

Orthogonale Assemblierung von Proteinen auf DNA-Nanostrukturen mithilfe von Relaxasen

Sandra Sagredo, Tobias Pirzer, Ali Aghebat Rafat, Marisa A. Goetzfried, Gabriel Moncalian, Friedrich C. Simmel* und Fernando de la Cruz*

Abstract: DNA-bindende Proteine erlauben die sequenzspezifische Modifikation von DNA-basierten Nanostrukturen. Hier untersuchen wir die Eignung von Relaxaseproteinen – speziell *TrwC*, *TrAl* und *MobA* – für die Nanofabrikation. Relaxasen sind Komponenten des bakteriellen Konjugationsmechanismus, bei dem Plasmide zwischen Bakterien ausgetauscht werden, wobei sie an DNA durch eine kovalente Phosphotyrosinbindung binden. Wir untersuchen die Anbindung der Relaxasen an zwei prototypische DNA-Origamistrukturen – stabförmige Sechs-Helix-Bündel und flache rechteckige Origami-Platten. Die Proteine zeigen orthogonale Anbindungseigenschaften mit Ausbeuten von 40–50 % pro Bindestelle, vergleichbar mit alternativen Funktionalisierungsmethoden. Die Ausbeuten variieren zwischen den Origamistrukturen und hängen auch von der Position der Bindestellen ab. Aufgrund ihrer Spezifität für einzelsträngige Zielsequenzen und ihrer orthogonalen Anbindeeigenschaften sind Relaxasen eine einzigartige Erweiterung des molekularen Werkzeugkastens für die Modifikation von DNA-Nanostrukturen.

Durch neuere Entwicklungen in der DNA-Nanotechnologie ist es heute möglich, molekulare Objekte aus DNA von nahezu beliebiger Form zu erzeugen.^[1] Diese Strukturen erlauben auch die nanometergenaue Anordnung funktionaler molekularer Komponenten oder Nanopartikel (wie z.B. Proteinen) in dreidimensionalen Konfigurationen. Eine der am häufigsten verwendeten Methoden ist dabei die DNA-Origami-Technik, bei der hunderte kurzer Oligonukleotide –

genannt „staples“ – dazu benutzt werden, einen langen DNA-Gerüststrang (den „scaffold“) in die gewünschte Form zu falten.^[1a,c]

Bislang wurde bereits eine Vielzahl von Ansätzen für die Funktionalisierung von DNA-Nanostrukturen mit Proteinen verfolgt. Eine häufig verwendete Modifikation ist Streptavidin, das mit einer Dissoziationskonstante von $K_D = 40 \text{ fM}$ ^[2] an Biotin bindet und damit eine der stärksten nicht-kovalenten Bindungen in der Natur bildet. Um Streptavidin an DNA-Nanostrukturen anzubinden, werden biotinylierte Oligonukleotidstränge an die gewünschte Position innerhalb der Struktur eingebaut. Die effektive Ausbeute der Streptavidinanbindung an Origamistrukturen ist ca. 85 % pro Bindestelle.^[3] Natürlich vorkommende DNA-bindende Proteine zeigen typische Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich und können somit ebenfalls für die Modifikation von DNA-Nanostrukturen verwendet werden. Ein Beispiel hierfür sind Zinkfingerproteine, die in der Gegenwart von Zn^{2+} an DNA binden und auf DNA-Nanostrukturen effektive Anbindungsrationen von 30–70 % aufweisen.^[4] Andere Proteine, die im Zusammenhang mit DNA-Origamistrukturen verwendet wurden, sind DNA-Antikörper-Konjugate^[5] oder modifizierte Proteine mit sogenannten His-tags,^[6] Snap- und Halo-tags.^[7] Andere kovalente Konjugationstechniken wie die Kopplung mit Transglutaminasen^[8] oder Methyltransferasen,^[9] exprimierte Proteinligation und enzymatische Ligations^[10] stellen ebenfalls bindungsspezifische Methoden mit kontrollierter Stöchiometrie dar. Alternativ werden vielfach Maleimid- oder N-Hydroxysuccinimid-funktionalisierte Linkermoleküle für die kovalente Ankopplung verwendet (für eine umfassende Übersicht vgl. Lit. [11]). Der Nachteil der meisten der erwähnten Methoden ist der erforderliche Arbeitsaufwand sowie die Beeinträchtigung der Struktur und Aktivität der Proteine durch chemische Modifikationen.

Hier verwenden wir eine neuartige Strategie zur Ankopplung an DNA auf der Grundlage von Relaxaseproteinen. Relaxasen sind an der Prozessierung von DNA während der bakteriellen Konjugation beteiligt,^[12] dem horizontalen Gentransfer zwischen Bakterien. Als Endonukleasen schneiden sie einzelsträngige DNA und sind anschließend kovalent an DNA angebunden. Aufgrund ihrer Sequenzspezifität, Orthogonalität und der Eigenschaft, kovalente Bindungen mit Oligonukleotiden ausbilden zu können, bieten Relaxasen eine zu bestehenden Methoden möglicherweise überlegene Alternative für die Konjugation von Proteinen an DNA. Relaxasen gehören zur HUH-Protein-Superfamilie,^[13] und die dreidimensionale Struktur einiger Relaxasen ist bekannt.^[14] Ihre Form ähnelt einer linken Hand, wobei ein β -Faltblatt als „Handfläche“ das HUH-Motiv (H: Histidin, U:

[*] S. Sagredo, Dr. G. Moncalian, Prof. Dr. F. de la Cruz
Departamento de Biología Molecular e Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, Universidad de Cantabria-Consejo Superior de Investigaciones Científicas-SODERCAN
Albert Einstein 22, 39011 Santander (Spanien)
E-Mail: delacruz@unican.es

Dr. T. Pirzer, A. Aghebat Rafat, M. A. Goetzfried,
Prof. Dr. F. C. Simmel
Physik-Department E14 und ZNN/WSI, TU München
Am Coulombwall 4a, 85748 Garching (Deutschland)
E-Mail: simmel@tum.de

✉ Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201510313> zu finden.

© 2016 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.

eine hydrophobe Aminosäure) enthält und für die Koordination von Metallen zuständig ist. Eine α -Helix als „Daumen“ enthält das katalytische Tyrosin. Diese konservierten Reste bilden das aktive Zentrum jeder Relaxase und ermöglichen die Spaltung einer Phosphodiesterbindung in einer spezifischen Plasmid-DNA-Sequenz, der sogenannten *nic*-Stelle. Jedes konjugative Plasmid hat seine eigene Relaxase für eine bestimmte *nic*-Region, weswegen die Zahl der Relaxase-*nic*-Paare enorm ist. Die Spaltungsreaktion findet auch *in vitro* an einzelsträngiger DNA statt, die die *nic*-Stelle enthält.^[15] Diese Region enthält eine „Inverted Repeat“-Sequenz (IRS) und einen AT-reichen Bereich, der der *nic*-Stelle nachgeschaltet ist. Nach der Bindung an einzelsträngige DNA *in vitro* biegt die Relaxase ihr Substrat in eine U-Form und legt die *nic*-Stelle in ihr aktives Zentrum. Hier erzeugt das Tyrosin ein kovalentes 5'-Phosphotyrosin-Intermediat und ein freies 3'-OH-Ende (Abbildung 1). In diesem Zustand befinden sich Spaltung und Rück-Ligation des Substrats in einem dynamischen Gleichgewicht.^[15b, 16] Je nach Protein und Zielsequenz binden Relaxasen ihre *nic*-Stelle mit einem K_D zwischen 1 nm und 400 nm.

Im Folgenden verwenden wir die N-terminale Domäne der Relaxase TrwC vom Plasmid R388 (TrwC_{R388}), TraI von R100 (TraI_{R100}), MobA von R1162 (MobA_{R1162}) und TraI von

pKM101 (TraI_{pKM101}). Alle Relaxasedomänen sind kleine monomere Proteine (20–30 kDa) mit niedrigem K_D ,^[15a, 17] die leicht modifiziert und mit anderen Proteinen wie z. B. fluoreszenten Proteinen (Abbildungen S6, S7 und S9 in den Hintergrundinformationen) fusioniert werden können. TraI_{R100} und TrwC_{R388} können die *nic*-Stelle auch ohne den distalen Abschnitt der IRS spalten, und ihre Dissoziationskonstanten für einzelsträngige R100 und R388 *nic*-Regionen wurden zu 2.4 nm bzw. 320 nm bestimmt.^[17b] Es wurde auch gezeigt, dass MobA_{R1162} effektiv an die komplette IR binden kann, jedoch in Abwesenheit des distalen Arms beeinträchtigt ist.^[15a] Relaxase TraI_{pKM101} wurde bislang nicht genauer charakterisiert, aber aufgrund einer Sequenzübereinstimmung von 51 % mit TrwC_{R388} bzw. 37.7 % mit TraI_{R100} ist ein ähnliches Verhalten zu erwarten. Zudem ist die Zielsequenz von pKM101 zu 64.7 % identisch mit der Zielsequenz von R100. Der Vergleich von Zielsequenzen mit und ohne vollständige IRS hat gezeigt, dass in der pKM101-Zielsequenz die komplette IRS nötig ist (Abbildung S8).

Als DNA-Origamistrukturen wurden in dieser Arbeit stabförmige Sechs-Helix-Bündel (6HB) sowie flache, torsionskorrigierte Rechteckstrukturen (tcRO) mit den Maßen 430 nm \times 5 nm bzw. 90 nm \times 60 nm verwendet. Die Bindestellen der Zielsequenz wurden mit einem doppelsträngigen Stamm versehen, der als steife Verbindung zur Nanostruktur dient, gefolgt von einem einzelsträngigen Bereich mit der *nic*-Stelle (Abbildungen 1 A und S10 für weitere Details). Entlang seiner Achse wurde jedes 6HB mit Bindepositonen für die erwähnten Relaxasen ausgestattet. Um die lokale Konzentration an Bindestellen zu erhöhen, wurde jede Bindepotition (Abbildung 1 B und Hintergrundinformationen) mit fünf Bindestellen für jeweils eine bestimmte Relaxase ausgestattet. Aufgrund der geringen Größe der Relaxasendomänen verwendeten wir Fusionsproteine aus Relaxasen und den fluoreszierenden Proteinen mKATE oder mCFP (45–62 kDa), die in TEM-Bildern besser identifiziert werden konnten. Jede Relaxase wurde für 24 h mit 6HB inkubiert, die alle vier Bindepositonen enthielten. Nach Inkubation und Aufreinigung wurde die Anzahl der besetzten Bindepositonen in den TEM-Bildern bestimmt (Abbildung 2). Die sich ergebenden Anbindeausbeuten pro Position waren 93 % für TraI_{R100}mKATE, 84 % für TraI_{pKM101}mCFP, 73 % für TrwC_{R388}mCFP und 34 % für MobA_{R1162}mCFP.

Da die verwendeten 6HB alle vier Bindepositonen enthielten, konnte die Spezifität jeder Relaxase für ihre Zielsequenz bestimmt werden (Abbildung 2). Die Proteine TraI_{R100}mKATE, TrwC_{R388}mCFP und MobA_{R1162}mCFP zeigen eine äußerst sequenzselektive Anbindung, wobei die unspezifischen Anbindungsrate zwischen 0 % und 7.1 % lagen (Abbildung 2). Ungeachtet ihrer hohen Affinität für ihre Zielsequenz zeigte TraI_{pKM101}mCFP signifikante unspezifische Anbindung und wurde in der Folge nicht weiter zusammen mit den anderen Relaxasen verwendet.

In weiteren Experimenten verwendeten wir torsionskorrigierte Origami-Platten, die mit sechs Bindepositonen mit bis zu drei redundanten Bindestellen ausgestattet wurden (Abbildung 3 A). Zuerst verglichen wir die Anbindung der orthogonalen Relaxasen TraI_{R100}mKATE und TrwC_{R388}mCFP auf der Origami-Platte. Zur Messung der Anbindeausbeuten

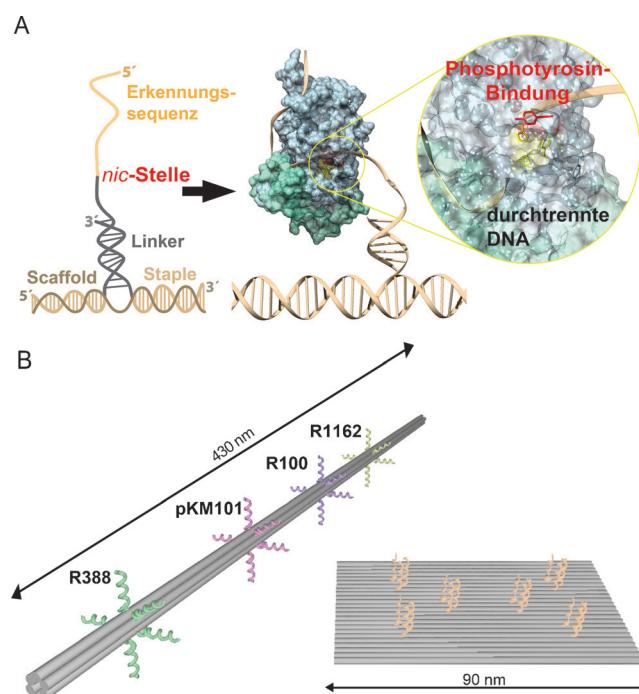


Abbildung 1. Kopplungsstrategie für Relaxasen auf DNA-Nanostrukturen. A) Verlängerte Staple-Stränge enthalten die Erkennungssequenz einer Relaxase und einige Basenpaare, die die Zielsequenz von der Nanostruktur separieren. Bindung der Relaxase an ihre spezifische Anbindestelle führt zur Biegung der DNA, wodurch die *nic*-Stelle in das aktive Zentrum der Relaxase positioniert wird. Vergrößerung: Das katalytische Tyrosin führt eine Umschreibungsreaktion aus, durch die es kovalent an das 5'-Phosphat zwischen den spaltbaren Nukleotiden gebunden wird. Dadurch wird die Relaxase kovalent an den verlängerten Staple-Strang gebunden. B) DNA-Nanostrukturen, die hier für die Untersuchung der Kopplung verwendet worden sind.

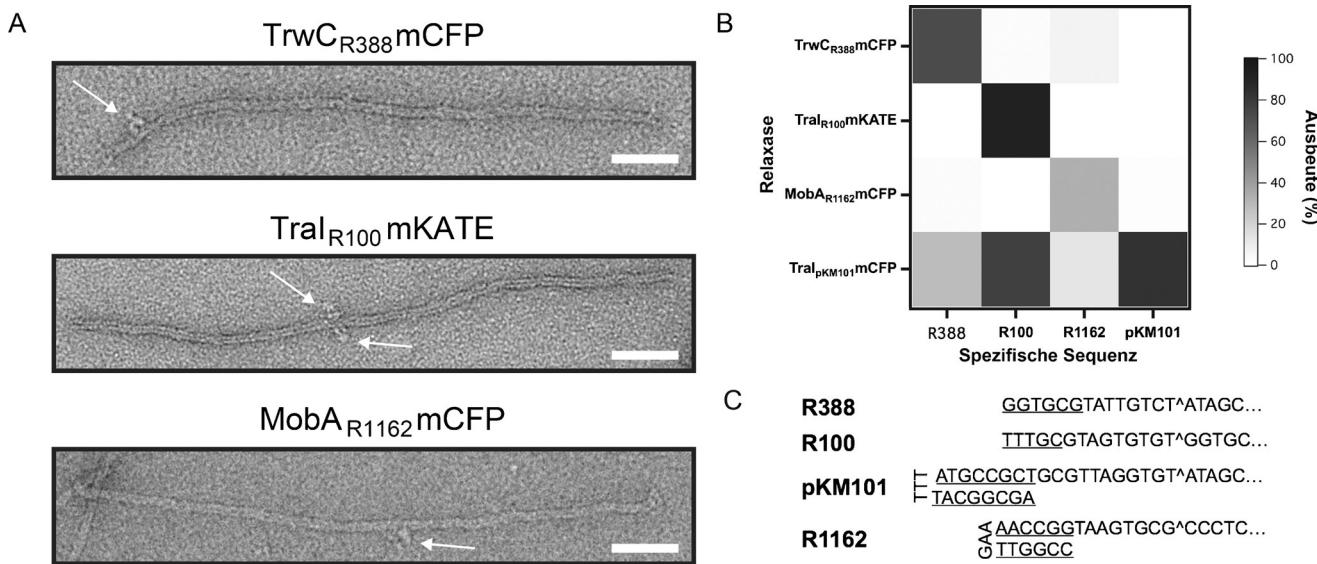


Abbildung 2. Orthogonale Bindung von Relaxasen an Sechs-Helix-Bündel (6HB). A) TEM-Bilder der Relaxasen TrwC_{R388}mCFP, TraI_{R100}mKATE und MobA_{R1162}mCFP gebunden an 6HB. Die Maßstabsleiste entspricht 50 nm. B) Graphische Darstellung der totalen Anbindeausbeuten und deren Orthogonalität. Für Details zur statistischen Analyse siehe die Hintergrundinformationen. C) Erkennungssequenzen der Relaxasen, die für diese Studie verwendet wurden. Die *nic*-Stelle ist mit einem ^ gekennzeichnet und der proximale Arm der Inverted Repeat-Sequenz ist unterstrichen.

nutzten wir nur Position #1 für TraI_{R100}mKATE und #5 für TrwC_{R388}mCFP, beide am Rand und nahe der Ecken des tcRO. Jedes Protein wurde für 24 h mit den tcRO inkubiert, wobei jede Platte zwei Bindestellen pro Bindeposition für jedes Protein enthielt, und anschließend aufgereinigt (siehe Abschnitt Methoden in den Hintergrundinformationen für weitere Details). Zur Visualisierung der angebundenen Proteine verwendeten wir Rasterkraftmikroskopie (AFM) (Abbildung 3). Als Anbindeausbeute fanden wir 70% für TraI_{R100}mKATE und 48% für TrwC_{R388}mCFP. Unspezifisches Anbinden an ungewünschte Positionen stellten wir zu 1% für TraI_{R100}mKATE und 3% für TrwC_{R388}mCFP fest.

Anschließend untersuchten wir eine mögliche Abhängigkeit der Relaxaseanbindung von der Bindeposition. Zu diesem Zweck wurden tcRO mit der R388-Sequenz an allen sechs Bindepositionen ausgestattet. Aus diesen Experimenten ließen sich die Anbindeausbeuten für den Rand des tcRO (Positionen Nr. 1, 2, 5 und 6 in Abbildung 3A) auf 40% bis 60% bestimmen. Die Ausbeuten für die Mitte des tcRO (Positionen Nr. 3 und 4, Abbildung 3C) zeigten jedoch signifikant größere Werte (zwischen 60% und 90%). Allgemein variierten die Ausbeuten von Experiment zu Experiment mit $\pm 10\%$ deutlich. Erstaunlicherweise fanden wir innerhalb dieser Unsicherheit keine eindeutige Abhängigkeit der Anbindeausbeute von der Anzahl der Bindestellen pro Bindeposition. Wurde nur eine einzelne Bindestelle für TrwC_{R388} verwendet, hatten die Ausbeuten ähnliche Werte (40% bis 50%, vgl. Hintergrundinformationen) wie bei multiplen Bindestellen.

Insgesamt waren die mit AFM bestimmten Anbindeausbeuten signifikant geringer als vom Massenwirkungsgesetz erwartet (vgl. Hintergrundinformationen für mehr Details). Beispielsweise wurde in früheren Experimenten mit einzelsträngigen Zielsequenzen inklusive *nic*-Stelle für TrwC_{R388} zur

Anbindung an ihre Sequenz ein K_D von 320 nm bestimmt.^[17b] Daraus sollte sich im *Gleichgewicht* eine Anbindeausbeute von 86% bei einer einzigen Bindestelle und sogar 99.7% bei drei Bindestellen ergeben, wenn man die Inkubationskonzentrationen von ca. 2 μ M für TrwC_{R388} bzw. 100 nm für tcRO berücksichtigt. Da bei der Abbildung im Rasterkraftmikroskop aufgereinigte Proben in reinem Puffer (also ohne Relaxasen) verwendet wurden, führt eine Verschiebung des Bindegleichgewichts zu einer Ablösung der Proteine von ihren Zielsequenzen und somit zu einer verringerten scheinbaren Anbindeausbeute. Dies ist für relativ große K_D -Werte im nanomolaren Bereich im Prinzip unumgänglich.

Da die kovalente Phosphotyrosinbindung einer Relaxase mit der *nic*-Stelle im dynamischen Gleichgewicht mit dem ungebundenen Zustand steht, verwendeten wir auch Phosphorothioat-modifizierte „Suicide“-Oligonukleotide, um das Gleichgewicht zur kovalenten Bindung hin zu verschieben (und somit einen niedrigeren K_D zu erhalten). In diesen Oligonukleotiden ist das 3'-Sauerstoffatom an der spaltbaren Phosphodiesterbindung durch ein Schwefelatom ersetzt, was die Rückreaktion verhindert.^[18] Überraschenderweise wurde die Anbindeausbeute mit diesen Oligonukleotiden aber nicht verbessert (siehe Hintergrundinformationen für mehr Details). Die theoretisch erwartete starke Ankopplung durch eine kovalente Bindung spiegelt sich mithin nicht in der Anbindeeffizienz wider.

Unsere Resultate stehen im Einklang mit Ergebnissen anderer Ansätze zur Modifikation von DNA-Origami mit Proteinen. Die Anbindung von Streptavidin an Biotin zeigte nur eine Ausbeute von etwa 85%^[3] (bei einem theoretischen Wert von nahezu 100%), und auch mit kovalenten Anbindestrategien wurden experimentell nur Ausbeuten von 84–90% erzielt.^[3] Abgesehen von der oben erwähnten Verschiebung des Bindegleichgewichts können Anbindeausbe-

A

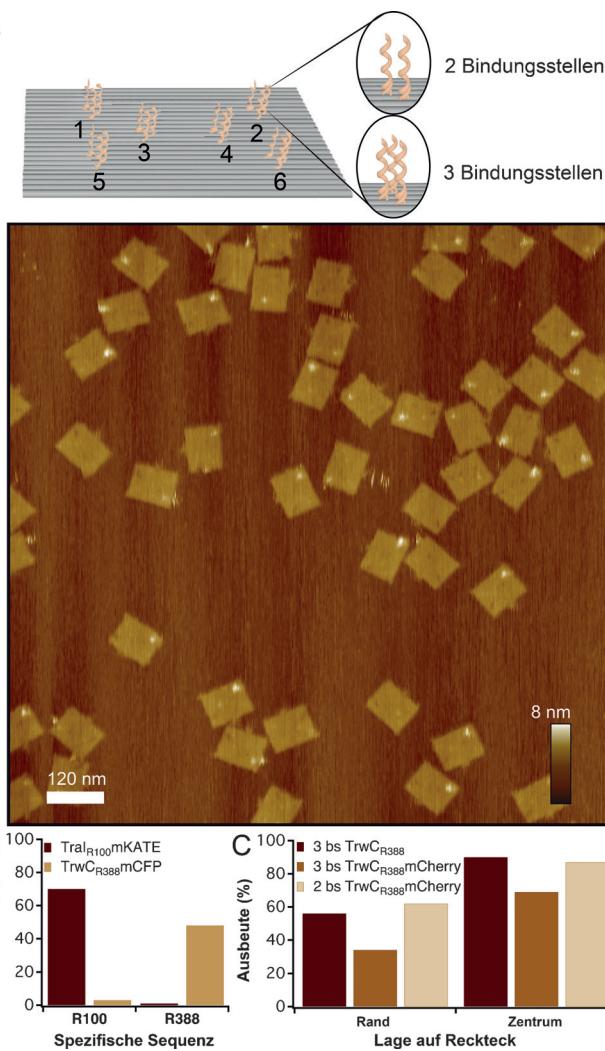


Abbildung 3. Positionsabhängige Bindung der Relaxasen an die rechteckige DNA-Platte tcRO. A) Oben: Darstellung der sechs Anbindepositionen mit jeweils zwei oder drei Bindestellen. Unten: AFM-Bild von Nanostrukturen, die mit Tral_{R100}mKATE an Position 1 ausgestattet wurden. B) Bindeausbeuten von TrwC_{R388}mCFP und Tral_{R100}mKATE an den verfügbaren Bindestellen. Die Relaxasen binden bevorzugt an ihre spezifische Zielsequenz. C) Bindeausbeute von TrwC_{R388} an tcRO, ausgestattet mit zwei bzw. drei Zielsequenzen. Die Anbindepositionen am Rand des tcRO (1, 2, 5 und 6) zeigen geringere Ausbeuten als die in der Mitte (3 und 4). Für Details zur statistischen Analyse siehe die Hintergrundinformationen.

ten an Origamistrukturen noch durch weitere Faktoren verringert sein. Einige Zielsequenzen könnten nicht zugänglich sein oder schlichtweg fehlen (z.B. aufgrund fehlender Staples), und der Zugang zur Anbindestelle könnte durch deren Geometrie oder auch durch die Form und Flexibilität der zugrundeliegenden Origamistuktur beeinflusst sein. Beispielsweise waren in unseren Experimenten mit Sechs-Helix-Bündeln die Zielsequenzen von allen Seiten zugänglich und wir konnten höhere Ausbeuten beobachten als für tcRO-Strukturen.

Wir haben hier DNA-bindende Relaxaseproteine als vielversprechende Moleküle zur sequenzgesteuerten Proteinmodifikation von DNA-Nanostrukturen vorgestellt. Die

Anbindeausbeuten auf DNA-Origamistrukturen bewegten sich zwischen 40–50% für eine einzelne Anbindungsstelle und waren somit vergleichbar mit anderen Modifikationsstrategien. Je nach Geometrie der Strukturen, der spezifischen Relaxase und auch der Verwendung von redundanten Bindestellen konnten effektive Ausbeuten von bis zu 90% erreicht werden. Bei weiterer Optimierung sollte es möglich sein, die kovalente Phosphotyrosinbindung zwischen Relaxasen und Zielsequenz zu nutzen und damit noch höhere Anbindeausbeuten zu erreichen. Zwei der vier untersuchten Relaxasen (TraI vom Plasmid R100 und TrwC von R388) zeigten sehr gut orthogonales Anbindeverhalten. Relaxasen können einfach verändert und mit anderen Proteinen fusioniert werden. Da viele Relaxasen aus verschiedenen Quellen und mit einzigartigen Zielsequenzen zur Verfügung stehen, könnten sie in eine ganze Familie von orthogonalen und sequenzspezifischen Proteinlinkern für die DNA-Nanotechnologie entwickelt werden. Von besonderem Interesse könnte auch deren Anwendung *in vivo* für die biologische Erzeugung von DNA-Protein-Hybridstrukturen und die Modifikation von DNA-Nanostrukturen sein.

Danksagung

Die Autoren danken der Volkswagen Stiftung (Az. 86 195-1), der European Commission FP7 Projekt Nr. 248919 (BACTOCOM), der DFG (SFB 1032 TP A2 und Nanosystems Initiative Munich) sowie EMBO und der Volkswagen-Stiftung (Az. 86 195-1) für finanzielle Unterstützung. Weiterhin danken wir F. Praetorius für die Bereitstellung des M13-Origami-Scaffolds und A. Kuzyk für initierende Arbeiten an diesem Projekt.

Stichwörter: Biokonjugation · DNA-Nanotechnologie · DNA-Origami · Konjugation · Relaxasen

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 4348–4352
Angew. Chem. **2016**, *128*, 4421–4425

- [1] a) P. W. K. Rothemund, *Nature* **2006**, *440*, 297–302; b) S. M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Höglberg, F. Graf, W. M. Shih, *Nature* **2009**, *459*, 414–418; c) B. Kick, F. Praetorius, H. Dietz, D. Weuster-Botz, *Nano Lett.* **2015**, *15*, 4672–4676.
- [2] N. M. Green, *Methods Enzymol.* **1990**, *184*, 51–67.
- [3] N. V. Voigt, T. Tørring, A. Rotaru, M. F. Jacobsen, J. B. Ravnsbæk, R. Subramani, W. Mamdouh, J. Kjems, A. Mokhir, F. Besenbacher, K. V. Gothelf, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 200–203.
- [4] E. Nakata, F. F. Liew, C. Uwatoko, S. Kiyonaka, Y. Mori, Y. Katsuda, M. Endo, H. Sugiyama, T. Morii, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2421–2424; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 2471–2474.
- [5] a) T. Yamazaki, J. G. Heddle, A. Kuzuya, M. Komiya, *Nanoscale* **2014**, *6*, 9122–9126; b) A. Shaw, E. Benson, B. Höglberg, *ACS Nano* **2015**, *9*, 4968–4975.
- [6] a) R. P. Goodman, C. M. Erben, J. Malo, W. M. Ho, M. L. McKee, A. N. Kapanidis, A. J. Turberfield, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1551–1557; b) W. Shen, H. Zhong, D. Neff, M. L. Norton, J. Am. Chem. Soc. **2009**, *131*, 6660–6661.
- [7] B. Saccà, R. Meyer, M. Erkelenz, K. Kiko, A. Arndt, H. Schroeder, K. S. Rabe, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9378–9383; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 9568–9573.

- [8] J. Tominaga, Y. Kemori, Y. Tanaka, T. Maruyama, N. Kamiya, M. Goto, *Chem. Commun.* **2007**, 401–403.
- [9] V. G. Metelev, E. A. Kubareva, O. V. Vorob'eva, A. S. Romanenkov, T. S. Oretskaya, *FEBS Lett.* **2003**, 538, 48–52.
- [10] a) S. Takeda, S. Tsukiji, T. Nagamune, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2407–2410; b) R. S. Sørensen, A. H. Okholm, D. Schaffert, A. L. B. Kodal, K. V. Gothelf, J. Kjems, *ACS Nano* **2013**, *7*, 8098–8104.
- [11] a) Y. R. Yang, Y. Liu, H. Yan, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 1381–1395; b) B. Saccà, C. M. Niemeyer, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5910–5921.
- [12] F. de la Cruz, L. S. Frost, R. J. Meyer, E. L. Zechner, *FEMS Microbiol. Rev.* **2010**, *34*, 18–40.
- [13] M. Chandler, F. de la Cruz, F. Dyda, A. B. Hickman, G. Moncalián, B. Ton-Hoang, *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 525–538.
- [14] a) A. Guasch, M. Lucas, G. Moncalián, M. Cabezas, R. Pérez-Luque, F. X. Gomis-Rüth, F. de la Cruz, M. Coll, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 1002–1010; b) S. Datta, C. Larkin, J. F. Schildbach, *Structure* **2003**, *11*, 1369–1379; c) A. F. Monzingo, A. Ozburn, S. Xia, R. J. Meyer, J. D. Robertus, *J. Mol. Biol.* **2007**, *366*, 165–178; d) J. S. Edwards, L. Betts, M. L. Frazier, R. M. Pollet, S. M. Kwong, W. G. Walton, W. K. Ballentine, J. J. Huang, S. Habibi, M. Del Campo, J. L. Meier, P. B. Dervan, N. Firth, M. R. Redinbo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 2804–2809; e) R. P. Nash, S. Habibi, Y. Cheng, S. A. Lujan, M. R. Redinbo, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 5929–5943.
- [15] a) M. K. Bhattacharjee, R. J. Meyer, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 4563–4568; b) M. Llosa, G. Grandoso, F. de la Cruz, *J. Mol. Biol.* **1995**, *246*, 54–62.
- [16] W. Pansegrouw, E. Lanka, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 13068–13076.
- [17] a) M. J. Harley, J. F. Schildbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 11243–11248; b) M. Lucas, B. Gonzalez-Perez, M. Cabezas, G. Moncalián, G. Rivas, F. de la Cruz, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 8918–8926.
- [18] B. González-Pérez, M. Lucas, L. A. Cooke, J. S. Vyle, F. de la Cruz, G. Moncalián, *EMBO J.* **2007**, *26*, 3847–3857.

Eingegangen am 5. November 2015,
veränderte Fassung am 17. Dezember 2015
Online veröffentlicht am 24. Februar 2016