung von Templatreaktionen ist die Abbildung zellulärer Nucleinsäuren; wegen des schwierigen zellulären Transports der Nucleinsäuresonden war jedoch eine Membranpermeabilisierung notwendig. Zellgängige, Guanidinium-funktionalisierte Peptid-Nucleinsäuren (GPNAs)^[135] ermöglichen die Erkennung von mRNA in lebenden Zellen. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses von Azidorhodamin wurde Bisazidorhodamin eingeführt.^[112] Dessen Reduktion führte zu einem 120-fachen Anstieg der Fluoreszenz gegenüber einem 32-fachen Anstieg bei Azidorhodamin. Dieser Bisazidorhodamin-Fluorophor benötigt zwar zwei Äquivalente Phosphan, um den Quencher vollständig zu lösen, allerdings verläuft die Reduktion des zweiten Azids schneller als die des ersten, und es werden keine teilweise reduzierten Produkte beobachtet. Diese Strategie ist geeignet, miRNAs über verschiedene Zell-Linien (Abbildung 15.1) mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie zu detektieren und zu quantifizieren (sechsfacher Anstieg der Fluoreszenz für die perfekt passenden Sonden gegenüber jener der Mismatch-Sonden). Parallel dazu wurde über Mono- und Bis(azidomethyl)fluorescein berichtet. Bis(azidomethyl)fluorescein zeigte den höchsten Fluoreszenzanstieg (>300-fach) nach Entfernung des Quenchers und eine schnelle Templatreaktion mit gutem Umsatz (8 Zyklen mit 10% Templat; 53 Zyklen mit 0.1% Templat). Eine ausführliche kinetische Analyse der Reaktion ergab, dass die effektive Kinetik 1. Ordnung vergleichbar mit der Hybridisierungsgeschwindigkeit war, was vermuten ließ, dass bei der untersuchten Konzentration (50 nm) die Hybridisierung anstelle der Reduktion der Geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Dies stimmt mit früheren Beobachtungen überein, wonach der Abstand der Reaktanten (und somit der Präorganisationsgrad und die effektive Molarität) bei Templat-gestützten Staudinger-Reaktionen nur mäßig wichtig ist, bei einem optimalen Abstand von 2–4 Nucleobasen zwischen den Hybridisierungsstellen.^[109–110] Die Templat-gestützte Reduktion von Bis(azidomethyl)fluorescein war zur Erkennung von ribosomaler und messenger-RNA geeignet. Die Permeation der Membran mit Streptolysin O (SLO), einem porenbildenden Peptid, wurde genutzt, um DNA-basierte Sonden einzuführen, und die Detektion erfolgte über Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie (zweifacher Anstieg der Fluoreszenz für mRNA und zehnfacher Anstieg für rRNA). Dieselbe Methode wurde verwendet, um

Lasso-RNA (LaRNA), eine 2', 5'-verzweigte Verknüpfung in Gruppe-II-Introns und Spleißosomen, nachzuweisen.^[121] Die verzweigte Geometrie nähert ansonsten entfernt voneinander befindliche Nucleinsäuresegmente einander an. Mit Sonden, die auf diese Segmente gerichtet sind, und der Templat-gestützten Staudinger-Reduktion konnte LaRNA in vitro mit höherer Genauigkeit detektiert werden als beim analogen Ansatz mit Fluorophoren, die ein FRET-Signal aussenden; wegen der Templat-Turnover-induzierten Signalverstärkung wurden Nachweisgrenzen von bis zu 50 pm erreicht. Die Templat-gestützte Staudinger-Reaktion mit dem Fluorophor mit stärkster Rotverschiebung nutzt Bis(azido)naphthorhodamin und liefert ein Fluoreszenzsignal bei 655 nm. Anders als beim Azidorhodamin-Fluorophor wurde die Reduktion mit Triphenylphosphankonjugat nicht durch die Bildung einer stabilen Aza-Ylid-Zwischenstufe beeinträchtigt, wenn auch die mögliche Signalverstärkung wegen des Templat-Turnovers bei diesem Fluorophor nicht untersucht wurde.^[120] Die Kombination von Reduktion an Azidorhodamin- und Bis(azido)naphthorhodamintemplaten fand Verwendung für eine Zwei-Farben-Aufnahme zweier Template, die sich in einem einzelnen Nucleotid unterscheiden.

Als Alternative zur Umwandlung von Profluorophoren durch Azidreduktion wurden zwei Linker entwickelt, die durch Azidreduktion gespalten werden (Abbildung 15.2).^[112,114] Im ersten Bericht wurde eine benzylische α -Azidoether-Verknüpfung verwendet, die durch Reduktion in einen Benzylalkohol und Aldehyd gespalten wird. Dieser Linker verband einen Quencher (Dabsyl) mit einem Fluorescein-markierten DNA-Strang und wurde in einer Templatreaktion mit einem zweiten DNA-Strang, der mit Triphenylphosphan derivatisiert war, effizient gespalten. Die Reaktion war hinsichtlich Geschwindigkeit und Turnover vergleichbar mit den oben besprochenen Reaktionen, die Azid-basierte Profluorophore verwenden. Durch Einbau eines zweiten Fluorophors (TAMRA), der mit Fluorescein einen FRET ergab, war die Entwicklung eines Zwei-Farben-Detektionssystems möglich, das eingesetzt wurde, um zwei Bakterienstämme auf Grundlage ihrer rRNA-Sequenz zu unterscheiden, wie bereits mittels Quencher-Verdrängungs-Ligations-Chemie gezeigt wurde (Abbildung 6.1).^[76] Diese Methode wurde auch genutzt, um das Produkt einer Rolling-Circle-PCR zu ermitteln, was wiederum durch miRNA-gestützte nucleophile Cyclisierung einer linearen Sonde mit einem 5'-I- und einem 3'-OPO₂S[−]-Rest ermöglicht wurde.^[79] Nach dieser Methode konnte auch dsDNA unter Verwendung von Sequenzen eines Polypurin-Pyrimidin-Duplex, die bekanntermaßen an Triplex-Strukturen beteiligt sind, detektiert werden.^[115] Eine Einschränkung bei der benzylischen α -Azidoether-Verknüpfung besteht darin, dass eine verlängerte Inkubation im Puffer zu partieller Hydrolyse führt, besonders bei >50 °C. Ein Weiterentwicklung dieser Methode war die Verwendung von DNA-Sonden, die mit zwei Azid-gebundenen Quenchern derivatisiert waren. Für diesen Ansatz waren zwei aufeinanderfolgende Templatreaktionen erforderlich, um Fluorophor und Quencher zu trennen; dies verbesserte das Signal/Rausch-Verhältnis und die Sequenzspezifität der Reaktion auf die Werte, die mithilfe von Verdrängungsreaktionen erreicht wurden (Abbildung 8).^[116] Unter Verwendung

eines Fluorophors mit rotverschobener Emission (Quasar 670), der im nahen Infrarot emittiert, zusammen mit einem Black-hole-Quencher (BHQ), wurde parallel dazu eine >200-fache Steigerung des Signal/Rausch-Verhältnisses erzielt.^[117] Die Nützlichkeit dieser neuen Fluorophor/Quencher-Paarung wurde durch Abbildung von rRNA in Bakterien demonstriert.

Die zweite Strategie zur Kombination von Azidreduktion und Linkerspaltung besteht in der 1,6-Eliminierung eines 4-Azidobenzylcarbonats

oder -carbamats (Abbildung 15.2), die zur Freisetzung eines Alkohols, Phenols, Amins oder Anilins führte.^[112] Damit konnte durch Templat-gestützte Azidreduktion eine breite Vielfalt an kleinen Molekülen mit unterschiedlicher Funktion, wie Estradiol (ein Transkriptionsfaktor-Agonist), Doxorubicin (ein Zellgift) und Rhodamin (ein Fluorophor) freigesetzt werden. In allen Fällen wurde die biologische oder fluorogene Funktion der Moleküle durch einen Carbonat- oder Carbamatlinker gehindert. Die Spaltung der Linker verlief schnell ($t_{1/2} < 21$ min), und nach 30 min Inkubation mit 50% Templat wurde eine annähernd quantitative Templat-vermittelte Freisetzung des Estradiols nachgewiesen.

Trotz der beeindruckenden Erfolge der Templatchemie mithilfe der Staudinger-Reaktion ist die Reaktion infolge der Oxidationsneigung des Phosphans begrenzt – besonders bei den benötigten Verdünnungen, bei denen kleine Mengen an gelöstem Sauerstoff maßgeblich sind. In der Praxis wurde das Problem umgangen, indem ein Überschuss an Phosphankonjugaten eingesetzt wurde. Der Nachweis, dass die Templat-gestützte Azidreduktion katalytisch mithilfe einer Ruthenium-photokatalysierten Reduktion durchgeführt werden kann, bietet eine vielversprechende Alternative (Abbildung 11.10).^[124] Anders als die Templat-gestützte Staudinger-Reaktion lief diese Reaktion mit lediglich 2% an Rutheniumsonde und Templat ab und ergab für die Spaltung des Azid-basierten Linkers oder die Reduktion des Azidocumamins ähnliche Reaktionsgeschwindigkeiten (Abbildung 15.2). Da die Reaktion durch Photoanregung der Rutheniumsonde aktiviert wird, sind eine zeitliche Steuerung der Reaktion sowie die Mischung beider Sonden in hohen Konzentrationen ohne Hintergrundreaktion möglich. Kürzlich wurde diese Reaktion in einem konzeptionell ähnlichen Aufbau zum Nachweis von Proteinoligomeren eingesetzt.^[136] Dazu wurden Liganden, die auf oligomere Proteine abzielen, mit dem immobilisierten Linker und Rutheniumreagens derivatisiert und in Reaktionsreichweite der Proteinbindung gebracht. Die Reaktion konnte zum Nachweis von Proteinoligomeren in Zellen verwendet werden.

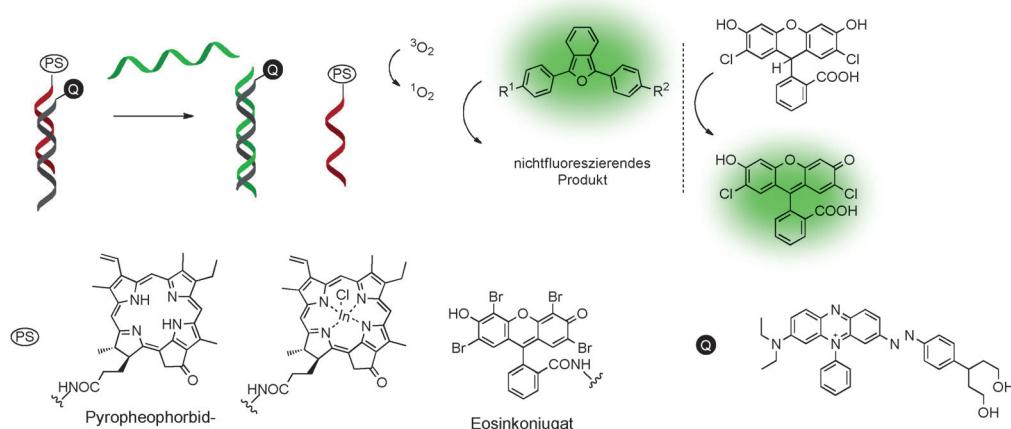


Abbildung 16. DNA-kontrollierte Bildung von Singuletsauerstoff. PS = Photosensibilisator, Q = Quencher.

4.8. Anwendung der Templat-gestützten $^1\text{O}_2$ -Bildung und Photoentschützung

Die Arbeitsgruppen von Gothelf und Mokhir untersuchten die Nucleinsäure-kontrollierte Bildung von $^1\text{O}_2$. Die erste Arbeit nutzte einen $^1\text{O}_2$ -Sensibilisator (Pyropheophorbid), der durch einen BHQ-derivatisierten komplementären Strang gequenched wurde (Abbildung 16). In Gegenwart eines DNA-Analyten wurde der Sensibilisator freigesetzt und

konnte die Bildung von $^1\text{O}_2$ photokatalysieren.^[137] Das allgemeine Konzept hat mögliche Anwendungen für therapeutische und bildgebende Agentien. Die Zytotoxizität von $^1\text{O}_2$ wird in der photodynamischen Therapie genutzt. Die beschriebene Methode könnte diese Therapieform auf Zellen mit einer bestimmten Nucleinsäuresequenz beschränken. Dies wurde in einer Machbarkeitsstudie demonstriert, in deren Rahmen auf rRNA gerichtete Nucleinsäuresonden in durch SLO permeabilisierte Zellen eingeführt wurden. Bei dieser Studie wurde ein stabilerer, Indium-basierter Sensibilisator verwendet, und die Bildung von $^1\text{O}_2$ wurde mit einem fluoreszierenden Scavenger sichtbar gemacht.^[128] In-vitro-Experimente zeigten eine >6000-fache Konzentration von $^1\text{O}_2$ relativ zum Sensibilisator. Eine kurze Inkubationszeit (>30 min) veranlasste rRNA-gerichtete Sonden zur Bildung von $^1\text{O}_2$, eine randomisierte Sequenz tat dies nicht. Dennoch führte die metabolische Instabilität der Sonden bei längerer Inkubationszeit zu unterschiedsloser $^1\text{O}_2$ -Bildung. Später wurde beschrieben, dass auch Eosinkonjugate als Sensibilisator für die Bildung von $^1\text{O}_2$ geeignet waren, das wiederum Dichlorfluorecin zu seinem fluoreszierenden Produkt oxidierte (Dichlorfluorescein).^[138] Da dieses Produkt die Oxidation seiner Vorstufe photokatalysieren kann, hat die Reaktion das Potenzial zur Autokatalyse.

Über die Nucleinsäure-Erkennung hinaus bietet die Programmierbarkeit der Hybridisierung eine einzigartige Plattform für die Entwicklung dynamischer Systeme mit besonderem Verhalten. Strangverdrängungsstrategien wurden umfassend zur Entwicklung von Logikgatter-Operationen genutzt. Die Templat-gestützte Photofreisetzungreaktion

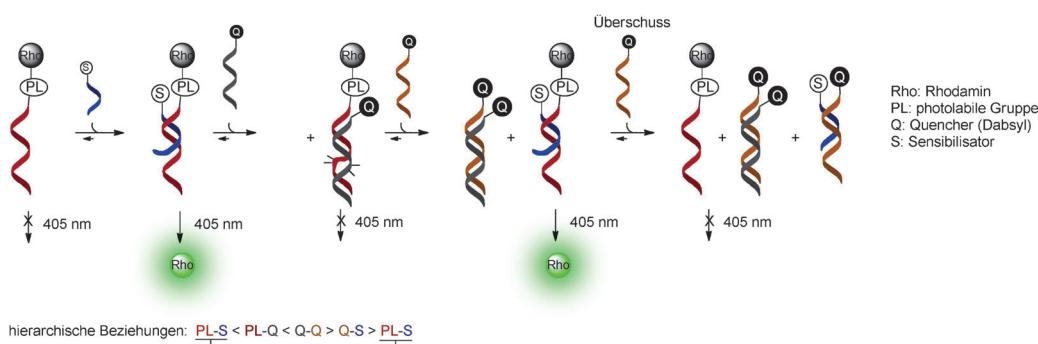


Abbildung 17. Anwendung der Templat-gestützten Photospaltung in dynamischen Systemen mit nichtlinearer Reaktion. (siehe Abbildung 11.11 für chemische Strukturen).

(Abbildung 11.11) wurde verwendet, um das Verhalten eines Systems mit mehreren Komponenten, die um gegenseitige Wechselwirkungen konkurrieren, zu untersuchen (Abbildung 17).^[125] Ein System, das aus bis zu vier Komponenten mit einer vordefinierten hierarchischen Wechselwirkung besteht, wurde mit profluoreszierendem Rhodamin als Anzeige erforscht. Alleine eingesetzt erzielten die ersten beiden Komponenten (der photolabile und der Sensibilisatorstrang) ein positives Ergebnis. Die Zugabe einer dritten Komponente (ein Quencherstrang) mit höherer Affinität zum photolabilen Strang als zum Sensibilisator beendet die Photospaltung. Durch Zugabe des vierten Strangs, der vollständig komplementär zum dritten Strang ist, wird der Quencher entfernt und Photospaltung wieder ermöglicht. Jedoch verdrängt ein Überschuss dieses vierten Strangs den Sensibilisator von seiner Wechselwirkung mit dem photolabilen Strang und beendet die Reaktion. Insgesamt reagiert das System erst positiv und anschließend negativ auf die Zugabe des vierten Strangs. Dieses einzigartige Verhalten macht es für vier verschiedene Logikoperationen geeignet: AND, NOT, XNOR und NOR.

5. Übersetzung von DNA in ein nichtnatürliches Polymer

Der bemerkenswerte Erfolg von In-vitro-Selektionsmethoden wie Phagendisplay^[139] und SELEX^[140] beruht auf der Nutzung iterativer Selektions- und Amplifikationszyklen. Bis vor einiger Zeit war dieser Ansatz wegen fehlender Methoden zur Vervielfältigung synthetischer Polymere auf Biopolymere beschränkt. Liu et al. entwickelten zwei komplementäre Strategien zur Lösung dieses Problems: eine DNA-gestützte Kondensation von PNA-Fragmenten durch reduktive Aminierung^[141–143] und DNA-gestützte Auffüllung der Basen des PNA-Rückgrats durch Acylierung oder reduktive Aminierung^[144] (Abbildung 18.1 und 2).

Der erste Ansatz baut auf der Pionierarbeit von Lynn et al. zur Templat-gestützten reduktiven Aminierung auf,^[6, 145] um tetramere und pentamere PNA-Aldehyd-Bausteine, die eine oder mehrere Seitenketten an verschiedenen Positionen innerhalb des Bausteins enthalten, zu kondensieren. Die einleitende Iminkondensation ist hochreversibel und sollte die Anordnung des völlig komplementären synthetischen

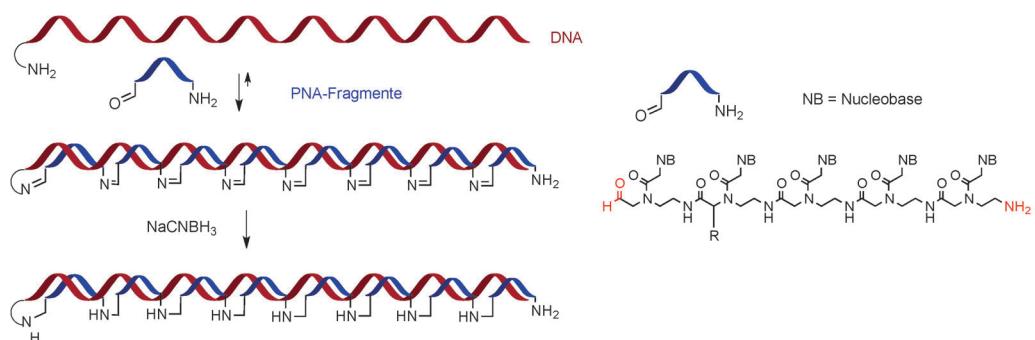
Oligomers vorantreiben, das nachfolgend reduziert wird, um die Sequenz zu schließen (Abbildung 18.1). Auf diese Weise wurde eine 40-mere PNA, in der 24 PNA-Nukleotide Modifikationen der Seitenketten aufwiesen, in einer Gesamtausbeute von 66–90% gebildet.^[141] Dies ist das erste Beispiel einer nichtenzymatischen

Translation einer Nukleinsäuresequenz in ein mit verschiedenen Seitenketten funktionalisiertes, synthetisches Polymer und erhöht die Möglichkeit, durch Selektions- und Amplifikationszyklen synthetische Polymere mit funktionalen Eigenschaften zu entdecken. Um die Realisierbarkeit dieses Ansatzes zu belegen, wurden 4.3×10^8 DNA-Template in ihre synthetischen Polymere übersetzt und von ihrem Templat abgelöst, damit die synthetischen Polymere einzelne Sekundär- und Tertiärstrukturen bilden konnten; die Polymere wurden anschließend für Streptavidinbindung selektiert. Der Zyklus wurde sechsmal wiederholt und ergab eine 10^6 -fache Anreicherung eines Templat, das für eine biotinylierte PNA codiert.^[142]

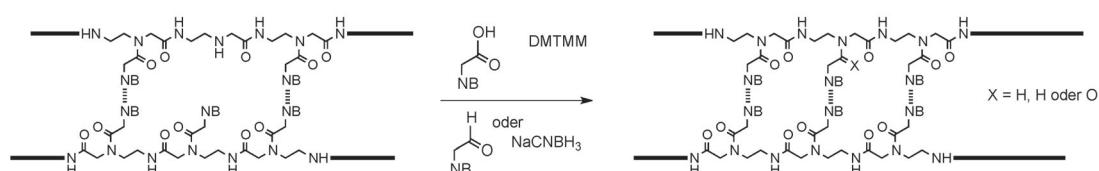
Der zweite, von Liu et al. entwickelte Ansatz beruhte auf dem Auffüllen von Basen. In Pilotstudien wurden PNA-Duplex mit ein bis zwei abasischen Stellen mit den vier Nukleobasen-Aldehyden oder aktivierten Säuren unter reduktiven Aminierungsbedingungen bzw. DMTMM (Carbonsäure-Aktivierung) inkubiert (Abbildung 18.2).^[144] Die reduktive Aminierung einer einzelnen abasischen Stelle ergab eine höhere Ausbeute ($> 87\%$) und Selektivität ($> 7:1$) für die komplementäre Nukleobase. Mehrere oder einzelne abasische Stellen an den Sequenzrändern lieferten geringere Ausbeuten und Spezifität. Die höhere Effizienz der reduktiven Aminierung gegenüber jener der Acylierung mag durch die vorteilhafte, reversible Bildung einer Iminiumzwischenstufe bedingt sein, im Unterschied zur ungünstigen sterischen Verdichtung des aktivierten Esters bei der Acylierungsreaktion.

Ghadiri et al. beschrieben gleichzeitig eine alternative Strategie zur Basenauffüllung über eine Thiomesterung von Thioester-PNA (tPNA; Abbildung 18.3).^[146] Die tPNA ordnete sich effizient selbst durch eine reversible, kovalente Verankerung am Oligo(dipeptid)-Rückgrat an und ging als Reaktion auf wechselnde Template dynamische Sequenzmodifizierungen ein. Dieses neuartige PNA-Oligomer paart sich selbst mit seiner komplementären Sequenz sowie gekreuzt mit DNA und RNA durch Watson-Crick-Hybridisierung. Es wurde gezeigt, dass ein pentameres tPNA-Rückgrat durch Thiomesterung mit Adenin in Gegenwart von polyT in 89% Ausbeute und mit > 8 -facher Selektivität für die Adenin-Nukleobase acyliert wurde. Zudem passte sich eine tPNA mit gegebener Sequenz in Gegenwart eines komplementären DNA-Templats zu einer neuen Sequenz an. Die tPNA kom-

1. Übersetzung von DNA in ein synthetisches PNA-Polymer mit funktionalisierten Seitenketten



2. Templat-gestützte Synthese von PNA über Basenauffüllung



3. Adaptive Templat-gestützte Synthese von PNA durch reversible Basenauffüllung

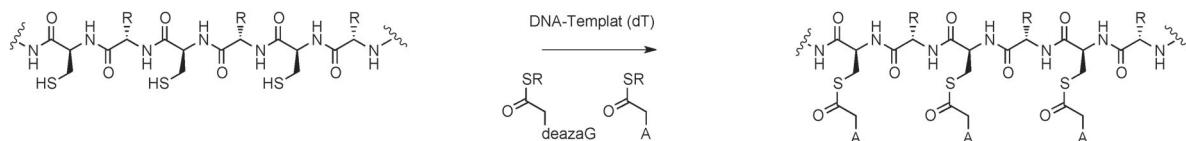


Abbildung 18. Übersetzung von DNA und PNA in synthetische Polymere.

biniert die Basenpaarwechselwirkungen von Oligonukleinsäuren mit den Seitenkettenfunktionalitäten von Peptiden und Proteinen. Ein Nachweis der Fähigkeit, mehrere Replikationszyklen zu durchlaufen, ohne die Sequenzintegrität der tPNA-Oligomere zu beeinträchtigen, erfolgte jedoch nicht.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Im letzten Jahrzehnt wurden viele Oligonukleotid-gestützte Reaktionen beschrieben. Dieses wachsende Repertoire hat die Entwicklung effizienter Anwendungen zur Übersetzung von Nucleinsäureinformationen in diverse Sammlungen kleiner Moleküle, synthetischer Oligomere und funktionaler Nanomaterialien oder zur Freisetzung von Fluorophoren oder bioaktiven Molekülen ermöglicht. Im letztgenannten Fall wurde gezeigt, dass zelluläre Nucleinsäuren (rRNA, mRNA oder miRNA) verwendet werden können, um Reaktionen in lebenden oder intakten Zellen an einem Templat ablaufen zu lassen. Weiterhin liefern einige Reaktionen verlässlich Informationen über Sekundärstrukturen wie G-Quadruplexe, Haarnadelstrukturen oder Lasso-Verzweigungen. Die letzten fünf Jahre waren von der Entwicklung etlicher neuer Systeme geprägt, die Templat-gestützte Transformationen anstatt Templat-gestützter Ligationen nutzen und den Templat-Turnover stark erleichtern. Die mit dem Templat-Turnover einhergehende Amplifizierung

war für die Nucleinsäure-Erkennung besonders nützlich. Zur gleichen Zeit wurden zwei Systeme entwickelt, die reversibel auf Nucleinsäuretemplate reagieren und neue Möglichkeiten für dynamische Antworten bieten. Zudem wurden über Templatreaktionen Nucleinsäureverknüpfungen zugänglich gemacht, die mit den enzymatischen Reaktionen der Molekularbiologie nicht möglich wären. Diese neuartigen Verknüpfungsstellen könnten die Grenzen der DNA-basierten Nanotechnologie erweitern. Auch wenn alle diese Reaktionen geplant wurden, um auf ein Nucleinsäuretemplat zu reagieren, wurden nun mehrere Reaktionen beschrieben, die einen zweiten Auslöser wie Oxidation oder Licht benötigen. Diese Reaktionen wurden ebenfalls genutzt, um Netzwerke mit einzigartigen Verhaltensweisen als Antwort auf wechselnde Nucleinsäuresignale zu gestalten. Zweifelsohne werden diese Entwicklungen neue Anwendungen inspirieren. Zwar bieten Nucleinsäuren eine vielversprechende Plattform für die Entwicklung solcher Reaktionen, doch ist klar, dass die durch Nucleinsäure-gestützte, supramolekulare Anordnungen erreichte, hohe effektive Konzentration in andere supramolekulare Systemen eingeführt werden wird.

7. Addendum (21. Mai 2013)

Seit der Einreichung dieses Aufsatzes sind die folgenden wichtigen Beiträge veröffentlicht worden:

1. Die Templat-gestützte Reduktion von Azidorhodamin (Abbildung 15.1) wurde dazu verwendet, das Spleißen von prä-mRNA in vitro zu detektieren.^[147]
2. In einer Erweiterung der Azid-basierten immolativen Linker aus Abschnitt 4.7 (Abbildung 15.2) verwendeten Shibata et al. eine Nucleinsäure-gestützte Reaktion zur Demaskierung der Funktion eines Moleküls, das Proteinexpression induziert.^[148]
3. Die Templat-gestützte Reduktion Azid-basierter immolativer Linker durch Photokatalyse mit Rutheniumkonjugaten (Abbildungen 11.10 und 15.2) gelang in lebenden Zellen; sie ergibt hohe Turnover (>4000) und ermöglicht so eine Detektion bis hinab zu 5 pm des Templat.^[149]
4. Polylysin-Polydextran-Copolymere vom Kammtyp erhöhen den Turnover bei Templat-gestütztem NCL-Fluorophortransfer (Abbildung 12).^[150]
5. Ein ¹O₂-Sensibilisator (Abbildung 11.12) wurde dazu verwendet, einen Linker auf Templat-gestützte Weise zu spalten und so einen Fluoreszenzfarbstoff freizusetzen.^[151]
6. Templat-gestützter NCL-Fluorophortransfer (Abbildung 12) ist möglich mit dsDNA, die durch PCR erhalten wurde.^[152]
7. Enzymfreie Translation von DNA in diverse synthetische Polymere von bis zu 26 kDa wurde erreicht.^[153]
8. Templat-gestützte Reduktion von Azidorhodamin (Abbildung 15.1) gelang mithilfe von homo-DNA.^[154]

8. Abkürzungen

Bodipy	4,4-Difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen
Bpy	2,2-Bipyridin
CuAAC	Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cyclo-addition
Dabsyl	Dimethylaminoazobenzolsulfonamid
DMTMM	4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholiniumchlorid
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTS	DNA-gestützte Synthese
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunassay
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
LED	Leuchtdiode
PNA	Peptidnucleinsäure
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NCL	native chemische Ligation
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NPPOC	2-(2-Nitrophenyl)propyloxycarbonyl
PAGE	Polyacrylamid-Gelektrophorese
Phen	Phenanthrolin
SLO	Streptolysin O
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
ssDNA	einzelsträngige DNA
TAMRA	Tetramethylrhodamin

Wir danken allen Mitarbeitern, die zu unserer Arbeit im Bereich der programmierten Anordnungen und Templatreaktionen beigetragen haben; Dank gilt auch den Förderinstitutionen (HFSP, ERC, FRC, IUF). K.G. dankt dem Boehringer Ingel-

heim Fonds für ein Forschungsstipendium. Dieser Aufsatz soll nicht umfassend sein, vielmehr soll er neueste Arbeiten hervorheben; für Auslassungen bitten wir daher um Verständnis.

Eingegangen am 20. Oktober 2012
Online veröffentlicht am 12. Juni 2013
Übersetzt von Dr. Margit Knauer, Bensheim

- [1] L. E. Orgel, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *39*, 99–123.
- [2] R. Naylor, P. T. Gilham, *Biochemistry* **1966**, *5*, 2722–2728.
- [3] L. E. Orgel, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 109–118.
- [4] C. Böhler, P. E. Nielsen, L. E. Orgel, *Nature* **1995**, *376*, 578–581.
- [5] M. K. Herrlein, J. S. Nelson, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10151–10152.
- [6] J. T. Goodwin, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9197–9198.
- [7] Z. Y. J. Zhan, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12420–12421.
- [8] R. K. Bruick, P. E. Dawson, S. B. Kent, N. Usman, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 49–56.
- [9] W. M. Shih, J. D. Quispe, G. F. Joyce, *Nature* **2004**, *427*, 618–621.
- [10] J. H. Chen, N. C. Seeman, *Nature* **1991**, *350*, 631–633.
- [11] N. C. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427–431.
- [12] E. S. Andersen, M. Dong, M. M. Nielsen, K. Jahn, R. Subramani, W. Mamoudou, M. M. Golas, B. Sander, H. Stark, C. L. P. Oliveira, J. S. Pedersen, V. Birkedal, F. Besenbacher, K. V. Gothelf, J. Kjems, *Nature* **2009**, *459*, 73–76.
- [13] P. W. K. Rothemund, *Nature* **2006**, *440*, 297–302.
- [14] X. Y. Li, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4956–4979; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4848–4870.
- [15] R. E. Kleiner, C. E. Dumelin, D. R. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5707–5717.
- [16] A. P. Silverman, E. T. Kool, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3775–3789.
- [17] D. M. Kolpashchikov, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 4709–4723.
- [18] A. Shibata, H. Abe, Y. Ito, *Molecules* **2012**, *17*, 2446–2463.
- [19] Z. J. Gartner, M. W. Kanan, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10304–10306.
- [20] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566–568.
- [21] K. L. Buchmueller, B. T. Hill, M. S. Platz, K. M. Weeks, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10850–10861.
- [22] J. Ofengand, I. Schwartz, G. Chinali, S. S. Hixson, S. H. Hixson, *Methods Enzymol.* **1977**, *46*, 683–702.
- [23] T. Ami, K. Ito, Y. Yoshimura, K. Fujimoto, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2583–2586.
- [24] Y. Yoshimura, T. Ohtake, H. Okada, K. Fujimoto, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2009**, *53*, 197–198.
- [25] Y. Yoshimura, T. Ohtake, H. Okada, K. Fujimoto, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1473–1476.
- [26] X. Peng, M. M. Greenberg, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, e31.
- [27] X. Peng, I. S. Hong, H. Li, M. M. Seidman, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10299–10306.
- [28] J. Q. Liu, J. S. Taylor, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3300–3304.
- [29] K. Fujimoto, S. Matsuda, N. Takashi, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5646–5647.
- [30] S. Ogasawara, K. Fujimoto, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4624–4627; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4512–4515.
- [31] S. Ogasawara, K. Fujimoto, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2006**, *50*, 173–174.
- [32] Y. Yoshimura, Y. Noguchi, H. Sato, K. Fujimoto, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 598–601.
- [33] Y. Yoshimura, H. Okada, T. Ohtake, T. Tsukaguchi, K. Fujimoto, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2009**, *53*, 199–200.

- [34] T. Ami, G. Ozaki, Y. Yoshimura, K. Fujimoto, *Chem. Lett.* **2008**, 37, 134.
- [35] S. Nakamura, S. Ogasawara, S. Matuda, I. Saito, K. Fujimoto, *Molecules* **2012**, 17, 163–178.
- [36] K. Fujimoto, H. Yoshino, T. Ami, Y. Yoshimura, I. Saito, *Org. Lett.* **2008**, 10, 397–400.
- [37] M. Mukae, M. Tabara, P. Arslan, T. Ihara, A. Jyo, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2007**, 51, 287–288.
- [38] P. Arslan, T. Ihara, M. Mukae, A. Jyo, *Anal. Sci.* **2008**, 24, 173–176.
- [39] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discovery Today* **2003**, 8, 1128–1137.
- [40] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596–2599.
- [41] M. Meldal, C. W. Tornoe, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2952–3015.
- [42] C. W. Tornoe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057–3064.
- [43] D. Chouikhi, S. Barluenga, N. Winssinger, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5476–5478.
- [44] X. Peng, H. Li, M. M. Seidman, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2010, 4194–4197.
- [45] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046–15047.
- [46] M. Shelbourne, X. Chen, T. Brown, A. H. El-Sagheer, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 6257–6259.
- [47] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1388–1405.
- [48] E. Jentsch, A. Mokhir, *Inorg. Chem.* **2009**, 48, 9593–9595.
- [49] M. F. Jacobsen, J. B. Ravnsbaek, K. V. Gothelf, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 50–52.
- [50] R. Kumar, A. El-Sagheer, J. Tumpane, P. Lincoln, L. M. Wilhelmsson, T. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6859–6864.
- [51] H. Liu, T. Torring, M. Dong, C. B. Rosen, F. Besenbacher, K. V. Gothelf, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 18054–18056.
- [52] Y. Xu, Y. Suzuki, M. Komiya, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 3331–3334; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 3281–3284.
- [53] Y. Xu, N. B. Karalkar, E. T. Kool, *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 148–152.
- [54] G. P. Miller, A. P. Silverman, E. T. Kool, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 56–64.
- [55] J. L. Czapinski, T. L. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 8618–8619.
- [56] K. V. Gothelf, A. Thomsen, M. Nielsen, E. Clo, R. S. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1044–1046.
- [57] S. Ficht, A. Mattes, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9970–9981.
- [58] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clarklewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, 266, 776–779.
- [59] S. Ficht, C. Dose, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, 6, 2098–2103.
- [60] C. Dose, S. Ficht, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 5495–5499; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5369–5373.
- [61] C. Dose, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 65–77.
- [62] Y. Huang, J. M. Coull, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 3238–3239.
- [63] K. Meguellati, G. Koripelly, S. Ladame, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 2798–2802; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 2738–2742.
- [64] Y. Liu, R. Sha, R. Wang, L. Ding, J. W. Canary, N. C. Seeman, *Tetrahedron* **2008**, 64, 8417–8422.
- [65] A. R. Martin, I. Barvik, D. Luvino, M. Smietana, J. J. Vasseur, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 4279–4282; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 4193–4196.
- [66] J. M. Lehn, *Science* **2002**, 295, 2400–2403.
- [67] A. H. El-Sagheer, V. V. Cheong, T. Brown, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 232–235.
- [68] Z. J. Gartner, M. W. Kanan, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1874–1878; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1796–1800.
- [69] D. K. Prusty, A. Herrmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 12197–12199.
- [70] D. K. Prusty, M. Kwak, J. Wildeman, A. Herrmann, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 12604–12608; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 11894–11898.
- [71] C. S. Andersen, H. Yan, K. V. Gothelf, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 5651–5654; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 5569–5572.
- [72] Y. Z. Xu, E. T. Kool, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 875–881.
- [73] S. Sando, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2096–2097.
- [74] S. Sando, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9686–9687.
- [75] H. Abe, E. T. Kool, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 263–268.
- [76] A. P. Silverman, E. J. Baron, E. T. Kool, *ChemBioChem* **2006**, 7, 1890–1894.
- [77] D. J. Kleinbaum, G. P. Miller, E. T. Kool, *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 1115–1120.
- [78] D. J. Kleinbaum, E. T. Kool, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 8154–8156.
- [79] E. M. Harcourt, E. T. Kool, *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40, 65.
- [80] G. Koripelly, K. Meguellati, S. Ladame, *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 2103–2109.
- [81] R. M. Wadkins, *Curr. Med. Chem.* **2000**, 7, 1–15.
- [82] T. N. Grossmann, A. Strohbach, O. Seitz, *ChemBioChem* **2008**, 9, 2185–2192.
- [83] M. K. Herrlein, R. L. Letsinger, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 5076–5078.
- [84] 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.
- [85] M. Mukae, T. Ihara, M. Tabara, P. Arslan, A. Jyo, *Supramol. Chem.* **2009**, 21, 292–295.
- [86] M. Nilsson, G. Barbany, D. O. Antson, K. Gertow, U. Landegren, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 791–793.
- [87] Z. Ma, J. S. Taylor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 11159–11163.
- [88] Z. Ma, J. S. Taylor, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2501–2510.
- [89] J. Brunner, A. Mokhir, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12410–12411.
- [90] I. Boll, R. Krämer, J. Brunner, A. Mokhir, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7849–7856.
- [91] I. Boll, E. Jentsch, R. Krämer, A. Mokhir, *Chem. Commun.* **2006**, 3447–3449.
- [92] J. Kovács, A. Mokhir, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 5722–5724.
- [93] T. N. Grossmann, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 15596–15597.
- [94] M. L. McKee, A. C. Evans, S. R. Gerrard, R. K. O'Reilly, A. J. Turberfield, E. Stulz, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 1661–1666.
- [95] Y. He, D. R. Liu, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, 5, 778–782.
- [96] Y. He, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 9972–9975.
- [97] Z. J. Gartner, B. N. Tse, R. Grubina, J. B. Doyon, T. M. Snyder, D. R. Liu, *Science* **2004**, 305, 1601–1605.
- [98] B. N. Tse, T. M. Snyder, Y. Shen, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 15611–15626.
- [99] M. L. McKee, P. J. Milnes, J. Bath, E. Stulz, A. J. Turberfield, R. K. O'Reilly, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 8120–8123; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 7948–7951.
- [100] M. L. McKee, P. J. Milnes, J. Bath, E. Stulz, R. K. O'Reilly, A. J. Turberfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 1446–1449.
- [101] P. J. Milnes, M. L. McKee, J. Bath, L. J. Song, E. Stulz, A. J. Turberfield, R. K. O'Reilly, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 5614–5616.
- [102] X. H. Chen, A. Roloff, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 4556–4561; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 4479–4483.
- [103] Z. Tang, A. Marx, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 7436–7439; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 7297–7300.

- [104] A. Shibata, H. Abe, M. Ito, Y. Kondo, S. Shimizu, K. Aikawa, Y. Ito, *Chem. Commun.* **2009**, 6586–6588.
- [105] R. M. Franzini, E. T. Kool, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2935–2938.
- [106] K. Onizuka, Y. Taniguchi, S. Sasaki, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 799–803.
- [107] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108–7133; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.
- [108] J. F. Cai, X. X. Li, X. Yue, J. S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16324–16325.
- [109] Z. L. Pianowski, N. Winssinger, *Chem. Commun.* **2007**, 3820–3822.
- [110] Z. Pianowski, K. Gorska, L. Oswald, C. A. Merten, N. Winssinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6492–6497.
- [111] K. Gorska, I. Keklikoglou, U. Tschulena, N. Winssinger, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1969–1975.
- [112] K. Gorska, A. Manicardi, S. Barluenga, N. Winssinger, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4364–4366.
- [113] R. M. Franzini, E. T. Kool, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2981–2988.
- [114] R. M. Franzini, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16021–16023.
- [115] H. Li, R. M. Franzini, C. Bruner, E. T. Kool, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2132–2137.
- [116] R. M. Franzini, E. T. Kool, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2168–2175.
- [117] R. M. Franzini, E. T. Kool, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1869–1877.
- [118] H. Abe, J. Wang, K. Furukawa, K. Oki, M. Uda, S. Tsuneda, Y. Ito, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1219–1226.
- [119] K. Furukawa, H. Abe, K. Hibino, Y. Sako, S. Tsuneda, Y. Ito, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1026–1036.
- [120] K. Furukawa, H. Abe, J. Wang, M. Uda, H. Koshino, S. Tsuneda, Y. Ito, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 671–677.
- [121] K. Furukawa, H. Abe, Y. Tamura, R. Yoshimoto, M. Yoshida, S. Tsuneda, Y. Ito, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 12226–12229; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12020–12023.
- [122] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, 287, 2007–2010.
- [123] Y. Chen, A. S. Kamlet, J. B. Steinman, D. R. Liu, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 146–153.
- [124] M. Röthlingshöfer, K. Gorska, N. Winssinger, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 482–485.
- [125] M. Röthlingshöfer, K. Gorska, N. Winssinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18110–18113.
- [126] A. Fülop, X. Peng, M. M. Greenberg, A. Mokhir, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5659–5661.
- [127] I. S. Hong, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10510–10511.
- [128] D. Arian, E. Clo, K. V. Gothelf, A. Mokhir, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 288–295.
- [129] M. F. Jacobsen, E. Clo, A. Mokhir, K. V. Gothelf, *ChemMed-Chem* **2007**, *2*, 793–799.
- [130] T. N. Grossmann, L. Roglin, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7228–7231; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7119–7122.
- [131] F. Altenbrunn, T. N. Grossmann, C. Haase, F. Mende, L. Roglin, S. Thurley, O. Seitz, *Pure Appl. Chem.* **2009**, *81*, 273–284.
- [132] T. N. Grossmann, O. Seitz, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 6723–6730.
- [133] A. Erben, T. N. Grossmann, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2880–2884; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2828–2832.
- [134] A. Erben, T. N. Grossmann, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4993.
- [135] A. Dragulescu-Andrasi, S. Rapireddy, G. He, B. Bhattacharya, J. J. Hyldig-Nielsen, G. Zon, D. H. Ly, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16104–16112.
- [136] K. K. Sadhu, T. Eierhoff, W. Romer, N. Winssinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20013–20016.
- [137] E. Cló, J. W. Snyder, N. V. Voigt, P. R. Ogilby, K. V. Gothelf, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4200–4201.
- [138] S. Dutta, A. Mokhir, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1243–1245.
- [139] G. P. Smith, *Science* **1985**, *228*, 1315–1317.
- [140] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505–510.
- [141] R. E. Kleiner, Y. Brudno, M. E. Birnbaum, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4646–4659.
- [142] Y. Brudno, M. E. Birnbaum, R. E. Kleiner, D. R. Liu, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 148–155.
- [143] D. M. Rosenbaum, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13924–13925.
- [144] J. M. Heemstra, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11347–11349.
- [145] X. Li, Z.-Y. J. Zhan, R. Knipe, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 746–747.
- [146] Y. Ura, J. M. Beierle, L. J. Leman, L. E. Orgel, M. R. Ghadiri, *Science* **2009**, *325*, 73–77.
- [147] Y. Tamura, K. Furukawa, R. Yoshimoto, Y. Kawai, M. Yoshida, S. Tsuneda, Y. Ito, H. Abe, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 7248–7251.
- [148] A. Shibata, Y. Ito, H. Abe, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 270–272.
- [149] K. K. Sadhu, N. Winssinger, *Chem. Eur. J.* **2013**, DOI: 10.1002/chem.201300060.
- [150] J. Michaelis, A. Maruyama, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 618–620.
- [151] S. Dutta, B. Flottmann, M. Heilemann, A. Mokhir, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 9664–9666.
- [152] A. Roloff, O. Seitz, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 432–436.
- [153] J. Niu, R. Hili, D. R. Liu, *Nat. Chem.* **2013**, DOI: 10.1038/NCHEM.1577.
- [154] M. Stoop, C. Désiron, C. Leumann, *Art. DNA PNA XNA* **2013**, *4*, 28–33.