



# Sequenz-spezifischer Einbau von Enzym-Nukleotid-Chimären durch DNA-Polymerasen

Moritz Welter, Daniela Verga und Andreas Marx\*

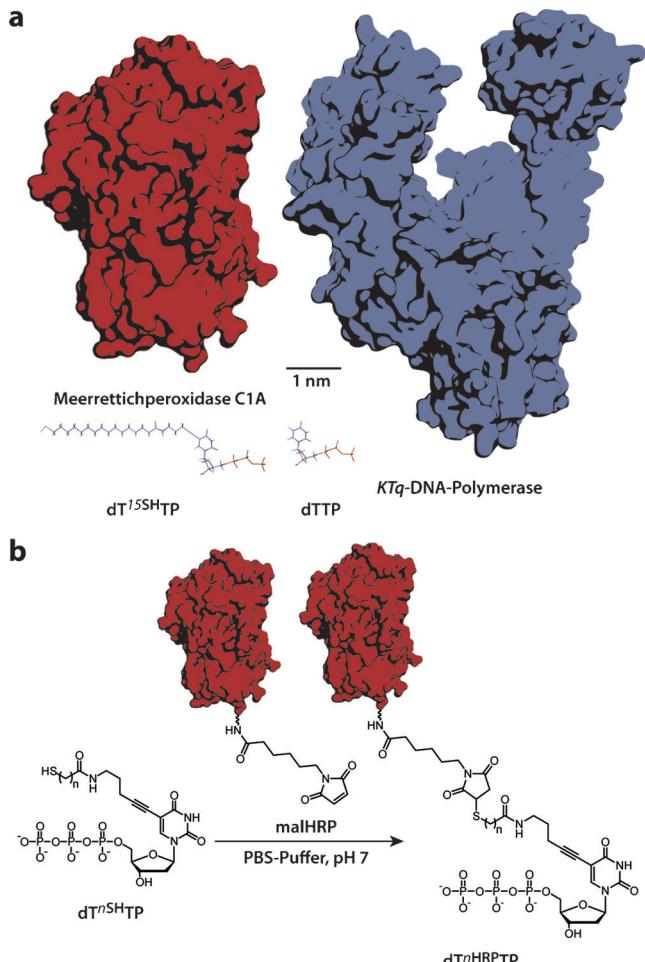
**Abstract:** Durch Erkennung von Form und Geometrie des naszierenden Nukleotidpaars stellen DNA-Polymerasen die hohe Selektivität der DNA-Replikation sicher. Man geht davon aus, dass DNA-Polymerasen mit hoher Replikationsgenauigkeit hierzu ein genau angepasstes aktives Zentrum enthalten, das nur geringe Abweichungen von den kanonischen Basenpaarungen toleriert. Dennoch ist bekannt, dass DNA-Polymerasen Nukleotide mit kleinen Modifikationen als Substrate akzeptieren, was von wesentlicher Bedeutung für zahlreiche grundlegende biotechnologische Anwendungen ist. Hier wird nun gezeigt, dass selbst DNA-Polymerasen, die eine hohe Replikationsgenauigkeit aufweisen, in der Lage sind, eine Nukleotid-Chimäre, die mit einem großen Protein wie der Meerrettichperoxidase modifiziert ist, als Substrat zu nutzen, obwohl diese „Fracht“ um ein Hundertfaches größer ist als das natürliche Substrat. Wir nutzen diese Eigenschaft, um ein Testsystem zu entwickeln, das den Nachweis von DNA und RNA in Einzelbasenauflösung mit bloßem Auge ermöglicht.

DNA-Polymerasen sind entstanden, um genetische Informationen exakt zu kopieren. Sie erkennen den Templatstrang und wählen mit hoher Genauigkeit aus dem Pool von vier 2'-Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) das kanonische Nukleotid zum Einbau aus. Diese strenge Erkennung von Form und Geometrie des naszierenden Nukleotidpaars beim Einbau durch die DNA-Polymerase ist ein grundlegendes Kriterium für die Selektivität der DNA-Replikation.<sup>[1]</sup> Deshalb wird angenommen, dass DNA-Polymerasen mit hoher Replikationstreue über hierfür genau angepasste aktive Zentren verfügen, die nur eine geringe Abweichung von den kanonischen Strukturen zulassen. Es ist folglich verblüffend, dass solche DNA-Polymerasen in der Lage sind, modifizierte Nukleotide als Substrate zu nutzen. Diese Eigenschaft ist fundamental für den Einsatz von DNA-Polymerasen in zahlreichen grundlegenden biotechnologischen Anwendungen wie der Sequenzierung und Diagnostik.<sup>[2]</sup>

Um Einblick in die Mechanismen zu gewinnen, die es DNA-Polymerasen ermöglichen, ungeachtet ihrer speziell angepassten aktiven Zentren modifizierte Nukleotide zu prozessieren, wurden strukturelle und funktionale Studien durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass Nukleotide,

die kleine Modifikationen wie Affinitäts-,<sup>[3]</sup> Spin-,<sup>[4]</sup> oder Redoxsonden,<sup>[5]</sup> Farbstoffe,<sup>[2a]</sup> Aminosäuren,<sup>[6]</sup> Nukleoside<sup>[7]</sup> oder kurze Oligonukleotide<sup>[8]</sup> tragen, Substrate für die Replikation von DNA durch DNA-Polymerasen sind.

Wir zeigen nun, dass sogar proteinmodifizierte dNTPs – ungeachtet ihrer Größe – als Substrat für die Replikation von Nukleinsäuresequenzen durch Hochpräzisions-DNA-Polymerasen geeignet sind (Abbildung 1a). Das Protein, in diesem Fall das ca. 40 kDa große Glykoprotein Meerrettichperoxidase (HRP) aus *Amoracia rusticana*,<sup>[9]</sup> wird hierbei



**Abbildung 1.** Größenvergleich der hier verwendeten Strukturen und Schema der Konjugationsstrategie. a) Maßstabsgetreuer Größenvergleich zwischen der *KTq*-DNA-Polymerase (PDB: 1KTQ), HRP C1A (PDB: 1HCH), dTTP und einem modifizierten dTTP, das einen C<sub>15</sub>-Thiol-Linker trägt (dT<sup>n</sup>SHTP). b) Konjugation der thiolmodifizierten Nukleotide (dT<sup>n</sup>SHTP) mit malHRP (Struktur abgeleitet von HRP C1A) durch Thiol-Maleimid-Reaktion.

[\*] M. Sc. M. Welter, Dr. D. Verga, Prof. Dr. A. Marx

Fachbereich Chemie  
Graduiertenschule Chemische Biologie Konstanz  
Universität Konstanz  
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)  
E-Mail: andreas.marx@uni-konstanz.de

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter: <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201604641> zu finden.

positionsspezifisch in den naszierenden DNA-Strang eingebaut. Dabei wird die Fähigkeit des Enzyms, selbst unter rauen Umweltbedingungen wie erhöhte Temperatur, großen pH-Schwankungen oder sogar in Gegenwart von chaotropen Reagentien, Farbsignale durch Oxidation eines Farbstoffs zu generieren, nicht beeinträchtigt. Diese Eigenschaften machen HRP zu einem der meistverwendeten Reporterenzyme in biochemischen Assays.<sup>[10]</sup> Basierend auf dem Befund, dass DNA-Polymerasen diese HRP-modifizierten dNTPs als Substrate nutzen können, haben wir ein Testsystem entwickelt, das die Detektion von DNA und RNA mit bloßem Auge bis hin zur Einzelbasenauflösung ermöglicht.

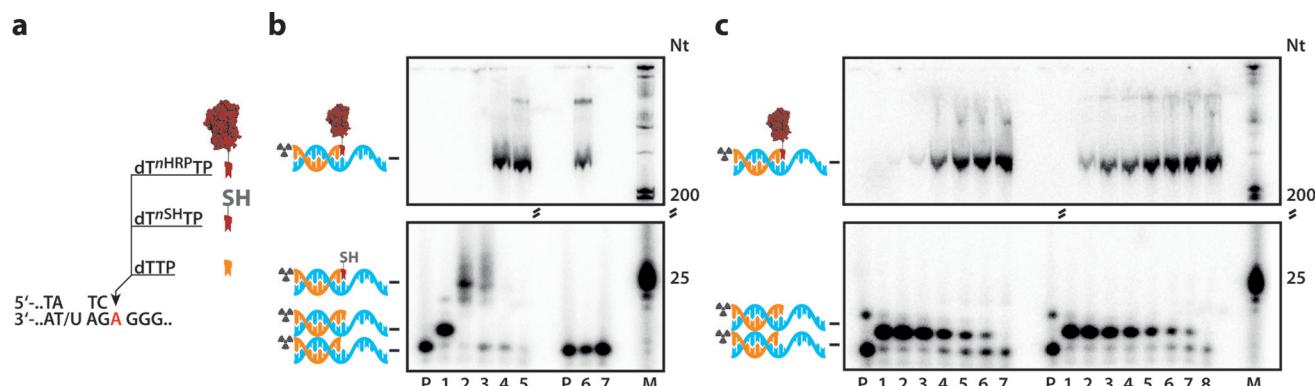
HRP-Spezies, die durch Umsetzung mit Maleimidohexansäure-N-hydroxysuccinimidester mit ein bis drei Maleimidgruppen aktiviert sind (malHRP), sind kommerziell erhältlich. Da sie eine Konjugation mit Zielmolekülen durch eine Thiol-Maleimid-Reaktion ermöglichen, die als eine der schnellsten Biokonjugationsreaktionen in wässrigen Bedingungen gilt und somit schnellen Umsatz und hohe Ausbeuten verspricht, wählten wir ein thiolmodifiziertes Nukleotid für die Konjugation an das aktivierte Enzym.<sup>[11]</sup>

Frühere Untersuchungen zeigten, dass C5-Desoxythymidin-Derivate meist sehr gut von DNA-Polymerasen akzeptiert werden.<sup>[12]</sup> Um zusätzlich den Einfluss der Länge des Linkers auf die Einbaueffizienz zu untersuchen, synthetisierten wir zwei Thymidinanaloga mit unterschiedlich langen Linkern auf Basis von  $\omega$ -Mercaptocarbonsäuren (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen; dT<sup>n</sup>S<sup>H</sup>TP). Hierfür folgten wir dem Syntheseschema, das zuvor schon für hydroxyfunktionalisierte Nukleotide vorgestellt worden war.<sup>[8a]</sup> Ausgehend von 5-Iod-2'-desoxyuridin wurde durch Sonogashira-Kupplung mit 5-Trifluoracetamid-1-pentin das Trifluoracetat(TFA)-geschützte, aminofunktionalisierte Nukleosid **1** hergestellt (Abbildung S2a). Das Nukleosid wurde anschließend zum Triphosphat umgesetzt (Abbildung S1b)

und in Ammoniumhydroxidlösung entschützt, um das Produkt **2** zu erhalten. Die  $\omega$ -Mercaptocarbonsäure-Linker wurden schließlich mithilfe des Peptidkupplungsreagens *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU) und *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF eingeführt, um die Endverbindungen dT<sup>7</sup>S<sup>H</sup>TP und dT<sup>15</sup>S<sup>H</sup>TP zu erhalten (Abbildung S1c; Abbildungen S10 und S11 für NMR-Spektren). Diese wurden anschließend mit malHRP durch einfache Inkubation in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) konjugiert (Abbildung 1b). Die Konjugate (dT<sup>n</sup>HRP-TP) wurden weiterhin per Anionenaustausch-FPLC (FPLC = fast protein liquid chromatography) isoliert und durch ESI-MS identifiziert (Abbildung S2).

Um zu prüfen, ob die synthetisierten Konjugate als Substrat für DNA-Polymerasen wirken können, führten wir Primer-Verlängerungsexperimente auf Basis eines Templaats durch, das für die B-Typ-Raf-Kinase(BRAF)-T1796A-Punktmutation codiert (Abbildung 2a; siehe Hintergrundinformationen für Sequenzen). Diese Punktmutation wird eng mit der Karzinogenese in Verbindung gebracht.<sup>[13]</sup> Der 21 Nukleotide lange, 5'-radioaktiv markierte Primer wurde dabei so konzipiert, dass er unmittelbar vor der Mutationsstelle endet, sodass ein einzelnes Desoxythymidinderivat eingebaut werden kann. Dieser Einbau wurde daraufhin durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) analysiert und durch Autoradiographie visualisiert.

Bei Verwendung der unkonjugierten Nukleotide, dT<sup>7</sup>S<sup>H</sup>TP und dT<sup>15</sup>S<sup>H</sup>TP, beobachteten wir, wie erwartet, eine Bande von verminderter Mobilität, was den Einbau des gegenüber dem natürlichen dTTP etwas sperrigeren Nukleotids durch die *KlenTaq*-DNA-Polymerase bestätigt (Abbildung 2, Bahnen 2 und 3; Abbildung S3 für das gesamte Gel). Die etwas unförmige Gestalt der Banden gegenüber denjenigen, bei denen natürliches dTTP zum Einsatz kam, könnte hierbei



**Abbildung 2.** PAGE von Primer-Verlängerungsexperimenten mit den synthetisierten Konjugaten. a) Ausschnitt aus der Sequenz des Primers und des Templaats um die Einbaustelle. b) Links: Ausschnitt einer Autoradiographie einer Primer-Verlängerungsreaktion mit 1  $\mu$ M an natürlichem dTTP (Bahn 1), den zwei thiolmodifizierten Nukleotiden (dT<sup>7</sup>S<sup>H</sup>TP und dT<sup>15</sup>S<sup>H</sup>TP; Bahnen 2 und 3) oder den beiden Konjugaten dT<sup>7</sup>HRP-TP und dT<sup>15</sup>HRP-TP (Bahnen 4 und 5) unter Verwendung der *KTq*-DNA-Polymerase und eines Templaats, das die BRAF-T1796A-Punktmutationsstelle abbildet. Die Proben wurden nach 10 min entnommen. Rechts: Primer-Verlängerungsreaktion mit dT<sup>15</sup>HRP-TP unter Verwendung der *RT-KTq*-DNA-Polymerase in An- (Bahn 6) und Abwesenheit (Bahn 7) einer RNA-Version der BRAF-Punktmutationsstelle. Die Proben wurden wieder nach 10 min entnommen. P: Primer, M: Marker, Nt: Nukleotide. Die ungenutzte Gel-Darstellung ist in den Hintergrundinformationen zu finden. c) Einbaukonkurrenzexperiment zwischen den Konjugaten und dTTP unter Verwendung der *KTq*-DNA-Polymerase. Die eingesetzten Verhältnisse für dT<sup>7</sup>HRP-TP (links) waren: 1) 0:1, 2) 1:1, 3) 3:1, 4) 19:1, 5) 49:1, 6) 99:1 und 7) 1:0. Für dT<sup>15</sup>HRP-TP (rechts): 1) 0:1, 2) 1:1, 3) 3:1, 4) 4:1, 5) 9:1, 6) 19:1, 7) 99:1 und 8) 1:0. Proben wurden nach 3 min entnommen. Die ungenutzte Gel-Darstellung ist in Abbildung S3 zu finden.

durch Interaktionen des freien Thiols mit der Gelmatrix hervorgerufen worden sein. Interessanterweise scheint bei den unkonjugierten Nukleotiden dasjenige mit dem kürzeren Linker ( $dT^{7SH}TP$ ) besser von der DNA-Polymerase akzeptiert zu werden.

Bei Verwendung der Konjugate  $dT^{7H}TP$  und  $dT^{15H}TP$  (Bahnen 4 und 5) erhielten wir eine Bande mit drastisch verminderter Mobilität (entsprechend ca. 250 Nt), was auf einen Einbau der Nukleotide mitsamt ihrer „Fracht“ schließen lässt. Wir folgerten daraus, dass Enzym-modifizierte Nukleotide – trotz ihrer Größe – sehr wohl von DNA-Polymerasen als Substrat akzeptiert werden. Dieser Befund wird zudem auch von Natriumdodecylsulfat(SDS)-PAGE-Experimenten bestätigt, wo eine Verschiebung der Proteinbande zu höheren Molekulargewichten beobachtet wird (Abbildung S4).

Interessanterweise scheinen für die durch den  $C_{15}$ -Linker verbundenen Konjugate besser akzeptiert zu werden als die kürzere Variante. Wir beobachteten zudem noch eine zweite Bande mit verminderter Mobilität, was auf einen doppelten Einbau hinweist. Um die Möglichkeit eines mehrfachen Einbaus der Konjugate zu evaluieren, führten wir Primer-Verlängerungsexperimente mit einem Templat durch, das für elf aufeinanderfolgende  $dTMP$ -Einbauten codiert (Abbildungen S5 und S6, rechts). Dabei zeigte sich, dass das Konjugat mit dem längeren Linker mehrfach hintereinander eingebaut werden kann, während beim Konjugat mit dem kürzeren Linker lediglich ein einfacher Einbau beobachtet wird. Dies lässt darauf schließen, dass ein zu geringer Abstand zwischen Nukleotid und „Fracht“ die DNA-Polymerase in ihrer Aktivität stört. Für  $dT^{15H}TP$  untersuchten wir anschließend auch die Möglichkeit eines periodischen Einbaus in einen Primer-Strang (Abbildung S6). Hier konnten auf einem 9% dPAGE bis zu vier Einbauten nachgewiesen werden, wobei das Gel die Auflösung weiterer Einbauten durch die immer stärker verminderte Migration verhindert. Die Verwendung von weniger dichten Gelen führte jedoch zu verschmierten Banden, die sich nicht mehr auswerten ließen. Um die Einbaueffizienz und den Einfluss des Linkers einzuschätzen zu können, führten wir Konkurrenzexperimente zwischen den Konjugaten und natürlichem  $dTTP$  durch (Abbildungen 2c und S7), und zwar in Form von Einzeleinbauexperimenten, in denen die modifizierten Nukleotide direkt mit ihrem natürlichen Pendant konkurrieren. Dieser experimentelle Aufbau war bereits für ähnliche Zwecke genutzt worden.<sup>[14]</sup> Unter Verwendung der  $KTq$ -DNA-Polymerase beobachteten wir, dass das natürliche  $dTTP$  33-mal besser als  $dT^{7H}TP$  (Abbildung 2c, links) und nur 6-mal besser als  $dT^{15H}TP$  prozessiert wird (Abbildung 2c, rechts). Dies zeigt eindrücklich den Einfluss der Linker-Länge auf die Kompatibilität mit der Polymerase durch die Vergrößerung des Abstands zwischen selbiger und der Fracht.

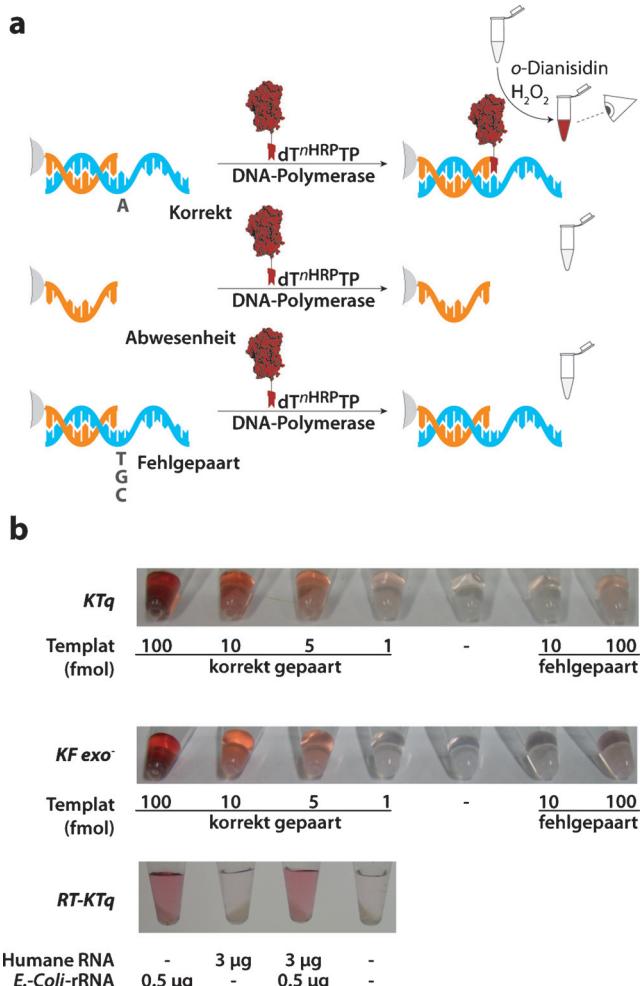
Weiterhin konnten wir zeigen, dass auch das exonukleasedefiziente Klenow-Fragment der *E. Coli*-DNA-Polymerase I ( $KFexo^-$ ) die modifizierten Nukleotide als Substrat akzeptiert. Hier fanden wir eine 68-fach verringerte Einbaueffizienz für  $dT^{7H}TP$  und eine 21-fach verringerte Effizienz für  $dT^{15H}TP$  (Abbildung S8).

Als nächstes untersuchten wir die modifizierten Nukleotide auch im Hinblick auf reverse Transkription mithilfe der  $RT-KTq$ -DNA-Polymerase, einer Mutante der  $KTq$ -DNA-Polymerase mit Reverse-Transkriptase-Aktivität. Diese DNA-Polymerase kann einen DNA-Primer-Strang auf Basis sowohl von DNA- als auch von RNA-Template verlängern.<sup>[15]</sup> Hierzu setzten wir eine RNA-Version des gleichen Sequenzkontexts wie für die Primer-Verlängerungsexperimente mit der  $KTq$ -DNA-Polymerase ein (Abbildung 2b, Bahnen 6 und 7; Sequenz in den Hintergrundinformationen). Da  $dT^{15H}TP$  mit höherer Effizienz eingebaut wird, beschränkten wir uns hier auf dieses Nukleotid. Dabei stellten wir die gleiche charakteristische Verschiebung der Primer-Banden wie in den vorigen Experimenten fest, was die Nutzbarkeit der Nukleotide in Reverse-Transkriptions-Anwendungen unter Beweis stellt.

Die Konjugation von HRP mit Oligonukleotiden wurde in der Vergangenheit bereits genutzt, um kolorimetrische Systeme zur Detektion von Nukleinsäuren zu ermöglichen.<sup>[16]</sup> Die kovalente Bindung an das 5'- oder 3'-Ende von Oligonukleotiden erlaubt jedoch nur Hybridisierungs-basierte Ansätze, die mit deutlichen Nachteilen in Sachen Empfindlichkeit und Selektivität einhergehen.<sup>[17]</sup> Im Unterschied dazu haben die hier vorgestellten Enzym-modifizierten Nukleotide das Potenzial, das kolorimetrische Signal von Peroxidase-unterstützten Tests mit der Vielseitigkeit und Genauigkeit einer DNA-Polymerasereaktion zu verbinden.

Um dieses Potenzial der proteinmodifizierten Nukleotide zu erkunden, entwarfen wir ein Verfahren, das auf der Verlängerung von Primern beruht, die an eine Festphase gebunden sind (Abbildung 3a). Durch die Templatabhängigkeit der DNA-Polymerase sollten dabei nur jene Primer durch Einbau der HRP-modifizierten Nukleotide verlängert werden, die sequenzspezifisch an ihre Zielsequenz gebunden haben. Somit sollte die An- oder Abwesenheit der Zielsequenz detektierbar sein (Abbildung 3A). Nach dem Entfernen des überschüssigen Konjugats führt die Zugabe eines Peroxidasensubstrats zu einem Farbsignal.<sup>[8b,c]</sup> Für dieses Experiment nutzten wir eine 5'-Biotin-immobilisierte Version des BRAF-Primers, der für die Primer-Verlängerungsexperimente in Lösung verwendet wurde. Mithilfe von  $dT^{15H}TP$  konnten wir so mit dem Einbau durch die  $KTq$ -DNA-Polymerase und anschließender Peroxidasenreaktion bis hinunter zu 1 fmol an Ziel-DNA detektieren (Abbildungen 3b und S9).

Zusätzlich zur bloßen Detektion der An- oder Abwesenheit einer Zielsequenz kann die intrinsische Genauigkeit der DNA-Polymerase auch dazu genutzt werden, Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) an der Einbaustelle zu unterscheiden (Abbildung 3a; korrekt und fehlgepaart). Wir untersuchten diese Anwendungsmöglichkeit, indem wir eine Zielsequenz einsetzen, die an der Einbaustelle über einen Thymidinrest verfügt, was zu einer T:T-Fehlpaarung führen würde. Dabei konnten wir eine starke Diskriminierung zwischen dem korrekt gepaarten und dem fehlgepaarten Templat feststellen (Abbildung 3b, korrekt gepaart/fehlgepaart), was es uns ermöglichte, zwischen 5 fmol des korrekt gepaarten und einem 20-fachen Überschuss (100 fmol) des fehlgepaarten Templat zu unterscheiden.



**Abbildung 3.** Eine mögliche Anwendung der Konjugate in einem Nachweisverfahren zur Detektion von Nukleinsäuren mit dem bloßen Auge. a) Schema des Nachweisverfahrens, das die enzymverknüpften Nukleotide einsetzt. Der Primer wird durch Biotin-Streptavidin-Interaktion auf einer Festphase immobilisiert. Nach der Hybridisierung mit der Zielsequenz werden DNA-Polymerase und Konjugat zugefügt. Im Anschluss an die Inkubation wird der Konjugatüberschuss durch wiederholte Filtration entfernt, und eine Farbstofflösung wird zugesetzt, was zu einem Farbsignal führt, das mit dem bloßen Auge wahrgenommen werden kann. b) Ergebnisse des oben gezeigten Nachweisverfahrens mit *KTq*- und *KFexo*<sup>-</sup>-DNA-Polymerase auf korrekt gepaarten und fehlgepaarten ssDNA-Templaten sowie der *RT-KTq*-DNA-Polymerase auf einem *E. Coli*-rRNA-Gemisch in Ab- und Anwesenheit eines Überschusses an menschlicher RNA. Für das Experiment wurden 1 μm dT<sup>15</sup>HRP-TP in einem Primer-Verlängerungsreaktionsgemisch 5 min (*KTq*/RT-*KTq*) oder 15 min (*KFexo*<sup>-</sup>) inkubiert.

Anschließend führten wir das Experiment zur Detektion von SNPs mithilfe der *KFexo*<sup>-</sup>-DNA-Polymerase durch, die bei Raumtemperatur aktiv ist und somit Vorteile im Hinblick auf einen möglichen Einsatz der Nukleotide in der patientennahen Labordiagnostik (POCT) bietet. Auch hier beobachteten wir ein Detektionslimit von 1 fmol sowie die starke Diskriminierung zwischen richtig gepaartem und fehlgepaartem Templat (Abbildungen 3b und S9).

Um das Testsystem auch auf RNA-Diagnostik, z. B. die Detektion von Pathogenen, erweitern zu können, führten wir

das Experiment auch mit der *RT-KTq*-DNA-Polymerase durch. Hierzu setzten wir einen zu einer Sequenz der 16s-rRNA von *E. Coli* komplementären Primer in Ab- und Anwesenheit eines sechsfachen Überschusses von humaner RNA ein. Dabei waren wir in der Lage, 0,5 μg an *E. Coli*-rRNA-Gemisch zuverlässig in weniger als 10 min nachzuweisen, ohne irgendeine Beeinträchtigung durch die menschliche RNA (Abbildung 3b, *RT-KTq*). Dieses Experiment wurde ohne jegliche Primer-Hybridisierungsschritte durchgeführt, obwohl der Primer dahingehend entworfen worden ist, dass er an einen teilweise doppelsträngigen Bereich der 16S-rRNA bindet. Die Menge an Zielsequenz, die mit dem Primer hybridisiert hat (und somit detektiert wurde), könnte daher deutlich geringer sein als die zugegebene Menge. Als minimale Nachweisgrenze erhielten wir auch für die von der *RT-KTq*-DNA-Polymerase katalysierte Reaktion einen Wert von 1 fmol, analog zur DNA (Abbildung S10).

Es wurde bereits berichtet, dass terminale Desoxynukleotidyltransferasen in der Lage sind, ohne Templatkontrolle proteinmodifizierte Nukleotide an das 3'-Ende einer einzelsträngigen DNA zu ligieren.<sup>[18]</sup> Darüber hinaus wurden effiziente Methoden für die Verknüpfung von modifizierten Nukleotiden und Proteinen nach dem Einbau durch die DNA-Polymerase entwickelt.<sup>[19]</sup>

Wir demonstrieren hier nun, dass der direkte, templatgesteuerte Einbau von proteinmodifizierten Nukleotiden durch DNA-Polymerasen mit hoher Replikationsgenauigkeit als neuer Weg zur Generierung von positionsspezifischen DNA-Protein-Konjugaten fungieren kann. Obwohl das „Fracht“-Protein (43 000 Å<sup>3</sup>) mehrere Größenordnungen größer als das natürliche Substrat ist (ca. 400 Å<sup>3</sup>, Berechnungsweise in den Hintergrundinformationen), sind diese proteinmodifizierten Nukleotide dennoch Substrate für die DNA-Polymerasen. Dies wird anhand des Beispiels von HRP-modifizierten Nukleotiden gezeigt, die in sequenzspezifischer Art und Weise in einen Primer-Strang einbaut werden, sobald die entsprechenden DNA- oder RNA-Zielsequenzen vorhanden sind. Darüber hinaus wird die katalytische Aktivität des Enzyms durch den Einbau nicht beeinträchtigt, sodass diese dazu genutzt werden kann, den Einbau des Nukleotids durch eine Farbreaktion mit bloßem Auge zu verifizieren. Dieser Versuchsaufbau bietet verschiedene Vorteile gegenüber vorherigen Ansätzen: Zum einen wird durch Konjugation von Enzym und Nukleotid ein vielseitiges Instrument geschaffen, dass das Potenzial bereithält, leicht in verschiedenen Sequenzkontexten angewendet zu werden, ohne Änderungen des Versuchsaufbaus zu bedingen. Zum anderen ermöglicht die Nutzung von DNA-Polymerasen zur Genotypisierung eine hohe Diskriminierung zwischen korrekt gepaarten und fehlgepaarten Templaten. Zu guter Letzt kann der Test bei Verwendung von mesophilen DNA-Polymerasen ohne aufwendige Laborausrüstung – z. B. Thermo-cycler – durchgeführt werden und erfüllt somit die Ansprüche der patientennahen Laboranalyse. Die Möglichkeit, Nukleotide, die kovalent mit Proteinen verbunden sind, durch DNA-Polymerasen einzubauen, ist somit äußerst vielversprechend für zukünftige Anwendungen.<sup>[20]</sup>

## Danksagung

Wir danken der DFG, der Alexander von Humboldt-Stiftung (Stipendium von D.V.) sowie der Graduiertenschule Chemische Biologie Konstanz für ihre Unterstützung.

**Stichwörter:** DNA-Replikation · DNA-Polymerasen · Meerrettichperoxidase · Nukleotide

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10131–10135  
*Angew. Chem.* **2016**, *128*, 10286–10290

- [1] a) T. W. Kim, J. C. Delaney, J. M. Essigmann, E. T. Kool, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15803–15808; b) E. T. Kool, H. O. Sintim, *Chem. Commun.* **2006**, 3665–3675.
- [2] a) D. R. Bentley et al., *Nature* **2008**, *456*, 53–59; b) T. D. Harris et al., *Science* **2008**, *320*, 106–109; c) S. Ishino, Y. Ishino, *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 465.
- [3] T. Ohbayashi, M. Kuwahara, M. Hasegawa, T. Kasamatsu, T. Tamura, H. Sawai, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2463–2468.
- [4] S. Obeid, M. Yulikov, G. Jeschke, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6782–6785; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6886–6890.
- [5] J. Balintova, J. Spacek, R. Pohl, M. Brazdova, L. Havran, M. Fojta, M. Hocek, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 575–587.
- [6] M. Kitaoka, Y. Tsuruda, Y. Tanaka, M. Goto, M. Mitsumori, K. Hayashi, Y. Hiraishi, K. Miyawaki, S. Noji, N. Kamiya, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 5387–5392.
- [7] A. R. Kore, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 793–795.
- [8] a) A. Baccaro, A. L. Steck, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 254–257; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 260–263; b) D. Verga, M. Welter, A. L. Steck, A. Marx, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 7379–7381; c) D. Verga, M. Welter, A. Marx, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 841–844.
- [9] L. M. Shannon, E. Kay, J. Y. Lew, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 2166–2172.
- [10] a) J. Everse, K. E. Everse, M. B. Grisham, *Peroxidases in chemistry and biology*, CRC, Boca Raton, **1991**; b) J. W. Tams, K. G. Welinder, *FEBS Lett.* **1998**, *421*, 234–236.
- [11] F. Saito, H. Noda, J. W. Bode, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1026–1033.
- [12] a) M. Hocek, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 9914–9921; b) A. Hottin, A. Marx, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 418–427.
- [13] H. Davies et al., *Nature* **2002**, *417*, 949–954.
- [14] a) S. Obeid, A. Baccaro, W. Welte, K. Diederichs, A. Marx, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 21327–21331; b) K. Bergen, A. L. Steck, S. Strutt, A. Baccaro, W. Welte, K. Diederichs, A. Marx, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11840–11843.
- [15] N. Blatter, K. Bergen, O. Nolte, W. Welte, K. Diederichs, J. Mayer, M. Wieland, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11935–11939; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 12154–12158.
- [16] a) M. S. Urdea, B. D. Warner, J. A. Running, M. Stempien, J. Clyne, T. Horn, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 4937–4956; b) S. S. Ghosh, P. M. Kao, A. W. McCue, H. L. Chappelle, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 71–76; c) R. P. van Gijlswijk, M. P. van de Put, V. Bezrookove, J. Wiegant, H. J. Tanke, A. K. Raap, *His-tochem. Cell Biol.* **2000**, *113*, 175–180.
- [17] M. Strerath, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7842–7849; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 8052–8060.
- [18] R. S. Sørensen, A. H. Okholm, D. Schaffert, A. L. B. Kodal, K. V. Gothelf, J. Kjems, *ACS Nano* **2013**, *7*, 8098–8104.
- [19] a) J. Dadová, P. Orság, R. Pohl, M. Brázdová, M. Fojta, M. Hocek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10515–10518; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 10709–10712; b) J. Dadová, M. Vrábel, M. Adámik, M. Brázdová, R. Pohl, M. Fojta, M. Hocek, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 16091–16102.
- [20] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1200–1216; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1220–1238.

Eingegangen am 12. Mai 2016

Online veröffentlicht am 8. Juli 2016