

Enzymatische Synthese von Nukleinsäuren mit definierten regioisomeren 2'-5'-Verknüpfungen

Christopher Cozens, Hannes Mutschler, Geoffrey M. Nelson, Gillian Houlihan, Alexander I. Taylor und Philipp Holliger*

Abstract: Informationenträgende Nukleinsäuren sind universell über 3'-5'-Bindungen verknüpft. Regioisomere 2'-5'-Verknüpfungen bilden sich dagegen unregelmäßig während der nichtenzymatischen RNA-Synthese und waren womöglich hilfreich für die präbiotische RNA-Replikation. Hier berichten wir über die enzymatische Synthese von DNA und RNA mit ortsspezifischen 2'-5'-Verknüpfungen durch ein gezielt verändertes Polymerase-Enzym, das 3'-Desoxy- oder 3'-O-Methyl-NTPs als Substrat verwendet. Zusätzlich vermelden wir die reverse Transkription der so hergestellten, modifizierten Nukleinsäuren zurück in 3'-5'-verknüpfte DNA mit guter Fidelität. Somit ergibt sich eine schnelle und einfache Methode zur „strukturellen Mutagenese“ durch positionsselektives Einfügen von 2'-5'-Verknüpfungen, durch die, ohne Änderung der Basensequenz, die Struktur und Funktion von Nukleinsäuren anhand lokaler Deformationen durch regioisomere Bindungen untersucht werden kann. Beispielhaft wenden wir diese Methode auf das 10-23-RNA-Endonuklease-DNAzym an.

Die Speicherung und Weitergabe genetischer Information in biologischen Systemen basiert auf Nukleinsäuren mit einem uniform 3'-5'-verknüpften Phosphodiester-Rückgrat. Demgegenüber spielen 2'-5'-verknüpfte RNA-Oligoadenylate^[1] und gemischte 2'-5'/3'-5'-Dinukleotide (z. B. Gp(2'-5')Ap(3'-5')^[2]) in der angeborenen Immunantwort eine Rolle, nicht jedoch in der genetischen Informationsübertragung. Sporadische 2'-5'-Verknüpfungen entstehen auch während der nichtenzymatischen RNA-Synthese.^[3] Es wird daher vermutet, dass sie durch transiente Destabilisierungen von RNA-Duplexen – bei gleichzeitiger Erhaltung der globalen RNA-Struktur und Funktion – die uranfängliche RNA-Replikation und Evolution erleichtert haben.^[3d,4]

Die Destabilisierung von doppelsträngiger RNA durch sporadische 2'-5'-Verknüpfungen wurde detailliert untersucht^[5] und resultiert aus einer Abschwächung der Watson-Crick-Basenpaarung und Basenstapelung durch laterale

Verschiebung der Nukleinbasen sowie die Einnahme einer nichtkanonischen C2'-endo-Konformation der Ribose.^[6] Dennoch hybridisieren 2'-5'-verknüpfte Nukleinsäuren schwach aber spezifisch mit komplementärer 3'-5'-RNA und 2'-5'-RNA/DNA.^[5a,d,7]

Trotz ihres destabilisierenden Einflusses auf doppelsträngige Strukturen vermuteten wir daher, dass 2'-5'-verknüpfte Nukleinsäuren in der Lage sein sollten, genetische Information zu kodieren und an die kanonisch 3'-5'-verknüpften Nukleinsäuren weiterzugeben. Darüber hinaus sollte es möglich sein, ihre nichtkanonische Rückgratkonformation auszunutzen, um den strukturellen und funktionellen Raum von Nukleinsäureliganden und -enzymen zu erweitern.

2'-5'-Verknüpfungen sind zwar durch Festphasensynthese zugänglich, was aber zeit- und kostenintensiv ist. Hier stellen wir eine schnelle, kostengünstige und skalierbare Strategie vor, um definierte 2'-5'-verknüpfte DNA- und RNA-Regioisomere mit einer manipulierte DNA-Polymerase zu synthetisieren, die sowohl kanonische 3'-5'- als auch nichtkanonische 2'-5'-Verknüpfungen in DNA und RNA bilden kann (Abbildung 1).

Zunächst überprüften wir eine Liste künstlich veränderter^[8] und kommerziell verfügbarer Polymerasen auf ihre Fähigkeit, DNA zu synthetisieren, wenn 2'-Desoxy-GTP (dGTP) komplett mit 3'-Desoxy-GTP (3'dGTP) ersetzt wurde. Die genetisch veränderte Polymerase TgoT^[8b] (eine Tgo-Variante mit den Mutationen V93Q,^[9] D141A, E141A,

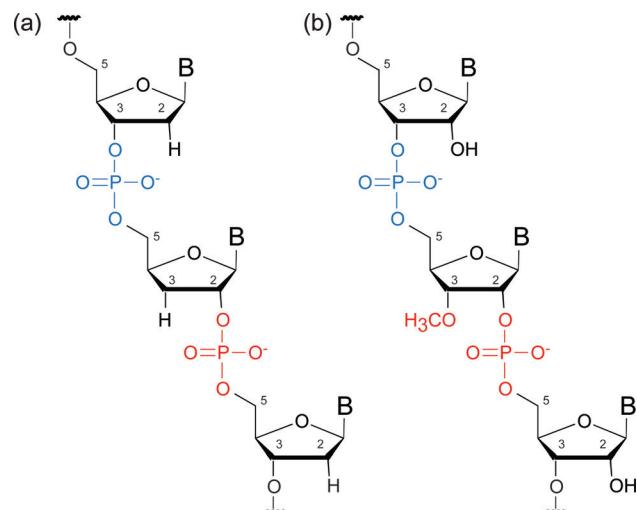


Abbildung 1. Struktur einer partiell substituierten a) 2'-5'-DNA und b) 2'-5'-RNA mit 3'-O-Methyl-Gruppen, wie sie durch die Polymerase TGLLK synthetisiert werden.

[*] Dr. C. Cozens, [+] Dr. H. Mutschler, [+] G. M. Nelson, Dr. G. Houlihan, Dr. A. I. Taylor, Dr. P. Holliger
Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology
Francis Crick Avenue, Cambridge, CB2 0QH (UK)
E-Mail: ph1@mrc-lmb.cam.ac.uk

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

© 2015 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

A485L^[10] und TGK (TgoT: Y409G, E664K, zuvor beschrieben für die primerabhängige RNA-Synthese^[8a]) und die verwandte, kommerzielle Polymerase Vent(*exo*-) waren in der Lage, Volllängen-DNA mit gemischten 2'-5'/3'-5'-Verknüpfungen zu synthetisieren (Abbildung S1). Allerdings war keine dieser Polymerasen fähig, effizient gemischte 2'-5'/3'-5'-RNA zu synthetisieren, wenn GTP durch 3'-O-Methyl-GTP (3'OMe-GTP) ersetzt wurde. Aus diesem Grund stellten wir eine TGK-Variante mit zwei weiteren Mutationen her, die dafür bekannt sind, das Polymerase-Substratspektrum zu erweitern (I521L,^[8b] F545L^[11]). Die resultierende Polymerase TGLLK (TgoT: Y409G, I521L, F545L, E664K; Abbildung S2) erwies sich als effektiv in der Synthese von sowohl DNA als auch RNA mit definierten 2'-5'-Verknüpfungen (Abbildung 2). TGLLK ist während der prozessiven Synthese in der Lage, Purin-dNTP und NTP komplett mit ihren entsprechenden 3'-Desoxy- (3'dATP, 3'dGTP) oder 3'-O-Methyl-Analoga zu ersetzen – obwohl diese normalerweise als potente Ketteterminatoren fungieren (z.B. Cordycepin, 3'dATP^[12]). Die Aktivität in Gegenwart von 3'-Analoga der Purin-Nukleotide oder zweier verschiedener Analoga gleichzeitig war schwach. Dennoch war ein geringes Ausmaß an Volllängensynthese mit 3'dUTP oder 3'OMe-ATP/3'OMe-GTP möglich (Abbildung S3). Ein Pausieren der Polymerase trat meist an sequenziellen 3'dNTP-Insertionsstellen auf – vermutlich weil aufeinanderfolgende 2'-5'-Verknüpfungen die Duplexstabilität vermindern und progressive Konforma-

tionsstörungen relativ zu kanonischen 3'-5'-Helices verursachen.^[6c,13]

Um sicherzustellen, dass die Volllängenprodukte nicht – wie bei manchen anderen Polymerasen^[14] – aus Fehlinkorporation resultierten, versuchten wir, die Präsenz von 2'-5'-Verknüpfungen durch ein HPLC-Assay zu verifizieren. Dadurch können 2'-5'- und 3'-5'-Phosphodiesterbindungen anhand ihrer unterschiedlichen chromatographischen Mobilitäten unterschieden werden.^[15] Das Assay bestätigte eindeutig die Fähigkeit von TGLLK, unter Verwendung von 3'dATP spezifisch 2'-5'-Verknüpfungen in DNA einzufügen (Abbildung 3).

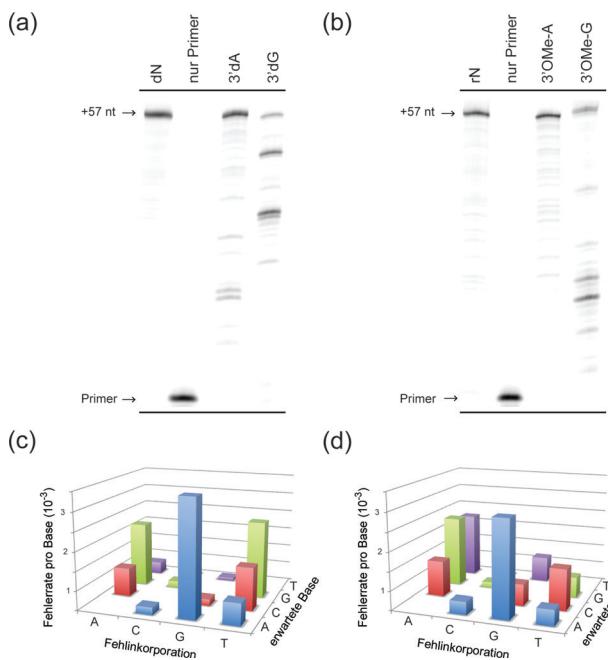


Abbildung 2. Enzymatische Synthese partiell substituierter a) 2'-5'-DNA und b) 3'-5'-RNA durch TGLLK anhand einer 57-nt-Matrize (TempN; siehe die Hintergrundinformationen), die alle möglichen Dinukleotid-Kombinationen kodiert. Die Reaktionen in (a) beinhalteten dNTP, abgesehen von 3'dA/G wie angegeben. Die Reaktionen in (b) beinhalteten NTP, abgesehen von 3'OMe-A/G wie angegeben. c,d) Fehlerspektren der 3'dG/dHTP-Synthese ((c); aggregierte Fehlinkorporationsrate 5.08×10^{-4}) und der 3'OMe-A/BTP-Synthese (d); aggregierte Fehlinkorporationsrate 7.18×10^{-4}). Die Säulen illustrieren die Fehlinkorporationsfrequenz für jedes inkorrekte Nukleotid.

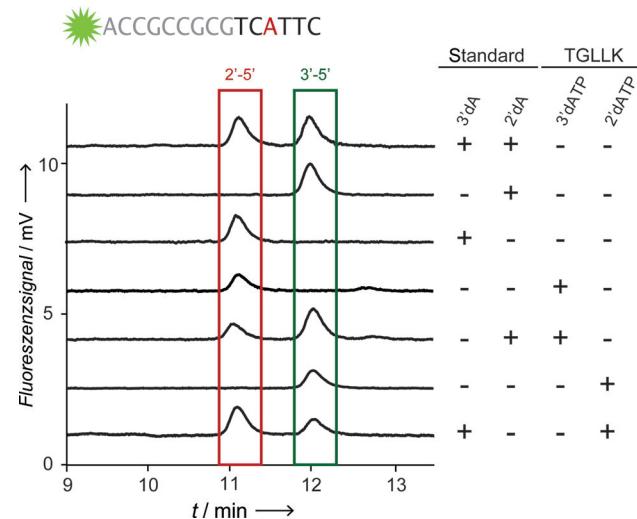


Abbildung 3. HPLC-Analyse eines fluoreszenzmarkierten Oligonukleotids, das mit TGLLK in Gegenwart von 2'dATP oder 3'dATP synthetisiert wurde. Zusätzliche Chromatogramme stammen von den entsprechenden chemisch synthetisierten 2'-5'(3'dA)/3'-5'(2'dA)-Standards und einer enzymatisch hergestellten 2'dA-Kontrolle. Standards und mithilfe der Polymerase erzeugte Oligonukleotide wurden in äquimolarem Verhältnis gemischt und durch HPLC unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt.

Die reverse Transkription von 2'-5'-substituierter DNA und 3'OMe-RNA zurück zu vollständiger 3'-5'-DNA unter Verwendung von Taq-DNA-Polymerase (Taq) und „Avian Myeloblastosis Virus RT“ (AMV RT; siehe Lit. [16]) ermöglichte es uns, durch Hochdurchsatz-Sequenzierung die Gesamtfeiditität des Informationstransfers durch 2'-5' in DNA und RNA zu bestimmen. Die dadurch ermittelten Fehlinkorporationsfrequenzen lagen zwischen 8×10^{-3} für 3'dATP und 2×10^{-4} für 3'OMe-GTP (Abbildung 2c,d; Tabelle S1).

Als nächstes begannen wir, die Wirkung von 2'-5'-Verknüpfungen auf die Funktion von Nukleinsäuren zu untersuchen. Sporadische Substitutionen (< 25 %) von zufällig verteilten 2'-5'-Verknüpfungen sind kompatibel mit der Funktion polyklonaler Populationen mancher Ribozyme und RNA-Aptamere.^[4] Wir nahmen an, dass ein besseres Verständnis der funktionellen Auswirkungen von 2'-5'-Verknüpfungen durch deren ortsspezifische Insertion erlangt werden könnte. Eine solche „strukturelle Mutagenese“ würde – im Gegensatz zur konventionellen Mutagenese – nicht funktio-

nelle Gruppen ersetzen, sondern deren dreidimensionale Position ändern, und sie könnte neuartige Untersuchungen zur Rolle verschiedener Nukleotide innerhalb der Struktur und Funktion von Nukleinsäuren ermöglichen.

Wir wählten das gut untersuchte 10-23-RNA-Endonuklease-DNAzym^[17] (Abbildung 4a), um diesen Ansatz der

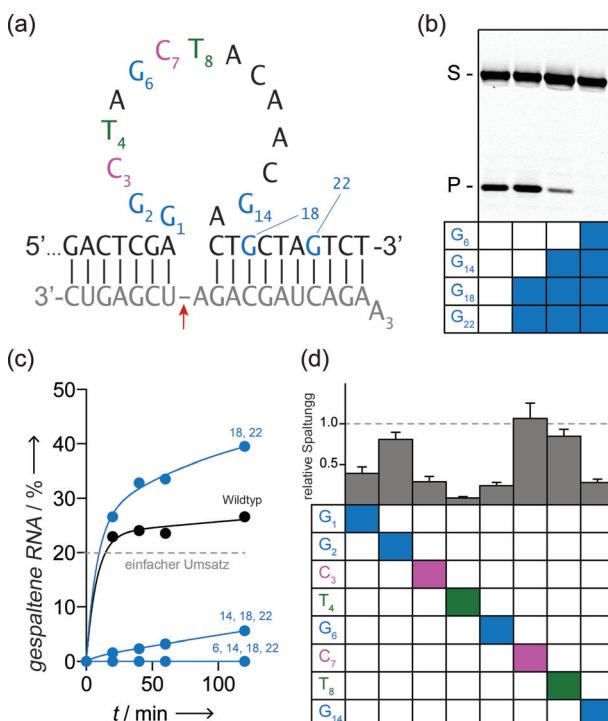


Abbildung 4. Strukturelle Mutagenese enzymatisch hergestellter Varianten des 10-23-DNAzyms. a) Das in dieser Studie verwendete 10-23-DNAzym-Substrat-Paar. b) Spaltung des fluoreszierenden RNA-Substrats (200 nm) nach 1 h bei 37°C durch verschiedene DNAzym-Varianten (40 nm), die 2'-5'-Verknüpfungen strandabwärts von G5 oder G14 (siehe (a)) beinhalten. Blaue Boxen weisen auf eine 2'-5'-Verknüpfung nach dem jeweiligen 3'dG hin. c) Zeitliches Fortschreiten der Spaltungsreaktionen bei zunehmender Menge an 3'dG-Substitutionen. d) Spaltung nach 1 h durch verschiedene, mittels positionsspezifischer enzymatischer Synthese erzeugte DNAzym-Varianten, die alleinstehende 2'-5'-Verknüpfungen beinhalten.

„strukturellen Mutagenese“ zu überprüfen und synthetisierten 10-23 zunächst mit einer graduell zunehmenden Zahl an 2'-5'-verknüpften Purinen (Abbildung 4, S4). Diese „Primer-abtastung“ ermöglicht eine schnelle Bestimmung von obliquatorischen 3'-5'-Verknüpfungen, die empfindlich auf strukturelle Verformungen reagieren, neutralen Positionen, die sowohl eine 3'-5'- als auch eine 2'-5'-Geometrie tolerieren, und allen Positionen, für die das Einfügen von 2'-5'-Verknüpfungen vorteilhaft ist. Wir identifizierten Nukleotidpositionen in jeder dieser Kategorien (Abbildung 4). Beispielsweise zeigte die Mutagenese des distalen Substrat-Bindefarms, dass das Einfügen von 2'-5'-Verknüpfungen nach den Nukleotiden G18 und G22 zu einer moderaten Aktivitätszunahme führt (Abbildung 4c), vermutlich aufgrund einer reduzierten Produktinhibierung.^[18]

Eine vorangehende Analyse hatte gezeigt, dass G14 hochempfindlich auf Basensubstitutionen reagierte: Änderungen zu A, C oder T führten zu einem etwa 20-fachen Aktivitätsverlust, und sogar konservative Substitutionen des G mit Inosin oder 2-Aminopurin resultierten in einer mehr als 10-fachen Aktivitätsminderung.^[19] Dagegen stellten wir fest, dass eine strukturelle Mutagenese von G14 – wobei Guanin als funktionelle Gruppe erhalten bleibt, aber eine geometrische Störung in das aktive Zentrum einfügt wird^[20] – eine vergleichsweise milde Verringerung der 10-23-Aktivität (ca. 5-fach) zur Folge hat (Abbildung 4b,c).

Das Primerabtasten unter Verwendung von 3'dA offenbarte eine bescheidene Zunahme der Aktivität, wenn Positionen im Substrat-Bindefarm (A21) mutiert wurden. Das gleichzeitige Einfügen von 2'-5'-Verknüpfungen nach allen A-Nukleotiden resultierte in einem kompletten Verlust der Aktivität (Abbildung S4). Das Wiederherstellen der 3'-5'-Verknüpfungen nach A5 rettete ein minimales Ausmaß an Aktivität und das Wiederherstellen nach A9, A11 und A15 resultierte in weiteren progressiven Zunahmen der Aktivität.

Um ein genaueres Bild vom Einfluss der 2'-5'-Verknüpfungen zu erlangen, untersuchten wir die Effekte von diskreten 2'-5'-Verknüpfungen unter Verwendung eines „Pulse-Chase“-Ansatzes in Anlehnung an die kürzlich beschriebenen Methode zum positionsselektiven Markieren von RNA (PLOR^[21]). Wir adaptierten die Methode in einer einfachen Eintopfreaktion mit der TGLKK-Polymerase. Kurzgefasst wurden hierbei Primer, Matrize und TGLKK mit einer einzigen 3'dNTP-Spezies inkubiert, um ein definiertes 3'-Desoxy-nukleotid am Primer einzufügen („Pulse“). Anschließend wurde die DNA-Synthese nach der Zugabe von nichtmodifizierten dNTP („Chase“) zum Abschluss gebracht und auf diese Weise eine einzelne, positionsspezifische 2'-5'-Verknüpfungen erzeugt (Abbildung S5).

Wir fügten positionsspezifische 2'-5'-Verknüpfungen nach mehreren Nukleotiden im katalytischen Zentrum (G1, G2, C3, T4, G6, C7, T8 und G14; Abbildung 4d) ein, von denen bekannt ist, dass sie die Funktion von 10-23 beeinflussen. Die Insertion von 2'-5'-Verknüpfungen an mehreren Positionen (G2, C7, T8) zeigte kaum eine Beeinträchtigung der 10-23-Aktivität (> 75% Wildtyp-Aktivität), was auf eine hohe Toleranz dieser Positionen gegenüber konformativen Deformationen schließen lässt. Andere Positionen hingegen (G1, C3, G6, G14) zeigten bedeutend höhere Aktivitätsverluste (20-40% Wildtyp-Aktivität). Eine Position (T4) war besonders empfindlich gegenüber dem Einfügen einer 2'-5'-Verknüpfung (< 10% Wildtyp-Aktivität).

Diese Daten suggerieren, dass T4 und generell die Region C3-G6 empfindlich auf strukturelle Mutagenese reagieren – ähnlich wie auf Basensubstitutionen,^[19] Basendeletionen^[22] oder das Ersetzen mit abasischen Nukleotiden.^[23] Ursächlich hierfür könnte eine Verlagerung des essenziellen Mg²⁺ sein, das vermutlich durch die T4-A5-Rückgratverknüpfung koordiniert wird (Abbildung S6).^[24] Wir beobachteten weiterhin, dass G2, welches hochgradig intolerant für Basensubstitutionen ist,^[19] kaum auf die Rückgratdeformation durch eine 2'-5'-Verknüpfung reagiert. Folglich zeigen unsere Resultate, dass die strukturelle Mutagenese durch das ortsspezifische Einfügen von 2'-5'-Verknüpfungen es ermöglicht, neuartige

strukturelle und funktionelle Aspekte von Nukleinsäuren zu untersuchen. Dies könnte insbesondere hilfreich für die Identifizierung von rückgratvermittelten Metall-Koordinationszentren sein.

Zusammengefasst haben wir hier eine neuartige, künstlich veränderte Polymerase beschrieben, die matrizenabhängig zur Synthese von DNA und RNA mit regiosomeren 2'-5'-Verknüpfungen fähig ist. Die RNA-Synthese ist hierbei momentan mit der gleichzeitigen Insertion einer 3'-O-Methylgruppe assoziiert. Zukünftige Herangehensweisen könnten – in Anlehnung an die Deacetylierung von 2'-O-acetylierter RNA^[15] oder an Sequenzierungstechniken die auf zyklischer reversibler Termination basieren^[25] – die Inkorporation von NTP mit einer spaltbaren 3'-Gruppe erlauben, wonach eine Entfernung dieser Schutzgruppe unter milden Bedingungen „reine“ 2'-5'-RNA ergeben würde.

Darüber hinaus beschreiben wir eine schnelle Methode zur positionselektiven strukturellen Mutagenese von Nukleinsäuren, bei der durch die Insertion regiosomaler Rückgratveränderungen oder anderer beliebiger Nukleotide die Struktur, Konformation und Aktivität verändert werden können.

Obwohl momentan noch durch die ineffiziente Inkorporation von 3'-Desoxy- und 3'-O-Methyl-Pyrimidinen und multiplen Substitutionen eingeschränkt, ermöglicht die beschriebene Methode eine schnelle, matrizengerichtete Transkription von Nukleinsäurepolymeren mit gemischten 2'-5'/3'-5'-Rückgratverknüpfungen. Dies bildet die Basis für zukünftige In-vitro-Evolutionsexperimente und einen neuen Ansatz, um das strukturelle und funktionelle Repertoire von Nukleinsäureenzymen, -liganden und -sensoren zu erweitern.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch ein FEBS Long-term Fellowship (HM) und den Medical Research Council (Programm-Nr. U105178804) unterstützt.

Stichwörter: DNzyme · Nukleinsäuren · Nukleotide · Polymerasen · Regioselektivität

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15570–15573
Angew. Chem. **2015**, *127*, 15791–15794

- [1] R. Hartmann, J. Justesen, S. N. Sarkar, G. C. Sen, V. C. Yee, *Mol. Cell* **2003**, *12*, 1173–1185.
- [2] A. Ablasser, M. Goldeck, T. Cavlar, T. Deimling, G. Witte, I. Rohl, K. P. Hopfner, J. Ludwig, V. Hornung, *Nature* **2013**, *498*, 380–384.
- [3] a) R. Lohrmann, L. E. Orgel, *Tetrahedron* **1978**, *34*, 853–855; b) A. Kanavarioti, L. F. Lee, S. Gangopadhyay, *Origins Life Evol. Biospheres* **1999**, *29*, 473–487; c) P. A. Monnard, A. Kanavarioti, D. W. Deamer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13734–13740; d) J. W. Szostak, *J. Syst. Chem.* **2012**, *3*, DOI: 10.1002/anie.201203859.
- [4] A. E. Engelhart, M. W. Pownier, J. W. Szostak, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 390–394.
- [5] a) T. P. Prakash, K. E. Jung, C. Switzer, *Chem. Commun.* **1996**, 1793–1794; b) T. L. Sheppard, R. C. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.*

1996, *118*, 9810–9811; c) P. A. Giannaris, M. J. Damha, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 4742–4749; d) M. Wasner, D. Arion, G. Borkow, A. Noronha, A. H. Uddin, M. A. Parniak, M. J. Damha, *Biochemistry* **1998**, *37*, 7478–7486.

- [6] a) B. J. Premraj, N. Yathindra, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1998**, *16*, 313–328; b) L. Li, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2858–2865; c) J. Sheng, L. Li, A. E. Engelhart, J. Gan, J. Wang, J. W. Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 3050–3055.
- [7] a) K. E. Jung, C. Switzer, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6059–6061; b) H. Robinson, K. E. Jung, C. Switzer, A. H. J. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 837–838.
- [8] a) C. Cozens, V. B. Pinheiro, A. Vaisman, R. Woodgate, P. Holliger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 8067–8072; b) V. B. Pinheiro, A. I. Taylor, C. Cozens, M. Abramov, M. Renders, S. Zhang, J. C. Chaput, J. Wengel, S.-Y. Peak-Chew, S. H. McLaughlin, P. Herdewijn, P. Holliger, *Science* **2012**, *336*, 341–344.
- [9] M. J. Fogg, L. H. Pearl, B. A. Connolly, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 922–927.
- [10] A. F. Gardner, W. E. Jack, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 2545–2553.
- [11] N. Ramsay, A. S. Jemth, A. Brown, N. Crampton, P. Dear, P. Holliger, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5096–5104.
- [12] a) V. D. Axelrod, R. M. Vartikyan, V. A. Aivazashvili, R. S. Beabealashvili, *Nucleic Acids Res.* **1978**, *5*, 3549–3563; b) D. C. Montefiori, R. W. Sobol, Jr., S. W. Li, N. L. Reichenbach, R. J. Suhadolnik, R. Charubala, W. Pfleiderer, A. Modliszewski, W. E. Robinson Jr., W. M. Mitchell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 7191–7194.
- [13] B. J. Premraj, P. K. Patel, E. R. Kandimalla, S. Agrawal, R. V. Hosur, N. Yathindra, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *283*, 537–543.
- [14] C. Gloeckner, K. B. M. Sauter, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3115–3117; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3175–3178.
- [15] F. R. Bowler, C. K. Chan, C. D. Duffy, B. Gerland, S. Islam, M. W. Pownier, J. D. Sutherland, J. Xu, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 383–389.
- [16] a) J. R. Lorsch, D. P. Bartel, J. W. Szostak, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 2811–2814; b) S. Sinha, P. H. Kim, C. Switzer, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 40–41.
- [17] S. W. Santoro, G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4262–4266.
- [18] M. J. Cairns, A. King, L. Q. Sun, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2883–2889.
- [19] Z. Zaborowska, J. P. Furste, V. A. Erdmann, J. Kurreck, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 40617–40622.
- [20] B. J. Premraj, S. Raja, N. Yathindra, *Biophys. Chem.* **2002**, *95*, 253–272.
- [21] Y. Liu, E. Holmstrom, J. Zhang, P. Yu, J. Wang, M. A. Dyba, D. Chen, J. Ying, S. Lockett, D. J. Nesbitt, A. R. Ferre-D'Amare, R. Sousa, J. R. Stagno, Y. X. Wang, *Nature* **2015**, *522*, 368–372.
- [22] Z. Zaborowska, S. Schubert, J. Kurreck, V. A. Erdmann, *Febs Lett.* **2005**, *579*, 554–558.
- [23] B. Wang, L. Q. Cao, W. Chiuaman, Y. F. Li, Z. Xi, *Biochemistry* **2010**, *49*, 7553–7562.
- [24] B. Nawrot, K. Widera, M. Wojcik, B. Rebowska, G. Nowak, W. J. Stec, *FEBS J.* **2007**, *274*, 1062–1072.
- [25] J. Guo, N. Xu, Z. Li, S. Zhang, J. Wu, D. H. Kim, M. Sano Marma, Q. Meng, H. Cao, X. Li, S. Shi, L. Yu, S. Kalachikov, J. J. Russo, N. J. Turro, J. Ju, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 9145–9150.

Eingegangen am 16. September 2015

Online veröffentlicht am 3. November 2015