

Struktur einer archaealen B-Familien-DNA-Polymerase in Komplex mit einem chemisch modifizierten Nukleotid

Heike M. Kropp, Kay Diederichs und Andreas Marx*

Professor Ronald T. Raines zum 60. Geburtstag gewidmet

Abstract: Archaeale B-Familien-DNA-Polymerasen (DNA-Pols) sind die treibende Kraft führender biotechnologischer Anwendungen wie moderne Sequenzierungsansätze. Die Akzeptanz chemisch modifizierter Nukleotide durch DNA-Pols ist der Schlüssel zu diesen Technologien. Bis jetzt sind keine strukturellen Daten für diese DNA-Pols in Komplexen mit modifizierten Substraten verfügbar, die zum Verständnis der Interaktionen zwischen Enzym und chemischer Modifikation sowie der Entwicklung von Nukleotiden der nächsten Generation beitragen könnten. Dafür haben wir eine Exonuklease-defiziente Variante des Wildtyps der B-Familien KOD-DNA-Pol mit einem modifizierten Nukleotid in einem geschlossenen, ternären Komplex kristallisiert. Zum Vergleich haben wir die A-Familien-DNA-Pol KlenTaq mit demselben Nukleotid kristallisiert. Die beiden Kristallstrukturen erklären wie die Modifikation in den A- und B-Familien-DNA-Pols durch das Protein und die DNA in zwei unterschiedliche Konformationen gelenkt wird. Außerdem erlauben die Strukturen Rückschlüsse darauf, wie die jeweilige Konformation die Prozessierung des modifizierten Nukleotids beeinflusst. Insgesamt bietet diese Studie erste Einblicke wie B-Familien-DNA-Pols mit relevantem modifiziertem Substrat interagieren.

DNA-Polymerasen (DNA-Pols) sind die treibende Kraft zahlreicher biotechnologischer Anwendungen wie DNA- und RNA-Sequenzierung,^[1] SELEX^[2] und Microarrayanalysen.^[3] All diese Anwendungen beruhen auf einer DNA-Pol und ihrer Fähigkeit chemisch modifizierte Nukleotide zu akzeptieren. Überraschenderweise haben DNA-Pols gezeigt, dass sie diverse modifizierte Analoga prozessieren können, obgleich sie sich evolutionär entwickelten, um selektiv kanonische Nukleotide einzubauen.^[4]

Die Akzeptanz eines modifizierten Nukleotides hängt von der Modifikation und der verwendeten DNA-Pol ab. Unter den thermostabilen DNA-Pols wie KlenTaq (Klenow-Fragment von *Thermus aquaticus* DNA-Pol-I, A-Familie)- und

KOD (*Thermococcus kodakaraensis*, B-Familie)-DNA-Pols, zeigen die DNA-Pols der B-Familie oft eine breitere Substrattoleranz für C5-modifizierte Pyrimidine und 7-deaza-modifizierte Purine,^[5] also für die Modifikationen, die am wichtigsten für moderne Anwendungen sind.

Kürzlich wurden Kristallstrukturen geschlossener, ternärer Komplexe von KOD-DNA-Pol^[6] und einer Mutante^[7] veröffentlicht, welche erste Einblicke in die Koordination des Triphosphats und der Metallionen im aktiven Zentrum geben.

Bis jetzt sind strukturelle Daten von DNA-Pols im Komplex mit den oben erwähnten Nukleotiden, die eine Modifikation an der Nukleobase tragen, ausschließlich auf die A-Familien-DNA-Pol KlenTaq beschränkt.^[8] Enzyme dieser Familie eignen sich jedoch oftmals weniger für die oben erwähnten Techniken. Die strukturellen Studien an KlenTaq legen nahe, dass Wasserstoffbrückenbindungen^[8d,e] und elektrostatische Wechselwirkungen^[8f] zwischen der Modifikation und dem Enzym den Einbau des modifizierten Substrats unterstützen. Wegen des Fehlens struktureller Daten für archaeale B-Familien-DNA-Pols, im Komplex mit modifizierten Nukleotiden, bleiben die zu Grunde liegenden Mechanismen, die die Akzeptanz des unnatürlichen Substrates verbessern, für die B-Familien-DNA-Pols, die so wichtig für zahlreiche Anwendungen sind, schwer definierbar.

Um diese Lücke zu schließen, haben wir eine Exonuklease-defiziente Variante des Wildtyps der KOD-DNA-Pol im Komplex mit einem Nukleotid kristallisiert, welche die Modifikation trägt, die im Next-Generation-Sequencing Anwendung findet.^[1a,b] Für den direkten Vergleich haben wir außerdem KlenTaq-DNA-Pol mit dem gleichen modifizierten Nukleotid kristallisiert. Interessanterweise nimmt die Modifikation in KOD- und KlenTaq-DNA-Pol zwei unterschiedliche Konformationen an. Die erhaltenen Daten illustrieren die unterschiedlichen Interaktionsmuster, welche die untersuchte Modifikation in den A- und B-Familien-DNA-Pols innehat. Diese Ergebnisse erklären die Mechanismen durch die das modifizierte Nukleotid von den archaealen B-Familien-DNA-Pols, die essentiell für viele innovative Anwendungen sind, prozessiert wird.

Da nicht modifiziertes dATP im Komplex mit KOD-DNA-Pol in unserer neusten Studie kristallisierte,^[6] fokussierten wir uns darauf dieses Nukleotid zu modifizieren und synthetisierten das 7-deaza-modifizierte Adenosinderivat dA*TP (Abbildung 1, für Details siehe die Hintergrundinformationen, Schema S1). Die Modifikation wurde, aufgrund ihrer Wichtigkeit in der DNA-Sequenzierung,^[1a,b] ausgewählt.

Das erhaltene dA*TP wurde in Co-Kristallisationsversuchen mit KOD-DNA-Pol eingesetzt. Dem Ansatz von KOD-

[*] M. Sc. H. M. Kropp, Prof. Dr. A. Marx
Fachbereich Chemie und Konstanz Research School Chemical Biology, Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 7857 Konstanz (Deutschland)
E-Mail: andreas.marx@uni-konstanz.de
Prof. Dr. K. Diederichs
Fachbereich Biologie und Konstanz Research School Chemical Biology, Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)

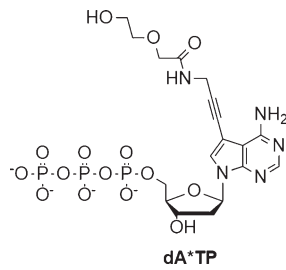


Abbildung 1. Chemische Struktur des 7-deaza-modifizierten Adenosintriphosphats (dA*TP).

DNA-Pol im Komplex mit nicht modifiziertem dATP (KOD-dATP) folgend,^[6] haben wir eine geschlossene, ternäre Struktur von KOD-DNA-Pol in Komplex mit dA*TP (KOD-dA*TP) erhalten. Die Struktur wurde mittels Verfeinerung gegen KOD-DNA-Pol-Wildtyp (PDB ID: 5OMF)^[6] mit einer Auflösung von 2.0 Å gelöst. Sie zeigt einen zur Katalyse bereiten Komplex mit einer geschlossenen Fingerdomäne, die das naszierende dA*TP-dT-Basenpaar einschließt. Das aktive Zentrum zeigt zwei Metallionen, die, auf Grundlage des anormalen Signals, als Mg²⁺ (A) und Mn²⁺ (B) identifiziert wurden. Das dritte Metallion (C), das bisher einzig in DNA-Pol δ ,^[9] 9^oN und KOD-DNA-Pol^[6] zu finden ist, wenn sie mit natürlichem Substrat gebunden sind, fehlt in der KOD-

dA*TP-Struktur (Abbildung 2D und Abbildung S2B). Es wird normalerweise vom γ -Phosphat, E580, D404 und drei Wassermolekülen koordiniert. Davon wird ein Wassermolekül von E578 koordiniert. Während alle Aminosäureseitenketten und Wassermoleküle wie in KOD-dATP positioniert sind, nimmt E580 eine „offene“ Konformation an, welche die Koordination eines dritten Metallions verhindert (Abbildung 2D und Abbildung S2B). Eine ähnliche Konformation für E580 wurde auch in 9^oN-DNA-Pol beobachtet, die zuvor mit zwei Metallionen im aktiven Zentrum kristallisiert wurde.^[6]

Bis jetzt ist die Rolle des dritten Metallions in 9^oN und KOD-DNA-Pols unbekannt. In DNA-Pol δ wird vermutet, dass es die katalytische Effizienz durch die Beeinflussung des Einbaus des richtigen oder falschen Nukleotids moduliert.^[9] Dies könnte auch für die archaealen B-Familien-DNA-Pols zutreffen. Wie für 9^oN beobachtet wurde, scheint das dritte Metallion generell eine schwächere Bindungsaffinität zu haben als die beiden anderen.^[6]

Im Allgemeinen zeigt die KOD-dA*TP-Struktur jedoch sehr hohe Ähnlichkeit mit der kürzlich publizierten KOD-dATP-Struktur (RMSD-Wert von 0.264 für 687 Ca-Atome (Abbildung S1 A)).^[6]

Im aktiven Zentrum bildet dA*TP ein kanonisches Watson-Crick-Basenpaar mit dem Thymidin des Templats. Die Modifikation zeigt in die Furche zwischen Finger- und

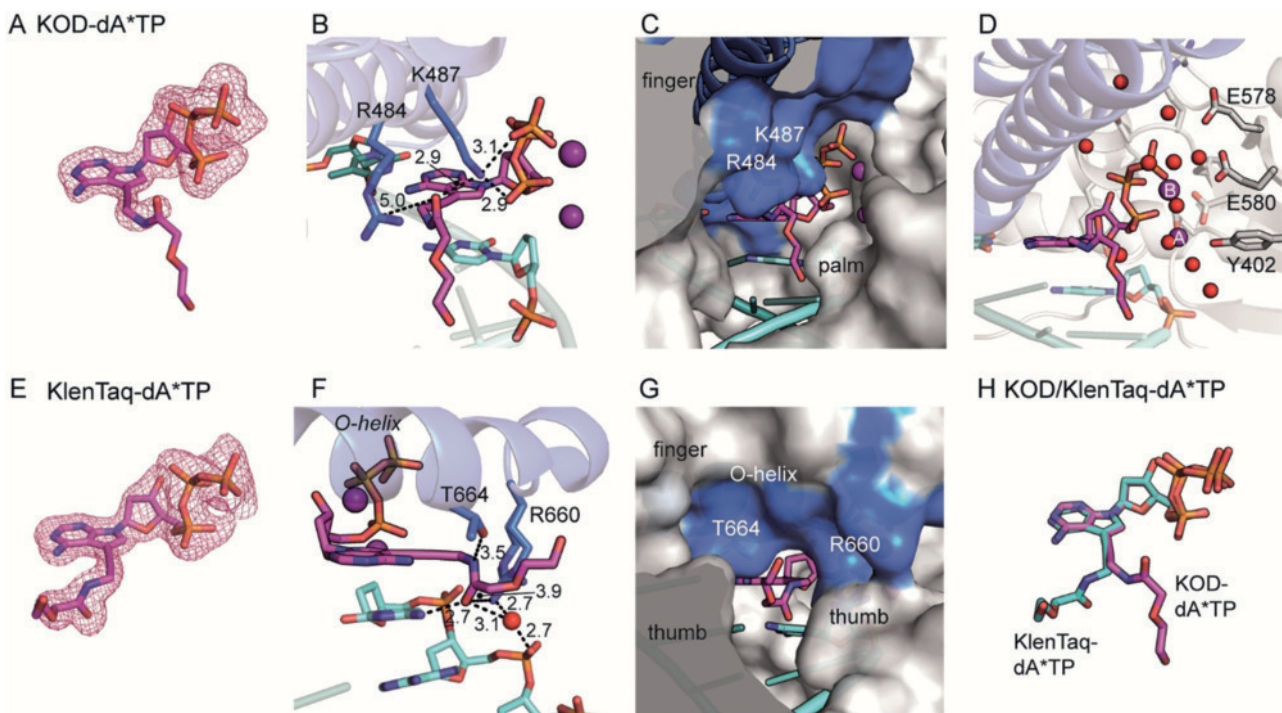


Abbildung 2. Strukturdaten von KOD-dA*TP und KlenTaq-dA*TP. Das Protein ist in grau gezeigt, die Fingerdomäne von KOD-DNA-Pol und die O-Helix von KlenTaq-DNA-Pol in blau. Das dA*TP und die dazugehörigen Metallionen sind in lila gezeigt. Wassermoleküle sind als rote Sphären gezeigt. Abstände sind als gestrichelte Linien und in Å angegeben. (A-D) KOD-dA*TP. (A) Omnitkarte für dA*TP bei 3 σ . (B) Die Modifikation ist zwischen den beiden positiv geladenen Aminosäureseitenketten von K487 (2.9 Å) und R484 (5.0 Å) eingeklemmt. (C) Die Modifikation zeigt in die Furche zwischen Finger- und Handflächendomäne. (D) Aktives Zentrum mit zwei Metallionen und E580 in der „offenen“ Konformation. (E-G) KlenTaq-dA*TP. (E) Omnitkarte von dA*TP bei 3 σ . (F) Die Modifikation ist unterhalb der O-Helix positioniert und formt Wasserstoffbrücken zu N6 des 3'-terminalen dCMP (2.7 Å), und über eine Wassermolekül (3.1 Å) zum Primerrückgrat (2.7 Å), sowie zu T664 (3.5 Å). (G) Die Modifikation ist zwischen T664 und R660 der O-Helix eingeklemmt und zeigt in die Furche zwischen Finger- und Daumendomäne. (H) Überlagerung von dA*TP von KOD-dA*TP (lila) und KlenTaq-dA*TP (blau).

Handflächendomäne (Abbildung 2C) und ist strukturell bis zur Amidbindung aufgelöst (Abbildung 2A). Die Ethylenglykolkette zeigt keine Elektronendichte und wurde daher mit einer Occupancy von Null modelliert. Die Carbonylgruppe der Modifikation bildet eine Wasserstoffbrücke mit K487 (2.9 Å), welches seinerseits mit dem α - (2.9 Å) und β -Phosphat (3.1 Å) von dA*TP interagiert, und essentiell für die Nukleotidyltransferreaktion ist.^[10] Außerdem ist R484 auf der gegenüberliegenden Seite (5.0 Å) der Carbonylgruppe positioniert, wodurch diese zwischen zwei positiv geladenen Aminosäureseitenketten eingeklemmt wird (Abbildung 2B). Diese Wasserstoffbrücken- und elektrostatischen Interaktionen scheinen das dA*TP im aktiven Zentrum gut zu stabilisieren. Da sich R484 in der Nähe zur Modifikation befindet, könnte es, und andere Aminosäureseitenketten der Fingerdomäne wie I488, ein gutes Ziel für Mutagenese sein, um die Akzeptanz modifizierter Nukleotide durch KOD-DNA-Pol zu verbessern.

Zusätzlich zu E580, nimmt Y402 in KOD-dA*TP, im Vergleich zu KOD-dATP, eine andere Konformation an (Abbildung 2D und Abbildung S2B). Die Seitenkette von Y402 bewegt sich um 1.2 Å in Richtung E580, das aufgrund seiner geänderten Konformation an dieser Stelle Raum öffnet. Durch diese Bewegung verliert Y402 seine Wasserstoffbrückenbindungen zu einem Wassermolekül, das Metallion A koordiniert (3.7 Å) und zu einem Wassermolekül, welches das Primerphosphatrückgrat (3.7 Å) koordiniert. Durch Bindung des dritten Metallions und die damit verbundene Konformationsänderung von E580, könnte sich Y402 näher zum aktiven Zentrum bewegen. Dadurch würden die stabilisierenden Interaktionen mit dem Primerstrang und den Wassermolekülen des aktiven Zentrums wieder hergestellt.

Zum Vergleich haben wir auch KlenTaq-DNA-Pol in Komplex mit dA*TP (KlenTaq-dA*TP) kristallisiert. Wir verwendeten hierfür dieselbe Primer-/Templatsequenz, sowie dieselbe Menge an MgCl₂ und MnCl₂, wie für KOD-DNA-Pol. Um KlenTaq-dA*TP mit einem natürlichen Substrat vergleichen zu können, das mit dem gleichen Primer/Templat und der gleichen Metallionenkomposition kristallisiert wurde, haben wir auch KlenTaq-DNA-Pol in Komplex mit dATP (KlenTaq-dATP) kristallisiert. Wir lösten die KlenTaq-dA*TP- und KlenTaq-dATP-Strukturen mittels Verfeinerung gegen publizierte KlenTaq-DNA-Pol Daten (PDB ID: 6FBI)^[8f] mit einer Auflösung von 2.0 Å. Die Strukturen KlenTaq-dATP und KlenTaq-dA*TP sind sehr ähnlich (RMSD-Wert von 0.108 für 468 C α -Atome (Abbildung S1B)). Beide Strukturen zeigen einen für die Katalyse bereiten Komplex mit je zwei Metallionen, die im aktiven Zentrum koordiniert sind. In beiden Fällen sind die Metallionen Mg²⁺ und Mn²⁺, für jeweils das A und B Metallion, wie auch in KOD-dA*TP beobachtet. Die O-Helix ist vollständig geschlossen und schließt über dem neu gebildeten dATP-dT- und dA*TP-dT-Paar, wobei K663 Wasserstoffbrücken zum α - (2.7 Å (dATP), 3.2 Å (dA*TP)) und β - (2.8 Å (dATP), 2.8 Å (dA*TP)) Phosphat ausbildet (Abbildung S3).

In KlenTaq-dA*TP liegt die Modifikation zwischen den O-Helix Resten R660 und T664 (3.5 Å) und zeigt in Richtung Daumendomäne (Abbildung 2G). R660, wie für R484 in

KOD-dA*TP beobachtet, ist in der Nähe der Carbonylgruppe und wurde in zwei Konformationen modelliert (Abbildung 2F, Abbildung S3). Beide Konformationen von R660 sind in einem Abstand zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zum Primerrückgrat (2.9 Å) (Abbildung S3). Verglichen mit KOD-dA*TP ist die Modifikation in KlenTaq-dA*TP starrer, da Elektronendichte für die Ethylenglykolkette beobachtet wird (Abbildung 2E). Die Carbonylgruppe ist verglichen mit KOD-dA*TP um 180° gedreht (Abbildung 2H) und zeigt in Richtung N6 des 3'-terminalen Cytidins, wobei sie eine Wasserstoffbrücke zu dessen exozyklischem Amin (2.7 Å) (Abbildung 2F) ausbildet. Da der DNA-Duplex in der Nähe des aktiven Zentrums von A-Familien-DNA-Pols A-Form annimmt (Tabelle S2), hat der Duplex am 3'-Primerende in KlenTaq-DNA-Pol verglichen mit KOD-DNA-Pol eine schmalere große Furche und einen engeren Abstand der Nucleobasen. Dadurch kann die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Carbonylgruppe und N6 des Cytidins ermöglicht werden. Zusätzlich bildet die Carbonylgruppe eine Wasserstoffbrücke mit dem Primerrückgrat (2.7 Å) über ein Wassermolekül (3.1 Å) (Abbildung 2F). Diese zusätzliche Interaktion findet sich nicht in KlenTaq-dATP.

Um die Effizienz der Prozessierung von dA*TP im Vergleich zu seinem natürlichen Pendant durch KOD- und KlenTaq-DNA-Pol zu bestimmen, haben wir Einzelnukleotideinbauexperimente durchgeführt, in welchen das modifizierte dA*TP direkt mit dem natürlichen dATP konkurriert (Abbildung 3), wie zuvor bereits beschrieben.^[8d,e] Wir verwendeten ein 5'-³²P markierten 12-nt-Primer und ein 16-nt-Templat mit derselben Sequenz wie für die Kristallisation. Die Reaktionen wurden analysiert und das Verhältnis von dATP zu dA*TP mittels 16%-iger denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Autoradiographie

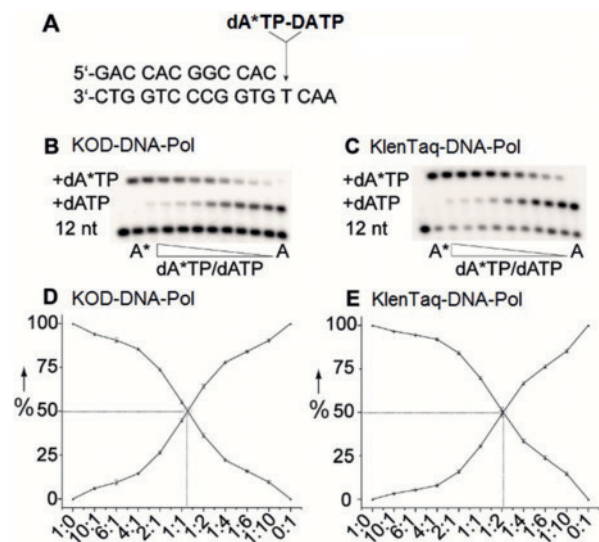


Abbildung 3. Kompetitive Primerverlängerungsexperimente. (A) Sequenz des Primer/Templatkomplexes. (B) PAGE-Analyse des Konkurrenzexperiments mit KOD-DNA-Pol. (C) PAGE-Analyse des Konkurrenzexperiments mit KlenTaq-DNA-Pol. (D) Graphisches Auslesen der PAGE-Analyse mit KOD-DNA-Pol. Der Punkt des 50%-igen Einbaus ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. (E) Dasselbe wie für (D) mit KlenTaq-DNA-Pol. Daten sind Triplikate.

analysiert. Hierbei wurde der signifikante Migrationsunterschied der Primer, welche entweder durch das Prozessieren von dA*TP oder dATP verlängert wurden, genutzt. Für KOD-DNA-Pol hat die Modifikation von dA*TP nur geringe Auswirkungen auf das Enzym, da KOD-DNA-Pol das modifizierte Nukleotid mit einer 1,2-fach höheren Effizienz verglichen mit dATP, einbaut (Abbildung 3). Interessanterweise prozessiert KlenTaq-DNA-Pol dA*TP mit einer 2-fach höheren Effizienz verglichen mit dATP. Ähnliche überlegene Prozessierungen wurden auch für andere dATP-Analoga berichtet.^[8e,11] Dies kann an den Interaktionen zwischen der Carbonylgruppe der Modifikation und dem Primerstrang liegen, welche zu einer zusätzlichen Stabilisierung des ternären Komplexes führen können. Da die Wasserstoffbrücken der Carbonylgruppe mit N6 des 3'-terminalen Cytosins sequenzspezifisch sind, haben wir uns gefragt, ob die erhöhte Einbaurrate von dA*TP durch KlenTaq-DNA-Pol bestehen bleibt, wenn sich ein Thymidin anstelle eines Cytidins am 3'-Primerende befindet. In diesem Fall wäre eine Wasserstoffbrücke der Carbonylgruppe zur 3'-terminalen Nukleobase nicht möglich. Tatsächlich haben wir in kompetitiven Einzelnukleotideinbauxperimenten mit dem 3'-terminalen dTMP-Primer einen Rückgang der Einbaueffizienz auf 1,5-fach beobachtet (Abbildung S4).

Wenn wir nun KOD- und KlenTaq-DNA-Pols vergleichen, bringt uns dies zu zwei Hauptunterschieden, die die beobachteten unterschiedlichen Konformationen von dA*TP erklären: das Volumen des Kanals, das innerhalb des Enzyms zur Unterbringung von Modifikationen verfügbar ist und die DNA-Konformation in der Nähe des aktiven Zentrums. KOD-DNA-Pol hat ein größeres Volumen innerhalb seines ternär geschlossenen Komplexes verglichen mit KlenTaq-DNA-Pol,^[6] sowie eine größere Furche zwischen Finger- und Daumen-/Handflächendomäne. Dadurch hat KOD-DNA-Pol mehr Raum, um Modifikationen unterzubringen, was in einer hohen Flexibilität der Ethylenglykolkette des dA*TPs in KOD-dA*TP resultiert. Zusätzlich besitzt KOD-DNA-Pol durchgehend B-Form-DNA, was in größeren Basenabständen und einer weiteren großen Furche, verglichen mit der A-Form-DNA der ersten drei Primernukleotide in KlenTaq-DNA-Pol (Tabelle S2), resultiert. Die B-Form-DNA in KOD-DNA-Pol bietet mehr Raum, um Modifikationen in der großen Furche, wie diese an C5 von Pyrimidinen und 7-deaza von Purinen, unterzubringen. Zusammen mit der Proteinumgebung, scheint die B-Form sequenzspezifische Interaktionen der Modifikation mit Strang abwärts gelegenen Nukleotiden, wie in KlenTaq-dA*TP, zu verhindern. Obgleich der kompaktere aktive Komplex und die A-Form-DNA in KlenTaq-DNA-Pol die Prozessierung eines einzelnen dA*TPs scheinbar fördern, so mögen diese Eigenschaften den Einbau mehrerer Nukleotide hintereinander, verringern. Hierfür wäre eine DNA-Pol mit mehr Raum und weniger Interaktionen, wie KOD-DNA-Pol, vorteilhaft.

Zusammenfassend haben wir Einblicke in die Prozessierung eines modifizierten Nukleotids durch KOD-DNA-Pol, einem Mitglied der DNA-Pol B-Familie erhalten, die essenziell für viele gegenwärtige Anwendungen sind. Die Kristallstrukturen erlauben einen direkten Vergleich der Interaktionen der Modifikation in einer B- und A-Familien-DNA-

Pol. Des Weiteren erklären sie wie die Protein- und DNA-Umgebung jeder Familie die Konformation der Modifikation beeinflusst, sodass zwei unterschiedliche Konformationen der Modifikation resultieren. Diese Studie erweitert das bisher limitierte Wissen über biotechnologisch wichtige archaeale B-Familien-KDNA-Pols im Zusammenspiel mit relevanten chemisch modifizierten Substraten und bildet den Grundstein dafür, die Fähigkeit ein weites Spektrum modifizierter Nukleotide zu akzeptieren, zu verstehen. Zukünftige Studien zielen darauf hin zu erklären, wie mehr als eine Modifikation innerhalb der Grenzen der DNA-Pols prozessiert wird.

Danksagung

Wir danken der Finanzierung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) und der Swiss Light Source des Paul Scherrer Institutes für den Zugang zum Messbereich PXI – X06SA und die großartige Unterstützung.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Stichwörter: B-Familie-Polymerasen · DNA-Polymerasen · Modifizierte Nukleotide · Röntgenkristallographie · Sequenzierung

- [1] a) D. R. Bentley, et al., *Nature* **2008**, *456*, 53–59; b) M. L. Metzker, *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 31–46; c) C. W. Fuller, S. Kumar, M. Porel, M. Chien, A. Bibillo, P. B. Stranges, M. Dorwart, C. Tao, Z. Li, W. Guo, S. Shi, D. Korenblum, A. Trans, A. Aguirre, E. Liu, E. T. Harada, J. Pollard, A. Bhat, C. Cech, A. Yang, C. Arnold, M. Palla, J. Hovis, R. Chen, I. Morozova, S. Kalachikov, J. J. Russo, J. J. Kasianowicz, R. Davis, S. Roever, G. M. Church, J. Ju, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 5233–5238; d) S. Goodwin, J. D. McPherson, W. R. McCombie, *Nat. Rev. Genet.* **2016**, *17*, 333–351; e) 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.
- [2] a) K. Sefah, Z. Yang, K. M. Bradley, S. Hoshika, E. Jiménez, L. Zhang, G. Zhu, S. Shanker, F. Yu, D. Turek, W. Tan, S. A. Benner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 1449–1454; b) G. Mayer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2672–2689; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2710–2727.
- [3] a) P. S. Mischel, T. F. Cloughesy, S. F. Nelson, *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, *5*, 782–792; b) C. C. M. Perou, T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lonning, A.-L. Borresen-Dale, P. O. Brown, D. Botstein, *Nature* **2000**, *406*, 747–752; c) J. R. Pollack, C. M. Perou, A. A. Alizadeh, M. B. Eisen, A. Pergamenschikov, C. F. Williams, S. S. Jeffrey, D. Botstein, P. O. Brown, *Nat. Genet.* **1999**, *23*, 41–46.
- [4] A. Hottin, A. Marx, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 418–427.
- [5] a) M. Mehedi Masud, A. Ozaki-Nakamura, M. Kuwahara, H. Ozaki, H. Sawai, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 584–588; b) M. Ku-

- wahara, J.-i. Nagashima, M. Hasegawa, T. Tamura, R. Kitagata, K. Hanawa, S.-i. Hososhima, T. Kasamatsu, H. Ozaki, H. Sawai, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5383–5394; c) H. A. Held, S. A. Benner, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 3857–3869; d) S. Jäger, G. Rasched, H. Kornreich-Leshem, M. Engeser, O. Thum, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15071–15082; e) M. Mačková, S. Boháčová, P. Perlíková, L. Poštová Slavětínská, M. Hocek, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 2225–2236; f) G. F. Kaufmann, M. M. Meijler, C. Sun, D.-W. Chen, D. P. Kujawa, J. M. Mee, T. Z. Hoffman, P. Wirsching, R. A. Lerner, K. D. Janda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2144–2148; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2182–2186; g) T. Tasara, B. Angerer, M. Damond, H. Winter, S. Dörhöfer, U. Hübscher, M. Amacker, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2636–2646.
- [6] H. M. Kropp, K. Betz, J. Wirth, K. Diederichs, A. Marx, *PLoS One* **2017**, *12*, e0188005.
- [7] N. Chim, C. Shi, S. P. Sau, A. Nikoomanzar, J. C. Chaput, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1810.
- [8] a) S. Obeid, H. Bußkamp, W. Welte, K. Diederichs, A. Marx, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8320–8322; b) S. Obeid, H. Bußkamp, W. Welte, K. Diederichs, A. Marx, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 15667–15669; c) S. Obeid, A. Baccaro, W. Welte, K. Diederichs, A. Marx, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 21327–21331; d) K. Bergen, A.-L. Steck, S. Strütt, A. Baccaro, W. Welte, K. Diederichs, A. Marx, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11840–11843; e) A. Hottin, K. Betz, K. Diederichs, A. Marx, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 2109–2118; f) H. M. Kropp, S. L. Dürr, C. Peter, K. Diederichs, A. Marx, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 9992–9997.
- [9] M. K. Swan, R. E. Johnson, L. Prakash, S. Prakash, A. K. Aggarwal, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 979–986.
- [10] C. Castro, E. D. Smidansky, J. J. Arnold, K. R. Maksimchuk, I. Moustafa, A. Uchida, M. Gotte, W. Konigsberg, C. E. Cameron, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 212–218.
- [11] P. Kielkowski, J. Fanfrlík, M. Hocek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7552–7555; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 7682–7685.