

DNA mit 3'-5'-Disulfid-Verknüpfung – schnelle chemische Ligation durch isosteren Ersatz**

Volker Patzke,* John S. McCaskill und Günter von Kiedrowski

Abstract: Die Bemühungen, die chemische Ligation von Oligonukleotiden ohne biochemische Enzyme zu etablieren, haben zu einer Vielzahl an synthetischen Analoga geführt und damit die Oligomer-Ligation um neue Oligonukleotide, Peptide und Hybride, wie PNA, bereichert.^[1] Wichtigste Anforderungen an potenzielle PCR-freie Diagnosewerkzeuge sind eine schnelle templatierete chemische DNA-Ligation mit hoher Paarungselektivität, sowie eine empfindliche Detektionsmethode. Hier berichten wir über eine Oligonukleotid-Festphasensynthese von 5'- oder 3'-Mercapto-didesoxynukleotiden. Die chemische Ligation liefert 3'-5'-Disulfid-Bindungen anstelle der 3'-5'-Phosphordiester-Bindung. Unter Verwendung einer Fluoreszenzmethode beschreiben wir eine der schnellsten Ligationsreaktionen mit Halbwertszeiten in der Größenordnung von Sekunden. Durch die Wahl der DNA-Modifikation und der 3'-5'-Orientierung der Aktivierung wird die nicht templatierete Ligation effektiv unterdrückt. Der Temperatureinfluss auf die templatierete Ligation wird aufgezeigt.

Frühere Studien zu templatgesteuerten Reaktionen^[2] oder zur Selbstreplikation^[3] durch chemische Ligation^[4] basierten auf Phosphordiester-, Pyrophosphat- und Phosphoramidatbindungen durch Carbodiimid- oder Imidazolid-Aktivierungen. Die Phosphoramidat-Verknüpfung wurde zu schnellen und hocheffizienten templatierten Polymerisationssynthesen weiterentwickelt.^[5]

Einige chemische Autoligationsmethoden von Oligonukleotid zur Diagnostik basieren auf Phosphorthioat-Iodid oder -Tosylat,^[6] auf Diels-Alder- oder auf Klick-Reaktionen.^[7] Des Weiteren wurde eine Vielzahl von templatbasierten Nukleinsäure-Detektionsmethoden vorgestellt, basierend auf der Staudinger-Reaktion,^[8] der nativen chemischen Ligation,^[9] metallkatalysierten Reaktionen,^[10] photokatalysierten Reaktionen^[11] und nukleophilen aromatischen Substitutionen.^[12] Durch Templatierung sind Reaktionsbeschleunigungen bis zum 1000-fachen und Halbwertszeiten bis 90 s erzielt worden.^[13]

Thiol-Modifikationen sind in der Oligonukleotid(ON)-Synthese weit verbreitet. Thiol-Modifikatoren sind kommerziell erhältlich und werden routinemäßig zur Immobilisierung von DNA auf Gold-Oberflächen^[14] oder auf thiolierten Festphasen^[15] verwendet. Die Vernetzung thiolmodifizierter Nukleobasen als Disulfide ermöglicht die kovalente Verknüpfung von DNA-Doppelsträngen.^[16] Eine disulfidbasierte Templatligation wurde mit Phosphorthioaten als funktionelle Gruppe berichtet.^[17] Diese Systeme zeigten signifikante Nebenreaktionen durch nicht templatierete Reaktionswege. Schon 1985 wurde eine Ligation durch 3'-5'-Disulfid-Verknüpfung von Schwartz und Orgel vorgeschlagen.^[18] Witch und Cosstick synthetisierten Dithymidin-Bausteine mit 3'-5'-Disulfid-Verknüpfungen mit dem Ziel, diese als neue Klasse von Antisense-ONs zu verwenden.^[19]

Ein Computermodell legte nahe, dass der Austausch der Phosphordiester-Brücke durch eine 3'-5'-Disulfid-Bindung mit einem favorisierten Diederwinkel von 90° nur eine geringfügige konformative Störung der B-DNA bewirken sollte (Abbildung 1). Die Thiol-Disulfid-Austauschreaktion zur Bindungsbildung des 3'-5'-Disulfides erschien uns aufgrund der Schnelligkeit und Selektivität sowie aufgrund der Steuerbarkeit durch Redoxkontrolle und pH-Abhängigkeit attraktiv. Die strukturelle Ähnlichkeit zur natürlichen Phosphordiester-Bindung sollte den templatgesteuerten Reaktionsweg verstärken, während bei der Verwendung von langen, flexiblen Verknüpfungsstellen erhöhte Umsatzgeschwindigkeiten beobachtet wurden.^[6b]

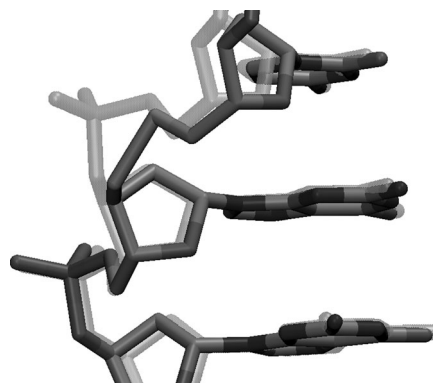


Abbildung 1. Überlagerte Darstellung zweier geometrisch optimierter Modelle für B-DNA (Berechnung: semiempirisch, PM3; Gegenstrang entfernt): Eines enthält eine 3'-5'-Phosphordiester-Bindung, das andere eine 3'-5'-Disulfid-Verknüpfung. Der C(3')-S-S-C(5')-Diederwinkel ist nah am Optimum von 90°.

[*] Dr. V. Patzke, Prof. Dr. G. von Kiedrowski

Lehrstuhl für Bioorganische Chemie

Ruhr-Universität Bochum

44780 Bochum (Deutschland)

E-Mail: volker.patzke@rub.de

Prof. Dr. J. S. McCaskill

BioMIP: Microsystems Chemistry and BioIT

Ruhr-Universität Bochum

44780 Bochum (Deutschland)

[**] Diese Forschungsarbeiten wurden von der Europäischen Gemeinschaft (Siebtes Rahmenprogramm; FP7/2007-2013) unter der Fördernummer 222422 („ECCell—Electronic Chemical Cell“, ein Projekt der EU FP7-IST-FET Open Initiative) unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201310644> zu finden.

In früheren Replikationsstudien von Phosphoramidaten wurde das CG-Strukturmotiv aufgrund der Basenstapelung als effektivste Lignationsstelle identifiziert.^[20] Wir haben die DMT- und basengeschützten Thiol-Desoxynukleoside 5'-HS-dC- und 3'-HS-dG- synthetisiert und als Disulfide auf einer thiolierten CPG-Festphase immobilisiert. Die Thiol-ON wurden mit den entsprechenden 3'- und 5'-Phosphoramiditen an den in Abbildung 2 dargestellten Festphasen synthetisiert (siehe die Hintergrundinformationen). Der Einsatz der Festphasen ermöglicht die Verwendung standardisierter Syntheseprotokolle.

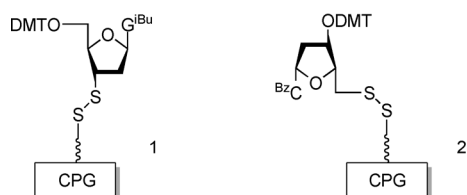
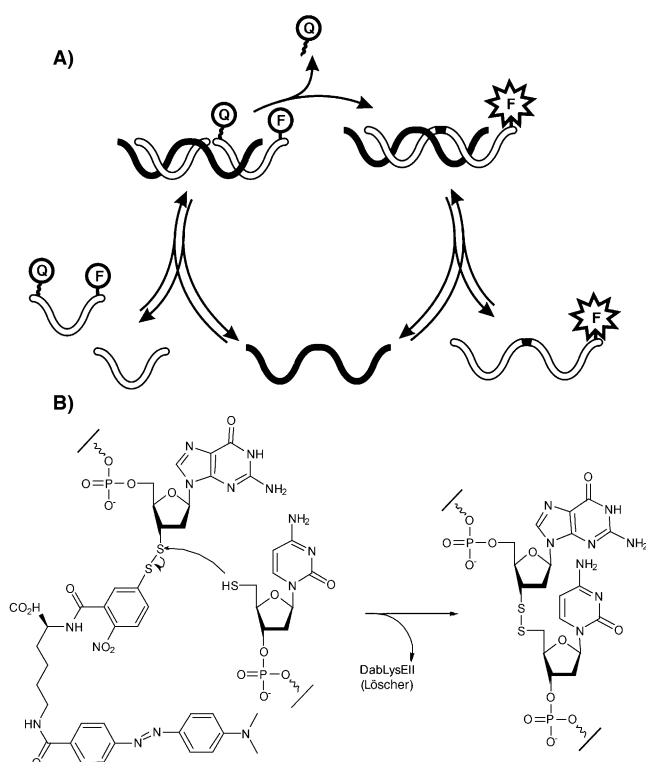


Abbildung 2. Strukturen der Festphasen zur Synthese von 5'- und 3'-Thiololigonukleotiden (Details in den Hintergrundinformationen; DMT: Dimethoxytrityl, ⁱBuG: N2-Isobutyrylguanin, ^{Bz}C: N4-Benzoylcytosin).

Zur Aktivierung eines Vorstufenbausteins als gemischtes Disulfid wurde Ellmans Reagens gewählt. Über die Carboxylgruppe des Reagenzes gelang die Einführung einer gezielten Modifikation, einer Dabcy-Gruppe als Löscher-Abgangsgruppe in der FRET-Detektion. In Kombination mit einem 6-FAM-markierten ON ermöglicht diese Modifikation, ähnlich wie bei existierenden Systemen,^[6b-d] eine direkte, zeitgleiche Verfolgung der Reaktion über Fluoreszenz bis hinunter zu nanomolaren Konzentrationen. (siehe Schema 1B und die Hintergrundinformationen). Der Löscher kann sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende des Thiol-ON eingeführt werden.

Bei der Ligation eines nukleophilen Thiol-ON wird der Löscher („quencher“, Q) freigesetzt, und ein Fluoreszenzsignal wird erzeugt (Schema 1A). Voruntersuchungen mit 5'-Aktivierung offenbarten eine sehr schnelle Lignationsreaktion.^[21] Um eine spontane, nicht templatierte Lignationen zu vermeiden waren daher niedrige mikromolekulare Konzentrationen an thiolierter DNA-Vorstufenbausteinen erforderlich. Um sicherzustellen, dass bei so niedrigen Konzentrationen ausreichende Mengen des termolekularen Komplexes vorliegen, wurden für die Ligation Sequenzen mit 9mer-Vorstufen und 18mer-Templatbausteinen gewählt. In dem 9-18mer-System wurden zwei komplementäre 3'-S-,5'-S-ON-Paare und die entsprechenden Template synthetisiert (Tabelle 1). Die 6-FAM modifizierten ON wurden mit einem 20fachen Überschuss an Dabcy-Linker in die aktivierten und gelöschten Vorstufenbausteine überführt (pH 7.0 Puffer, RT, 15 min).

Zur Untersuchung der nicht templatierten Hintergrundreaktion wurden Lignationsreaktionen durchgeführt (siehe die Hintergrundinformationen). Ein Vergleich der 3'- und 5'-Elektrophile zeigte bei der nicht templatierten Reaktion überraschenderweise sehr verschiedene Reaktionsgeschwin-



Schema 1. Der Thiol-DNA-Lignationszyklus: A) Gesamter Lignationszyklus; B) Lignationsreaktion mit 3'-Aktivierung.

Tabelle 1: Oligonukleotidsequenzen und Temperatureffekte für die nicht templatierten Lignationsexperimente.

Ligation	3'-Aktivierung	5'-Aktivierung
3'-S-ON	^F ATTATACCG ^Q A	TACTTCAAG ^S E
5'-S-ON	^S CTTGAAGTA B	^Q CGGTATAAT ^F D
<i>T</i> [°C]	<i>k</i> ₁ [M ⁻¹ s ⁻¹]	
35	33	391
38	37	547
40	43	718
45	54	844
55	62	1413

digkeiten. Für ein 3'-Elektrophil (**A**) und ein 5'-Nukleophil (**B**) beobachteten wir signifikant niedrigere Reaktionsgeschwindigkeiten als für ein 5'-Elektrophil (**D**) und ein 3'-Nukleophil (**E**; Tabelle 1).

Die nicht templatierten Reaktionen zeigten bei pH 7 (über 30 min Reaktionszeit) einen Umsatz von 6–11 % für die 3' Aktivierung gegenüber 60–90 % Umsatz für die 5'-Aktivierung. Diese Ergebnisse lassen sich nicht über die Nukleophilie erklären, da das 5'-Thioat erwartungsgemäß das stärkere Nukleophil ist. Experimente mit vertauschten Nukleophilen, die zu 3'-3'- und 5'-5'-Lignationen führten, zeigten auch relative geringe Ausbeuten für das 3'-Elektrophil (siehe die Hintergrundinformationen). Der Effekt entsteht anscheinend durch eine sterische Hinderung. Die 3'-Aktivierung (siehe Tabelle 1) zeigte nur eine geringfügige Temperaturabhängigkeit (in diesem Temperaturbereich). Ein Tem-

plateffekt wurde für beide Aktivierungswege beobachtet, bei der 5'-Aktivierung ist der nicht templatierter Reaktionsweg jedoch dominant. Folglich wurde eine detaillierte Untersuchung von Templat- und Temperatureffekten auf das 3'-aktivierte System beschränkt.

Für den Nachweis der Produktreinheit und der Eindeutigkeit der Ligation wurden qualitative Gel-Analysen der templatierten Ligrationsreaktionen durchgeführt (Abbildung 3). Die beiden Fluoreszenzbanden wurden über MALDI-TOF jeweils als Vorstufe und Produkt identifiziert (siehe die Hintergrundinformationen).

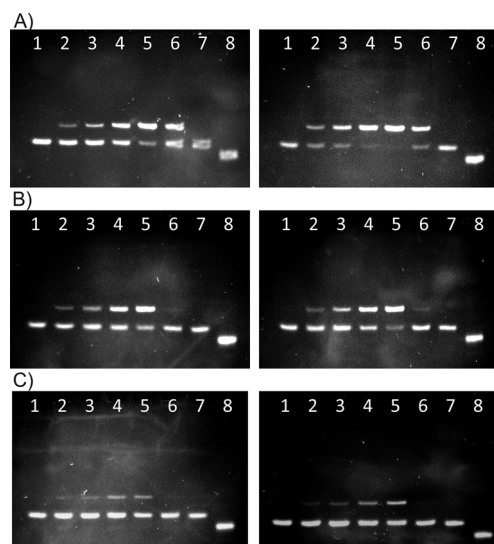


Abbildung 3. Gel Mobilitätsanalyse der Templat-Ligrationsreaktion bei 25 °C (A), 35 °C (B), 45 °C (C). Links: Reaktion nach 30 s. Rechts: Reaktion nach 5 min. Spur 1: nicht templatierter Reaktion, Spur 2–5: 0.1 Äquiv., 0.2 Äquiv., 0.5 Äquiv. und 1 Äquiv. des Templats TACT-TCAAGCGTATAAT, Spur 6: 1 Äquiv. des Templats TACT-TCAAGCTGTATAAT, Spur 7: 6-FAM-Vorstufen-ON, Spur 8: reduziertes 6-FAM-Vorstufen-ON. Alle Reaktionen wurden in einem 0.1 m Phosphat-Puffer (pH 7) mit 100 mm NaCl bei einer Vorstufenkonzentration von 0.5 μM durchgeführt. Die Templatkonzentration wurde von 0 bis 0.5 μM variiert. Die Ligrationsreaktionen wurden durch Zugabe eines 50fachen Überschusses an Ellmans Reagens in gesättigter Harnstofflösung nach jeweils 30 s und 5 min gestoppt, und mit denaturierenden Polyacrylamid-Gelen über Fluoreszenzdetektion analysiert.

Wir beobachteten in den Ligationsexperimenten eine saubere und schnelle Ligation sowie einen starken Templat- und Temperatureffekt. Bei 25 °C und 35 °C war eine signifikante templatgesteuerte Umsetzung schon nach 30 s zu beobachten. Nach 5 min ist die templatierter Ligation (1 Äquivalent) nahezu vollständig. Außerdem wurde für die nicht templatierter Ligation in einem Zeitrahmen von 5 min keine Produktbildung beobachtet. Bei 45 °C, dem Schmelzpunkt des Produkt-Templat-Komplexes (siehe die Hintergrundinformationen), ist die Produktbildung entsprechend dem reduzierten Templatteffekt verringert. Trotz der erhöhten Temperatur bleibt die nicht templatierter Produktbildung über 5 min gering. Eine Bildung fluoreszierender Nebenprodukte wurde nicht beobachtet.

Selektivität für die templatierter Ligation wurde durch Ligationsexperimente mit einem mutierten Templat gezeigt (Abbildung 3, Spur 6). Eine Sequenzvariation des Templats um eine Base in der Nähe zur Ligrationsstelle reduzierte die Produktbildung im Vergleich zum passenden Templat. Der Effekt erhöht sich mit steigender Temperatur. Diesbezüglich wurden verschiedene Templatvariationen getestet, die alle einen reduzierten Templatteffekt zeigen (siehe die Hintergrundinformationen).

Um die Reaktionskinetik zu quantifizieren, wurde die templatierter Ligation auch direkt über Fluoreszenz verfolgt (Abbildung 4). Zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit und

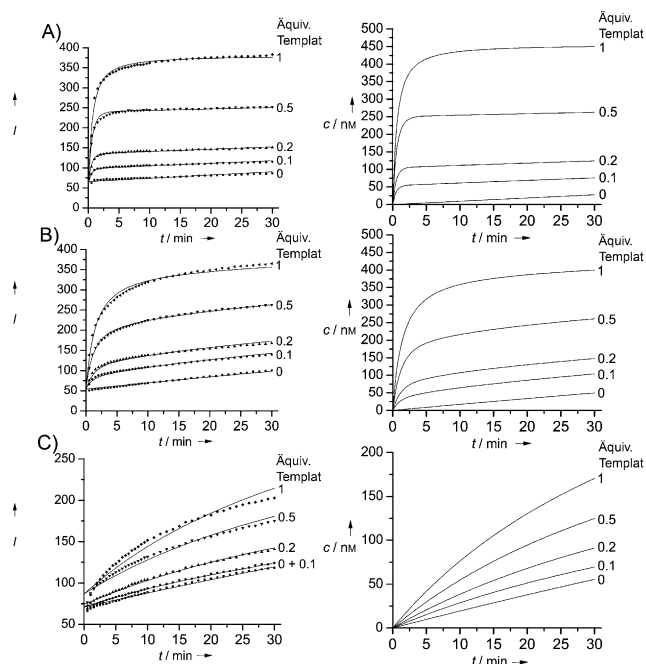
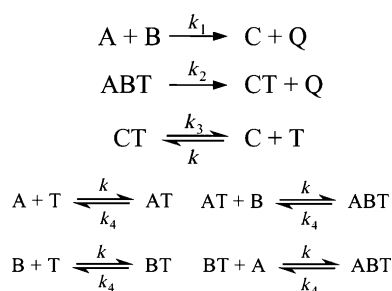


Abbildung 4. Reaktionskinetik der 3'-aktivierten templatgesteuerten Ligrationsreaktion bei 25 °C (A), 35 °C (B), 45 °C (C). Die Templatkonzentration wurde von 0 bis 0.5 μM variiert und der Templateneinfluss auf die Ligation wurde in Messreihen bei 25 °C, 35 °C und 45 °C jeweils durch Variation der Templatkonzentrationen bestimmt. Links: Fluoreszenz-Messpunkte aus FRET-Detektion durch Freisetzung der Löslich-Abgangsgruppe bei der Ligation und theoretische Kurven. Für jede Messreihe wurden die Geschwindigkeitskonstanten der nicht templatierter Reaktion (k_1) und der templatierter Reaktion (k_2) abgeschätzt, ebenso wie die Konstanten für die Produkt-Templat-Dissoziation (k_3) und die Vorstufe-Templat-Dissoziation (k_4) unter Verwendung des Programms SimFit^[22] und der Schema 2. In jeder Messreihe wurden die Messungen durch Kalibrierung für 0% und 100% Umsatz normiert.

zur Unterdrückung von Autooxidationsprozessen innerhalb einer Messreihe wurde ein Überschuss an Thiol-ON eingesetzt, ohne Nebenreaktionen zu verursachen. Ein zusätzlicher löschender Einfluss des Templats auf das Vorstufe und Produkt wurde beobachtet (Hybridisierungsauflösung) und über Kalibrierungen quantifiziert (siehe die Hintergrundinformationen).

Die Größenordnungen von k_3 und k_4 (Schema 2) wurden über Dissoziationskonstanten aus Schmelzkurven und abgeschätzten Assoziations-Geschwindigkeitskonstanten k vor-



Schema 2. Reaktionsmodell für die templatgesteuerte Ligation: A,B: Vorstufen, C: Produkt, Q: Abgangsgruppe, T: Templat, k : fixierte Geschwindigkeitskonstante.

gegeben und in der Anpassung verwendet. Die Schmelzpunkte des Vorstufe-Templat- und des Produkt-Templat-Komplexes wurden mit 29 °C bzw. 45 °C bestimmt (siehe die Hintergrundinformationen), letzterer liegt damit 7 °C unter dem Schmelzpunkt der natürlichen Phosphordiester-Sequenz. Sowohl die Hintergrundfluoreszenz als auch die Beiträge des Hybridisierungslösung zum Fluoreszenzsignal wurden als Korrekturfaktoren im Fit berücksichtigt. Hierdurch konnten Geschwindigkeitskonstanten und Produktkonzentrationen (Tabelle 2 und Abbildung 4, rechts) direkt aus den Fluoreszenzmessungen abgeleitet werden (siehe die Hintergrundinformationen).

Tabelle 2: Geschwindigkeitskonstanten und geschätzte Fehler der templatgesteuerten Ligationsexperimente von A und B mit 3'-Aktivierung in Abhängigkeit von der Temperatur.^[a]

T [°C]	25 °C	35 °C	45 °C
k_1 [M ⁻¹ s ⁻¹]	17.5 ± 2	29.3 ± 0.1	39.1 ± 0.7
k_2 [s ⁻¹]	(2.7 ± 2) × 10 ⁻¹	1.69 ± 0.01	6.6 ± 0.1
k_3 [s ⁻¹]	(4.7 ± 6) × 10 ⁻⁶	(3.7 ± 0.2) × 10 ⁻³	(1.3 ± 0.1) × 10 ⁻²
k_4 [s ⁻¹]	5.3 ± 3	39.7 ± 0.1	820 ± 5
r.m.s. ^[b] [%]	1.9	2.2	4.3

[a] Eine signifikante Variation der templatgesteuerten Ligation und der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante mit der Temperatur kann abgeleitet werden. [b] r.m.s. ist der (prozentuale) Anteil des quadratischen Mittelwertes über alle Arten in der gesamten Anpassung.

Für das Ligationssystem offenbaren die Kurvenverläufe und Geschwindigkeitskonstanten einen geringfügigen Umsatz, einen sehr schnellen templatierten Reaktionsweg und eine moderate Hintergrundreaktion. Die Wechselzahlen (TONs) wurden über Fluoreszenz in einer Serie von Experimenten bei verschiedenen Temperaturen bestimmt (siehe die Hintergrundinformationen). In Gegenwart von 0.01 Mol-äquivalenten Templat (5 nM) beobachteten wir eine Wechselzahl bis 6 nach 100 min. Andere Gruppen haben Wechselzahlen bis 402 bei 0.01 % Templatzugabe über 24 h berichtet, kürzlich wurde eine Wechselzahl von 1500 bei 0.001 % Templatzugabe über 15 h gezeigt.^[9c,12]

Bei 25 °C beobachteten wir eine schnelle Ligation mit 50 % Produkt nach 60 s und eine fast vollständige Umsetzung nach 5 min. Die nicht templatierter Reaktion trägt nach 30 min mit etwa 5 % Umsatz bei. Aufgrund der Geschwin-

digkeit der Ligation konnte die initiale Reaktionsbeschleunigung auf etwa 300-fach nur geschätzt werden.

Mit steigender Temperatur, bis hin zum Schmelzpunkt bei 45 °C, wird der Templateffekt abgeschwächt, und bei 50 °C ist kein Templateffekt zu beobachten. Da die Hintergrundreaktion anscheinend nur geringfügig durch Temperaturänderungen beeinflusst wird kann die Temperatur zur Verringerung der Ligationsgeschwindigkeit und zur Steuerung der templatierten Ligation durch Kontrolle der Hybridisierung genutzt werden.

Wir haben gezeigt, dass die Disulfid-Austauschreaktion eine der schnellsten templatgesteuerten chemischen Ligationsmethoden mit Halbwertszeiten in der Größenordnung von Sekunden liefert. Dies ist vergleichbar mit der Ligase-Enzymreaktion, mit nukleophilen Substitutionsreaktionen von thiolierten ON oder mit einer DNA-templatierten, nativen chemischen PNA-Ligation.^[13,23] Die Wahl der 3'-Aktivierung kann sehr effektiv die Hintergrundreaktionen unterdrücken, während im templatierten Fall die räumliche Nähe und die richtige Orientierung der reaktiven Zentren die Ligation beschleunigt. Die Ligationsreaktion verläuft außerdem sauber, Nebenreaktionen wurden nicht beobachtet, und mit erhöhten Temperaturen kompatibel.

Interessante Anwendungsmöglichkeiten könnten aus der starken pH-Abhängigkeit der Disulfid-Austauschreaktion und aus ihrer Reversibilität erwachsen. Im Kontext von Selbstreplikation^[24] und molekularer Evolution kann eine schnelle und von außen steuerbare Ligationschemie sehr wertvoll sein. Die Reversibilität der Ligation könnte zum Aufbau einer dynamischen kombinatorischen Bibliothek von Disulfiden auf ON-Basis verwendet werden.^[25] Durch Temperaturzyklen könnte eine signifikante Wechselzahl induziert werden. Besonders bei erhöhten Temperaturen gibt es Hinweise für eine Sequenzselektivität, die zu einer Verwendung in der SNP-Detektion führen könnte. Die Breite der Ligationsmethode muss durch Sequenzvariation hin zu natürlichen Proben noch gezeigt werden (z. B. Ras Gen). Anwendungen als elektronisch kontrollierte Replikationssysteme und synthetische Systeme, durch Verknüpfung von Replikation und Redox-Metabolismus, werden untersucht.^[26]

Experimentelles

5'-Thiol-ON-Synthese: Reverse Amidite (ChemGene) reagierten für 5 Minuten in einem DNA-Synthesizer (Gene Assembler Plus) mit 5-Benzylmercaptotetrazol (emp Biotec) als Aktivator. Standard Protokolle für Detritylierung, „Capping“ und Oxidation wurden verwendet.

ON-Aufreinigung: Nach Abspaltung von der Festphase (konz. Ammoniak, 55 °C, 16 h) wurden die Produkte mit einem 100-fachen Überschuss an TCEP in einer gepufferten Lösung (100 mM in 0.1M HEPES; pH7) für 15 Minuten reduziert. Die ON wurden über RP-HPLC aufgereinigt.

Dabcyl-Linker-ON-Synthese: Ein 20facher Überschuss von Dabcyl-Lys-DTNB-Linker **13** wurde zum reduzierten Thiol-ON (mit terminaler 6-Fluorescein-Phosphoramidit Modifikation (Glen Research); 0.1M HEPES; pH 7) gegeben. Nach 30 Minuten wurde das Produkt über RP-HPLC isoliert und mit OASIS-HLB-Kartuschen (Waters) entsalzt. Die Charakterisierung wurde über MALDI-TOF mit 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) als Matrix durchgeführt.

Ligationsreaktionen: Die Ligationsreaktionen wurden in 0.1M entgastem Phosphatpuffer (pH 7) mit 100 mM NaCl durchgeführt. Der Fluoreszenzanstieg bei der Reaktion wurde über ein Varian Cary Eclipse Spectrometer (Anregung 495 nm; Emission 515 nm) detektiert. Zum Beginn der Reaktion wurden 300 µL einer gepufferten und temperierten ON-Lösung in einer 500-µL-Fluoreszenzküvette gemischt (Schichtdicke 10 mm). Ligationsreaktionen zur Gel-Analyse wurden in 20 µL Reaktionsvolumen durchgeführt. Zum Abbruch der Reaktion wurden Proben von 10 µL mit einem 50fachen Überschuss an Ellmans Reagens in 10 µL gesättigter Harnstofflösung versetzt. Die Proben wurden über denaturierende Polyacrylamid-Gele analysiert (16%, 120 V, 1.5 h, TBE-Puffer).

Eingegangen am 8. Dezember 2013,
veränderte Fassung am 28. Januar 2014
Online veröffentlicht am 12. März 2014

Stichwörter: Chemische Ligation · FRET · Oligonukleotide · Reaktionskinetik · Schwefel

- [1] a) O. Khakshoor, E. T. Kool, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 7018–7024; b) J. Berger, M. Oberhuber, *Chem. Biodiversity* **2010**, 7, 2581–2615; c) Deck, M. Jauker, C. Richert, *Nat. Chem.* **2011**, 3, 603–608; d) A. Shibata, H. Abe, Y. Ito, *Molecules* **2012**, 17, 2446–2463; e) Z. J. Gartner, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6961–6963; f) X. Li, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 4956–4979; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4848–4870; g) Z. J. Gartner, B. N. Tse, R. Grubina, J. B. Doyon, T. M. Snyder, D. R. Liu, *Science* **2004**, 305, 1601–1605.
- [2] a) L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1968**, 38, 381–393; b) L. E. Orgel, R. Lohrmann, *Acc. Chem. Res.* **1974**, 7, 368–377; H. L. Sleeper, R. Lohrmann, L. E. Orgel, *J. Mol. Evol.* **1979**, 13, 203–214; c) T. Inoue, L. E. Orgel, *Science* **1983**, 219, 859–862.
- [3] a) G. von Kiedrowski, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 932–934; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 932–935; b) W. S. Zielinski, L. E. Orgel, *Nature* **1987**, 327, 346–347; c) G. von Kiedrowski, B. Wlotzka, J. Helbing, *Angew. Chem.* **1989**, 101, 1259–1261; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, 28, 1235–1237; d) G. von Kiedrowski, B. Wlotzka, J. Helbing, M. Matzen, S. Jordan, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 456–459; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 423–426; e) L. E. Orgel, *Nature* **1992**, 358, 203–209; f) D. Sievers, G. von Kiedrowski, *Nature* **1994**, 369, 221–224; g) D. Sievers, G. von Kiedrowski, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 629–641.
- [4] a) N. G. Dolinnaya, N. I. Sokolova, O. L. Gryaznova, Z. A. Shabarova, *Nucleic Acids Res.* **1988**, 16, 3721–3738; N. G. Dolinnaya, N. I. Sokolova, D. T. Ashirbekova, Z. A. Shabarova, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 3067–3072; b) N. G. Dolinnaya, A. V. Tsytoich, V. N. Sergeev, T. S. Oretskaya, Z. A. Shabarova, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 3073–3080.
- [5] a) A. Kaiser, S. Spies, T. Lommel, C. Richert, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 8424–8428; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 8299–8303; b) M. Röthlingshöfer, E. Kervio, T. Lommel, U. Plutowski, A. Hochgesand, C. Richert, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 6154–6157; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 6065–6068; c) J. A. Rojas Stütz, E. Kervio, C. Deck, C. Richert, *Chem. Biodiversity* **2007**, 4, 784–802; J. P. Schrum, A. Ricardo, M. Krishnamurthy, J. C. Blain, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 14560–14570; d) J. J. Chen, X. Cai, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 2119–2121; e) O. Taran, O. Thoennessen, K. Achilles, G. von Kiedrowski, *J. Syst. Chem.* **2010**, 1, 9.
- [6] a) Y. Xu, N. B. Karalkar, E. T. Kool, *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 148–152; b) H. Abe, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13980–13986; c) H. Abe, E. T. Kool, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 263–268; d) A. P. Silverman, E. T. Kool, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 4978–4986.
- [7] a) R. Kumar, A. El-Sagheer, J. Tumpene, P. Lincoln, L. M. Wilhelmsson, T. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6859–6864; b) A. H. El-Sagheer, V. V. Cheong, T. Brown, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 232–235; c) M. Shelbourne, X. Chen, T. Brown, A. H. El-Sagheer, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 6257–6259.
- [8] J. Cai, X. Li, X. Yue, J. S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 16324–16325.
- [9] a) S. Ficht, C. Dose, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, 6, 2098–2103; b) C. Dose, S. Ficht, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 5495–5499; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5369–5373; c) T. N. Grossmann, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 15596–15597; d) A. Erben, T. N. Grossmann, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 2880–2884; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 2828–2832; e) A. Roloff, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, 3458–3464; f) A. Roloff, O. Seitz, *Chem. Sci.* **2013**, 4, 432–436.
- [10] a) R. M. Franzini, E. T. Kool, *Org. Lett.* **2008**, 10, 2935–2938; b) R. M. Franzini, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 16021–16023.
- [11] a) K. Furukawa, H. Abe, S. Tsuneda, Y. Ito, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 2309–2311; b) M. Röthlingshöfer, K. Gorska, N. Winssinger, *Org. Lett.* **2012**, 14, 482–485.
- [12] A. Shibata, T. Uzawa, Y. Nakashima, M. Ito, Y. Nakano, S. Shuto, Y. Ito, H. Abe, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 14172–14178.
- [13] C. Dose, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 65–77.
- [14] a) K. C. Gupta, P. Sharma, S. Sathyanarayana, P. Kumar, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 2471–2474; b) P. Baptista, E. Pereira, P. Eaton, G. Doria, A. Miranda, I. Gomes, P. Quaresma, R. Franco, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, 943–950; c) I. Tokareva, E. Hutter, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15784–15789.
- [15] A. Luther, R. Brandsch, G. von Kiedrowski, *Nature* **1998**, 396, 245–248.
- [16] a) A. E. Ferentz, T. A. Keating, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9006–9014; b) M. Endo, T. Majima, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3476–3478.
- [17] a) N. Dolinnaya, V. Metelev, T. Oretskaya, D. Tabatadze, Z. Shabarova, *FEBS Lett.* **1999**, 444, 285–290; b) V. G. Metelev, O. A. Borisova, E. M. Volkov, T. S. Oretskaya, N. G. Dolinnaya, *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 4062–4069.
- [18] L. E. Orgel, A. W. Schwartz, *Science* **1985**, 228, 585–587.
- [19] E. M. Witch, R. Cosstick, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 6745–6748.
- [20] B. Wlotzka, Dissertation, Universität Göttingen, **1992**.
- [21] V. Patzke, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, **2005**.
- [22] Auf Anfrage von einem der Autoren (*) erhältlich.
- [23] 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.
- [24] a) T. Tjivikua, P. Ballester, J. Rebek Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 1249–1250; b) D. H. Lee, J. R. Granja, J. A. Martinez, K. Serverin, R. Ghadiri, *Nature* **1996**, 382, 525–528; c) V. Patzke, G. von Kiedrowski, *ARKIVOC* **2007**, 5, 293–310.
- [25] a) S. Otto, R. L. E. Furlan, J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12063–12064; b) S. Otto, R. L. E. Furlan, J. K. M. Sanders, *Science* **2002**, 297, 590–593.
- [26] P. F. Wagler, U. Tangen, T. Maeke, J. S. McCaskill, *J. Biosystems* **2012**, 1–16.