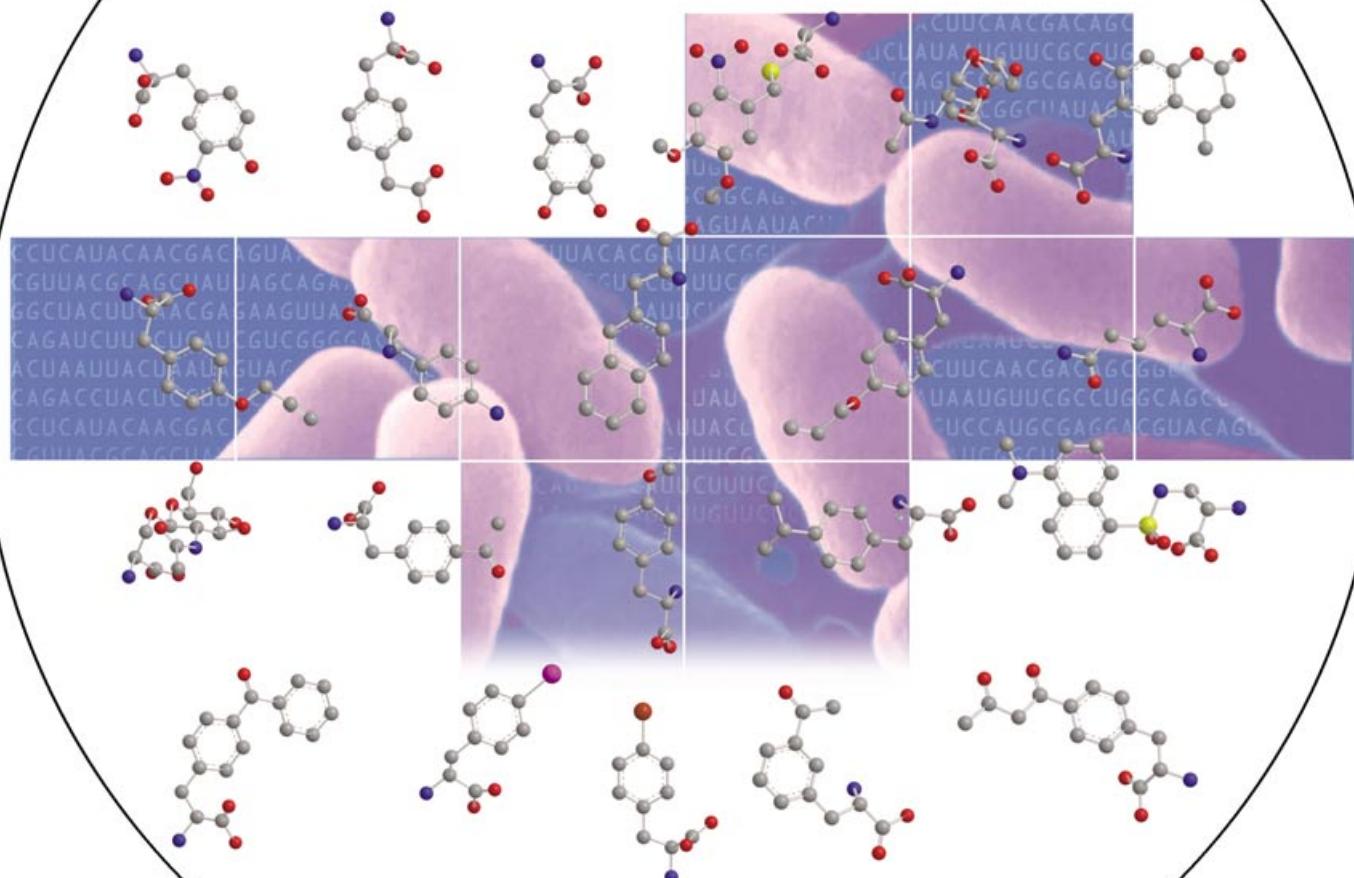


# Die Erweiterung des genetischen Codes

Lei Wang und Peter G. Schultz\*

**Stichwörter:**

Aminosäuren · Genetischer Code · Proteinchemie



**C**hemiker sind in der Lage, nahezu jede niedermolekulare organische Verbindung zu synthetisieren. Dennoch sind unsere Möglichkeiten zur rationalen Modifizierung von Proteinen sehr begrenzt, und das, obwohl diese an nahezu allen Lebensprozessen teilnehmen. Bei den meisten Proteinen beschränken sich die Modifikationen weitgehend auf Substitutionen der zwanzig Standard-Aminosäuren untereinander. Hier beschreiben wir jüngste Fortschritte, die es ermöglichen, den genetischen Code von prokaryotischen und eukaryotischen Organismen um neue Bausteine zu erweitern. Es wurden bereits mehr als dreißig neuartige Aminosäuren in eindeutigen Tripletts- und Quadruplett-Codons genetisch codiert, darunter fluoreszierende und redoxaktive Aminosäuren, glycosylierte Aminosäuren und Aminosäuren mit Keto-, Azid-, Acetylen- und Schweratomfunktionen in den Seitenketten. Mit dem Wegfall der Einschränkungen, die durch den begrenzten Satz von zwanzig Aminosäuren vorgegeben sind, sollte es möglich sein, Proteine und sogar gesamte Organismen mit neuen oder verbesserten Eigenschaften zu generieren.

## 1. Einleitung

Die genetischen Codes aller bekannter Organismen spezifizieren die gleichen zwanzig Aminosäurebausteine. Diese Bausteine enthalten eine begrenzte Zahl von funktionellen Gruppen, darunter Carboxylgruppen und Amide, eine Thiolfunktion und einen Thioether, Alkohole, basische Amine sowie Alkyl- und Arylgruppen. Zur Erklärung von Zahl und Beschaffenheit der codierten Aminosäuren wurden die verschiedensten Argumente genannt.<sup>[1-3]</sup> Klar ist, dass Proteine zusätzliche funktionelle Gruppen benötigen, um ihre natürlichen Funktionen ausführen zu können. Diese werden durch posttranskriptionale Modifikationen wie Phosphorylierung, Methylierung, Acetylierung und Hydroxylierung bereitgestellt, und in seltenen Fällen haben Organismen eine neuartige Translationsmaschinerie zum Einbau von Selenocystein oder Pyrrolysin entwickelt.<sup>[4,5]</sup> Dass für so viele proteinvermittelte Prozesse zusätzliche Faktoren nötig sind, legt den Schluss nahe, dass ein aus zwanzig Aminosäuren bestehender Code für das Leben zwar ausreicht, aber nicht ideal ist. Daraus folgt, dass eine Methode, die den genetischen Code von lebenden Organismen systematisch erweitert, Proteine oder sogar ganze Organismen mit neuen oder verbesserten Eigenschaften generieren kann. Darüber hinaus stünden mit einer solchen Methode drastisch verbesserte Möglichkeiten zur Verfügung, um Struktur und Funktion von Proteinen in vitro und in vivo zu modifizieren. Daraus wiederum ließe sich ein eher klassisch-chemischer Ansatz zur Proteinuntersuchung entwickeln, bei dem Änderungen in den sterischen oder elektronischen Eigenschaften einer Aminosäure sorgfältig definiert und mit Änderungen in der Proteinstruktur und -funktion korreliert werden.<sup>[6-8]</sup> Wir geben hier einen Überblick über die in der Vergangenheit entwickelten chemischen und biochemischen Verfahren zur Modifizierung von Proteinstrukturen und beschäftigen uns dann ausführlich mit den aktuellen Methoden, neue Aminosäuren dem geneti-

schen Code von prokaryotischen sowie eukaryotischen Organismen hinzuzufügen.

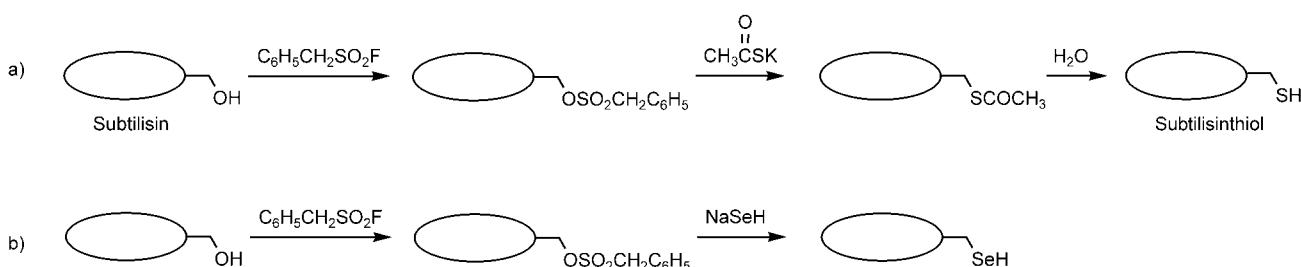
## 2. Chemische Methoden

### 2.1. Chemische Modifizierung von Proteinen

Reagentien zur selektiven chemischen Modifizierung von Aminosäureseitenketten haben sich darin bewährt, Aminosäureresten in Proteinen bestimmte Funktionen zuzuweisen. Die Selektivität hängt von der Beschaffenheit, der Zahl und der Reaktivität (wiederum beeinflusst von sterischen und elektronischen Faktoren) einer Aminosäureseitenkette ab. Typische Modifikationen sind die Oxidation oder die Alkylierung von Cysteinresten, die Acylierung entweder der N-terminalen  $\alpha$ -Aminogruppe oder der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin und die Kondensation der Carboxygruppen von Asparaginsäure oder Glutaminsäure mit Aminen. In einigen Fällen gelingt es, die charakteristische Reaktivität von Resten des aktiven Zentrums zur selektiven chemischen Modifikation einzusetzen. Zum Beispiel wird durch Behandlung der Protease Subtilisin mit Phenylmethansulfonylfuorid und anschließende Reaktion mit Thioacetat und Hydrolyse das aktive Serin in einen Cysteinrest umgewandelt (Abbil-

## Aus dem Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	35
<b>2. Chemische Methoden</b>	35
<b>3. Biosynthetische In-vitro-Verfahren zur Proteinmutagenese</b>	40
<b>4. Protein-Mutagenese in vivo</b>	44
<b>5. Ein erweiterter Code</b>	47
<b>6. Ausblick</b>	63



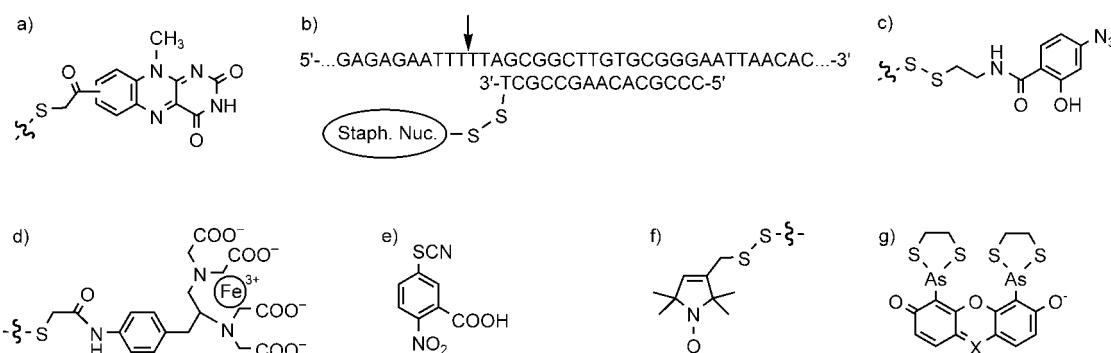
**Abbildung 1.** Selektive Umwandlung der Hydroxygruppe von Serin in eine Thio- (a) oder Selenogruppe (b).

dung 1a).<sup>[9,10]</sup> Diese Thiosubtilisin-Mutante zeigt eine verminderte proteolytische Aktivität, wirkt aber immer noch als Esterase. Mit ähnlichen Verfahren wurden ein redoxaktives Selenosubtilisin<sup>[11,12]</sup> und Selenotrypsin<sup>[13]</sup> erzeugt (Abbildung 1 b).

Chemische Methoden wurden auch eingesetzt, um reaktive Moleküle, Sonden für die Biophysik, Markierungsgruppen und andere nichtpeptidische Gruppen selektiv in Proteine einzuführen. Am häufigsten nutzt man den Cysteinrest, da dieser in Proteinen relativ selten vorkommt und die Thiofunktion nucleophiler ist als die Seitenketten anderer Aminosäuren. Außerdem gelingt es durch ortsspezifische Mutagenese, an jeder gewünschten Position eines Proteins einen Cysteinrest einzuführen, in vielen Fällen ohne Verlust von Funktion. Der Rest kann anschließend modifiziert werden,

typischerweise durch Disulfidbrücken-Austausch oder durch Alkylierung. Durch solche Cysteinmodifikationen können die katalytischen Eigenschaften von Proteinen verändert werden. Beispielsweise konjugierten Kaiser und Mitarbeiter Flavinanaloga an das Cystein im aktiven Zentrum von Papain und erzeugten auf diese Weise Oxidoreduktasen, die hydrophobe Derivate von Dihydronicotinamid oxidieren (Abbildung 2 a).<sup>[14–16]</sup> Umgekehrt wurde in einer Lys116 → Cys-Mutante der Staphylococcus-Nuclease (einer nichtspezifischen Desoxyribonuclease) eine Oligonucleotid-Bindungsstelle eingeführt und so ein semisynthetisches Enzym erzeugt, das selektiv die DNA in Nachbarschaft zur Zielsequenz schneidet (Abbildung 2 b).<sup>[17]</sup>

Der Cysteinrest wurde auch genutzt, um Proteine mit biophysikalischen Sonden auszustatten. Beispielsweise wurde



**Abbildung 2.** Cysteinreste können mit einem breiten Spektrum von nichtpeptidischen Gruppen modifiziert werden: a) Flavin, b) ein Oligonucleotid, c) ein azidischer Photovernetzer, d) [Fe(babe)], e) 2-Nitro-5-thiocyanbenzoësäure, f) ein Nitroxid-Spinmarker, g) bisarsenische Farbstoffe: FIAsH: X = CC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COOH, ReAsH: X = N.



Peter Schultz promovierte 1984 am California Institute of Technology. 1985 wurde er Assistant Professor und später Professor an der UC Berkeley, seit 1999 ist er Professor für Chemie am Scripps Research Institute und Direktor des Genomics Institute of the Novartis Research Foundation. Zu seinen aktuellen Forschungsinteressen gehören die Antikörperfekatalyse, kombinatorische Methoden und die Entwicklung neuer Bausteine für den genetischen Code. Ausgezeichnet wurde er u.a. mit dem Alan T. Waterman Award, dem Wolf Prize in Chemistry und dem Paul-Ehrlich-Preis. Peter Schultz ist Mitbegründer zahlreicher Firmen.



Lei Wang erwarb den B.S. in Organischer Chemie (1994) und den M.S. in Physikalischer Chemie (1997) an der Universität Peking mit einer Arbeit zur rastersondenmikroskopischen Untersuchung der Eigenschaften von Nanopartikeln. Von 1997 bis 2002 war er Doktorand bei Prof. Peter G. Schultz an der University of California, Berkeley. Im Rahmen seiner Promotion entwickelte er eine allgemeine Methode zum genetischen Einbau von nichtnatürlichen Aminosäuren in Proteine in lebenden Zellen. Zurzeit ist er Postdoc in der Arbeitsgruppe von Prof. Roger Y. Tsien an der University of California, San Diego.

ein photoaktivierbares Vernetzungsreagens (Abbildung 2c) an eine Asp161→Cys-Mutante eines Katabolitaktivatorproteins gebunden. Mit dieser Sonde wurde die Wechselwirkung des Proteins mit der α-Utereinheit der RNA-Polymerase während der transkriptionalen Aktivierung untersucht.<sup>[18]</sup> Meares und Mitarbeiter verknüpften Eisen(III)-edta-Komplexe mit dem Cysteinrest von Proteinen und erhielten so Reagentien zur oxidativen Spaltung, die zur Kartierung von Protein-Protein- und Protein-Nucleinsäure-Komplexen verwendet werden können (Abbildung 2d).<sup>[19–23]</sup> Ähnlich entwickelten Harbury und Mitarbeiter eine leistungsfähige chemische Kartierungstechnik („misincorporation proton–alkyl exchange“),<sup>[24]</sup> die auf der selektiven Spaltung des Proteinrückgrats an Cysteinresten durch 2-Nitro-5-thiocyanbenzoësäure basiert (Abbildung 2e).<sup>[25]</sup> Bei der verwandten „substituted cysteine accessibility method“ (SCAM) ist die Zugänglichkeit von Oberflächenresten dadurch festgelegt, inwieweit die entsprechende Cysteinmutante mit geladenen oder polaren Reagentien reagieren kann.<sup>[26,27]</sup> Auch Nitroxid-Spinmarker (Abbildung 2f) und umgebungsempfindliche Fluorophore wurden durch den Cysteinrest an Proteine konjugiert. Anhand dieser Systeme ließen sich Seitenkettendynamiken und Rückgratfluktuationen untersuchen.<sup>[28–30]</sup> Kürzlich wurde außerdem gezeigt, dass Bisarsenliganden (FlAsH und ReAsH) selektiv mit hoher Affinität und Spezifität an das Tetracysteinmotiv Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys in Proteinen binden (Abbildung 2g).<sup>[31,32]</sup> Nach der Bindung an die Zielposition ist die Fluoreszenz der Bisarsenliganden stark erhöht. Somit steht eine Methode zum selektiven Einbau von Fluorophoren in zelluläre Proteine zur Verfügung.

Eine andere chemische Methode zur selektiven Modifizierung von Proteinen ist die Oxidation von N-terminalen Ser- oder Thr-Resten mit Periodat zu Aldehyden, die anschließend mit Hydrazid- oder Aminooxygruppen zu stabilen Konjugaten reagieren können. Zum Beispiel resultierte aus der Reaktion von Aminooxypentan mit der N-terminalen Aldehydgruppe des β-Chemokins RANTES ein wirkungsvoller Inhibitor gegen HIV-1-Infektion.<sup>[33]</sup> Mit ähnlichen chemischen Verfahren wurden selektiv Biotin- und Fluoreszenzreporter mit den N-Termini von Peptiden und Proteinen verknüpft<sup>[34]</sup> sowie chemoselektiv Peptide ligiert (siehe Abschnitt 2.3).

Die chemische Modifikation ist zweifelsohne eine nützliche Methode zur Änderung von Proteineigenschaften. Ein Beispiel ist die Synthese von PEG-gekuppeltem therapeutischem Protein (PEG = Polyethylenglycol) mit verlängerter Serumhalbwertszeit (z.B. Neulasta, PEG-Intron). Allerdings beruht dieses Verfahren auf der besonderen Reaktivität einer Aminosäureseitenkette und ist damit hinsichtlich Selektivität und Gesamteffizienz eingeschränkt.

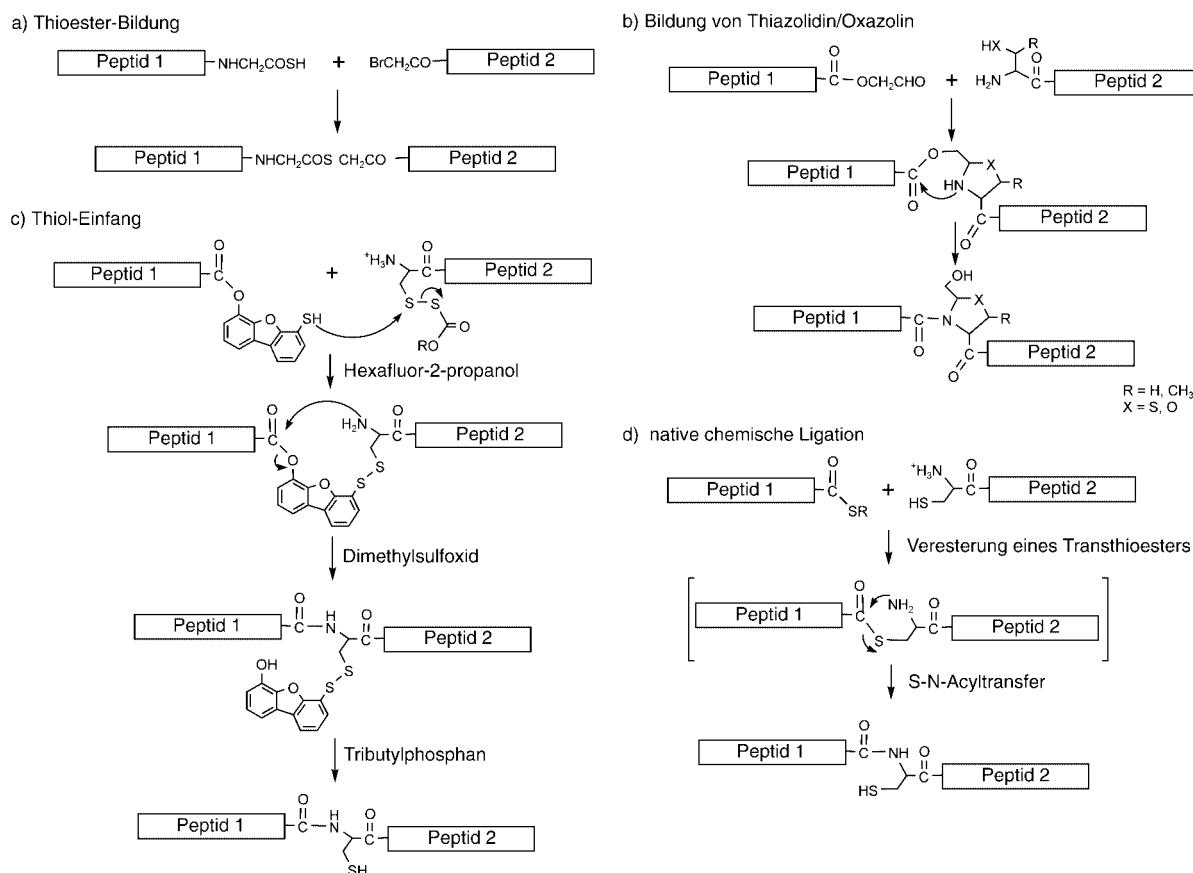
## 2.2. Chemische Synthese

Die stufenweise Festphasenpeptidsynthese („stepwise solid phase peptide synthesis“, SPPS),<sup>[35]</sup> erstmalig 1963 durch Merrifield angewandt, hat die Synthese von Peptiden und kleinen Proteinen (< 100 Aminosäuren) mit nichtnatürlichen Aminosäuren erheblich vereinfacht.<sup>[36]</sup> Beispiele dafür

sind der Austausch von Phe8 des C-Peptids durch ein Pyridoxaminphosphat zur Herstellung einer Ribonuklease S mit Transaminaseaktivität<sup>[37]</sup> und der Einbau von Iminodiestriglycin in das S-Peptid, wodurch es gelingt, die Aktivität der RNase S durch Zugabe von Fe<sup>III</sup> an- und auszuschalten.<sup>[38]</sup> In anderen Beispielen wurden D-Aminosäuren und Analoga von Arginin zur Affinitätssteigerung in das LH-RH eingebaut (LH-RH: Luteinisierungshormon freisetzendes Hormon).<sup>[39–41]</sup> Der Austausch von Leu und Val gegen ihre fluorierten Analoga (5,5,5-Trifluorleucin und 4,4,4-Trifluorvalin) in der Superhelixregion des Transkriptionsfaktors GCN4 aus Hefe resultierte in einer erhöhten Proteinstabilität.<sup>[42]</sup> Weiterhin wurden nichtnatürliche Aminosäuren mit olefinischen Seitenketten in das C-Peptid der RNase A inseriert und durch Metathese in cyclische Peptide umgewandelt. Die erhaltenen Peptide zeigen eine erhöhte Resistenz gegen Proteasen.<sup>[43]</sup> 5,5-Dimethylprolin in der RNase A wurde durch Pro93 ausgetauscht, wodurch die Peptidbindung in einer *cis*-Konformation eingefroren wurde und als Sonde für die Proteininfaltung fungierte.<sup>[44]</sup>

Mehrere Strategien zur Ligation von synthetischen Peptiden wurden entwickelt, um die SPPS-Technik auf die Synthese größerer Proteine zu übertragen.<sup>[45]</sup> Die Ligation kann chemoenzymatisch<sup>[46]</sup> (siehe Abschnitt 2.3) oder chemisch ablaufen.<sup>[47]</sup> Der chemische Ansatz nutzt chemoselektive Kupplungen (z.B. zur Bildung von Thioestern,<sup>[47]</sup> Oximen,<sup>[48]</sup> Thiazolidinen und Oxazolidinen,<sup>[49,50]</sup> Thioethern<sup>[51]</sup> und Disulfiden<sup>[52]</sup>) von definierten funktionellen Gruppen, die vorab in die Peptide eingebaut wurden (Abbildung 3a,b). Zur Verknüpfung der C- und N-Termini der beiden Peptidfragmente wurden auch Templatmoleküle verwendet (Abbildung 3c). Bei dieser Methode entsteht die Amidbindung in einem intramolekularen Acyltransfer.<sup>[53]</sup> Eine raffinierte, als native chemische Ligation bezeichnete Strategie macht die Verwendung eines Templat überflüssig und ermöglicht die direkte Kupplung von Peptidfragmenten unter Bildung einer nativen Peptidbindung (Abbildung 3d).<sup>[54,55]</sup> Bei dieser Methode wird zunächst durch Umesterung ein Peptid, das C-terminal einen α-Thioester trägt, mit dem N-terminalen Cys-Rest eines zweiten Peptids ligiert. Das Intermediat geht dann eine irreversible S→N-Acyl-Umlagerung ein, wodurch an der Ligationsstelle eine native Peptidbindung entsteht. Diese Methode benötigt normalerweise einen N-terminalen Cys-Rest an der Ligationsstelle, vor kurzem wurde aber gezeigt, dass durch Einführung einer zusätzlichen Sulphydrylgruppe, die nach der Ligation wieder entfernt wird, eine Ligation auch an einem anderen Rest als Cys möglich ist.<sup>[56]</sup> Durch native chemische Ligation können routinemäßig Polypeptide mit mehr als 100 Aminosäuren hergestellt werden.

Durch die Methoden der chemischen Ligation ist es auch möglich, nichtnatürliche Aminosäuren in größere Proteine einzubauen. Beispielsweise wurde durch Ersetzen der Amid-CONH-Brücke zwischen Gly49 und Ile50 durch eine COS-Brücke ein Analogon der HIV-1-Protease synthetisiert und der Beitrag dieser Wasserstoffbrücke zur katalytischen Aktivität untersucht.<sup>[57]</sup> In anderen Studien wurde die native chemische Ligation genutzt, um das Tyr10 in Rubredoxin durch Tyrosin-Analoga zu ersetzen und damit die Redoxei-



**Abbildung 3.** Beispiele für chemoselektive Reaktionen, die zur Peptidligation genutzt werden.

genschaften des Proteins zu modulieren,<sup>[58]</sup> um Erythropoietin mit Kohlenhydrat-Analoga zu modifizieren<sup>[59]</sup> und um Fluorophore in den Chymotrypsin-Inhibitor 2 einzuführen, wodurch Einzelmolekülstudien zur Proteininfaltung möglich wären.<sup>[60]</sup> Durch intramolekulare native chemische Ligation wurden auch cyclische Peptide und Proteine synthetisiert.<sup>[61–63]</sup>

Durch chemische Synthese kann eine breite Vielfalt nichtnatürlicher Aminosäuren in Peptide und Proteine eingebaut werden. Dies ist besonders nützlich, wenn Aminosäure-Analoga, die für Zellen toxisch oder mit der Translationsmaschinerie inkompatibel sind, eingebaut werden sollen. Ein Beispiel ist die Synthese eines all-d-Aminosäure-Proteins.<sup>[64,65]</sup> Durch chemische Synthese können auch Isotopenmarkierungen (z. B. <sup>2</sup>H-, <sup>13</sup>C- oder <sup>15</sup>N-markierte Aminosäuren) an einer definierten Stelle des Proteins eingebaut werden. Chemische Synthesen können problematisch sein, wenn die Peptide oder Proteine schlecht löslich sind, und die Herstellung größerer Proteine wird rasch langwierig, aufwändigeschwach und teuer.

### 2.3. Semisynthese

Die Semisynthese ist ein weiterer Ansatz zur Herstellung von größeren Proteinen mit nichtnatürlichen Aminosäuren. Bei dieser Methode werden die synthetischen Peptide an ein

trunkiertes natives Protein ligiert, das durch chemische Spaltung, Proteolyse oder rekombinante Methoden erzeugt wurde.<sup>[66,67]</sup> Verglichen mit SPPS können wesentlich größere Peptidfragmente rekombinant exprimiert oder aus natürlichen Proteinen bezogen werden, sodass größere Proteine zugänglich sind. Eine dieser semisynthetischen Methoden beruht auf der autokatalytischen Re-Ligation von Peptidfragmenten, die durch Proteinspaltung mit Bromcyan (BrCN) hergestellt wurden. Das Phänomen der Re-Ligation wurde erstmals 1974 von Dykes et al. beobachtet.<sup>[68]</sup> Aus der Bromcyansspaltung resultiert am C-Terminus des Peptids ein Homoserinlacton, das mit einem freien N-Terminus in direkter Nachbarschaft reagieren kann. Dadurch wird das Vollängenprotein wiederhergestellt. Mit diesem Verfahren wurde eine Anzahl nichtnatürlicher Aminosäuren in Cytochrome c eingebaut.<sup>[69–71]</sup>

Auch die enzymatische Peptidligation wurde zur Protein-Semisynthese eingesetzt.<sup>[72]</sup> Die durch Proteasen katalysierte Hydrolyse von Peptiden kann umgekehrt werden, indem man die Reaktionsbedingungen so ändert, dass die Aminolyse gegenüber der Hydrolyse bevorzugt ist.<sup>[73–76]</sup> Dies wird z. B. durch Zusatz von organischen Cosolventien erreicht, die die Ionisierung der  $\alpha$ -Carboxylatgruppe unterdrücken. Alternativ dazu kann die C-terminale Estergruppe eines Peptids mit der N-terminalen Aminogruppe eines zweiten Peptids unter Bildung eines ligierten Proteins kondensiert werden. Mit solchen Methoden wurde z. B. d-Ala in den humanen Wachs-

tumshormonfreisetzenden Faktor eingeführt, um dessen Proteaseresistenz zu steigern.<sup>[77,78]</sup> Eine deutliche Verbesserung dieser Methode beruht auf der Verwendung einer Protease-mutante, die eine verminderte hydrolytische Aktivität zeigt, aber noch hinreichend wirksam ist, um die Amidbildung mit einem C-terminalen Ester zu katalysieren.<sup>[79]</sup> Kaiser und Mitarbeiter setzten erstmals eine Subtilisin-Mutante – mit einer Ser→Cys-Mutation im aktiven Zentrum – in der Peptidligation ein.<sup>[9,10,79]</sup> Eine verbesserte Mutante wurde durch Wells und Mitarbeiter eingeführt. Die Autoren erzeugten eine Subtiligase, die als Subtilisin-Doppelmutante (Ser221→Cys und Pro225→Ala) eine zehnfach höhere Peptidligase-Aktivität aufweist als Thiosubtilisin.<sup>[80]</sup> Subtiligase wurde zum Aufbau einer mutanten RNase A verwendet, in deren aktiven Zentren His12 und His119 unabhängig voneinander durch 4-Fluorhistidin ersetzt waren.<sup>[46]</sup> Mit ähnlichen Verfahren wurden Biotin, Schweratome und Polyethylenglycol in Proteine eingeführt.<sup>[81]</sup>

Die chemoselektive Ligation kann ebenfalls für Semisynthesen verwendet werden, sofern eine orthogonale funktionelle Gruppe problemlos am Terminus des rekombinanten Peptids eingeführt werden kann. Zum Beispiel kuppelten Rose et al. enzymatisch ein Hydrazid an den C-Terminus eines Peptidfragments aus dem humanen Granulocytenkolo-nie-stimulierenden Faktor (G-CSF) und erzeugten am komplementären Peptidfragment durch Oxidation mit Periodat eine N-terminale Aldehydgruppe.<sup>[82]</sup> Die beiden Peptide religieren unter Hydrazonbildung spontan zu einer G-CSF-Mutante.

Die Technik der Ligation mit exprimierten Proteinen („expressed protein ligation“, EPL) hat die Anwendung der nativen chemischen Ligation zur Proteinsynthese erheblich vereinfacht. Bei dieser Methode wird ein rekombinantes Protein mit einem C-terminalen α-Thioester erzeugt und durch chemische Ligation mit einem zweiten Peptid verknüpft (Abbildung 4).<sup>[83–86]</sup> Das C-terminale Thioester-Inter-

mediat wird durch interne Vermitteltes Protein-Spleißen erzeugt, wobei eine Mutation im Intein den letzten Spleißschritt blockiert. Bei der EPL wird ein rekombinantes Protein durch In-Frame-Expression mit der Intein-Mutante exprimiert, und durch Zugabe von exogenem Thiol wird das rekombinante Protein vom teilweise umgelagerten, gespleißten Intermediat abgespalten. Das semisynthetische Produkt entsteht schließlich durch Reaktion des α-Thioesters mit einem N-terminalen Cys-Peptid (das synthetisch oder enzymatisch hergestellt wurde).<sup>[87–89]</sup> Neben N-terminalem Cystein können analog auch N-terminales Homocystein<sup>[90,91]</sup> und Selenocystein<sup>[92–94]</sup> in der nativen chemischen Ligation oder EPL verwendet und selektiv an der Ligationsstelle eingeführt werden.

Mit EPL können Fluorophore in den C-Terminus,<sup>[83,95,96]</sup> in Mittelpositionen<sup>[97,98]</sup> oder in den N-Terminus<sup>[88]</sup> von Proteinen eingeführt werden. In einem eleganten Experiment gelang Muir et al. der Einbau von Tetramethylrhodamin und Fluorescein in c-Crk-II (ein Substrat der Abelson-Tyrosinkinase, c-Abl). Anhand des resonanten Transfers von Fluoreszenzenergie (FRET) wurde die Phosphorylierung von c-Crk-II durch c-Abl verfolgt.<sup>[99,100]</sup> FRET-Paare wurden durch EPL und/oder Cys-Markierung auch in Komponenten des RNA-Polymerase-Holoenzym und des offenen RNA-Polymerase-Promotorkomplexes aus *E. coli* eingeführt.<sup>[101,102]</sup> In einem weiteren Experiment wurde ein synthetisches Fragment von Eglin, das entweder Kynurenin oder Norvalin an Position 25 enthielt, an ein komplementäres Peptid ligiert, das durch Phagendisplay-Mutagenese hergestellt worden war und zwei randomisierte Aminosäurereste aufwies, die Van-der-Waals-Kontakte mit dem Rest 25 eingehen.<sup>[103]</sup> Nach Ligation wurden Phagen isoliert, die die gefaltete Eglin-Mutante mit nichtnatürlichen Seitenketten in ihrem hydrophoben Zentrum aufweisen. Mit EPL wurden auch posttranskriptionale Modifikationen (z. B. glycosyierte<sup>[104,105]</sup> und lipidierte Amino-säuren<sup>[106]</sup> sowie Analoga von phosphorylierten Amino-säuren<sup>[107–109]</sup>) selektiv in Proteine eingeführt und die Effekte auf die Struktur und Funktion der Proteine untersucht. Auch Mutationen des Protein-Rückgrats wurden mit EPL erzeugt. Zum Beispiel ersetzten Raines et al. die Sequenz Asn113–Pro114 von RNase A durch ein Mimetikum mit inverser Schleife, bestehend aus den beiden β-Aminosäuren (*R*)-Nipecotinsäure und (*S*)-Nipecotinsäure.<sup>[110]</sup> Die resultierende RNase-Mutante zeigte die gleiche Ribonucleinsäure-Aktivität wie der Wildtyp und eine höhere thermische Stabilität.

Mit semisynthetischen Methoden können größere Proteine erzeugt werden als durch chemische Synthese. Allerdings erfordern diese Verfahren geeignete Spalt- und Ligationsstellen, und sie werden sehr aufwändig, wenn interne Positionen in großen Proteinen manipuliert werden sollen oder wenn große Proteinmengen gefordert sind. Darüber hinaus eignen sich die hier beschriebenen chemischen Methoden nur wenig für In-vivo-Untersuchungen der Struktur und Funktion von Proteinen.

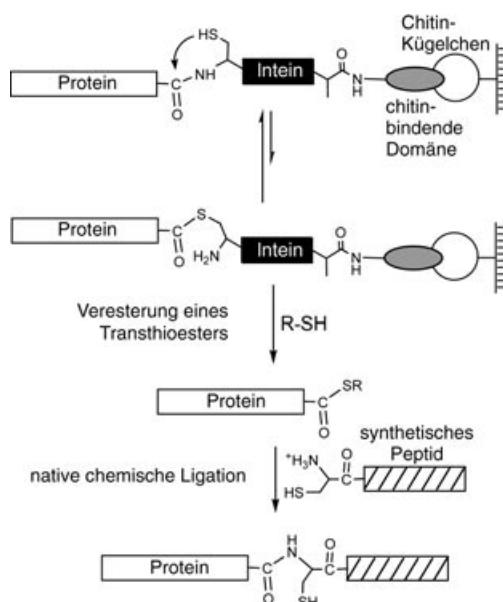


Abbildung 4. Ligation mit exprimiertem Protein.

### 3. Biosynthetische In-vitro-Verfahren zur Proteinmutagenese

#### 3.1. Methodik

Eine Reihe von In-vitro-Verfahren wurde entwickelt, um mithilfe der zelleigenen Proteinbiosynthesemaschinerie nichtnatürliche Aminosäuren in Proteine einzubauen. Diese Methoden nutzen den Umstand, dass die Anticodon-Codon-Erkennung zwischen Messenger-RNA (mRNA) und Transfer-RNA (tRNA) weitgehend unabhängig ist von der Struktur der Aminosäure am 3'-Ende des Acceptorstamms der tRNA. Diese „Adapter-Hypothese“<sup>[111,112]</sup> wurde aus einer eleganten Studie abgeleitet, die zeigt, dass eine Cysteinyl-tRNA<sup>Cys</sup>, die durch Behandlung mit H<sub>2</sub>/Raney-Nickel in eine Alanyl-tRNA<sup>Cys</sup> umgewandelt wird, in vitro das Cystein-Codon (UGU) abliest und effizient Alanin in die Polypeptidkette einbaut.<sup>[112]</sup> Analoge Experimente wurden mit Derivaten anderer Standard-Aminosäuren durchgeführt, wobei enzymatisch aminoacylierte tRNAs chemisch mit synthetischen Reagentien und Sonden modifiziert wurden. Zum Beispiel entsteht bei der Behandlung von Lys-tRNA<sup>Lys</sup> mit N-Acetoxysuccinimid (*N*<sup>e</sup>-Acetyl-Lys)-tRNA<sup>Lys</sup>, die in einem zellfreien Retikulocytenystem aus Kaninchen *N*<sup>e</sup>-Acetyl-Lys in Proteine einbaut.<sup>[113]</sup> Ein entscheidender Nachteil dieser Methode ist, dass die modifizierten Aminosäuren an sämtlichen Positionen eingebaut werden, die das Codon für die modifizierte tRNA spezifiziert. Außerdem inseriert die derivatisierte Aminosäure in Konkurrenz mit der nichtderivatisierten Aminosäure, sodass heterogene Proteinprodukte resultieren. Die Derivatisierungen beschränken sich zudem auf die Standard-Aminosäuren und auf Reaktionsbedingungen, die weder eine Hydrolyse der labilen Aminoacylesterbindung zwischen der terminalen 3'-Adenosinengruppe und der Aminosäure bewirken noch die tRNA chemisch inaktivieren.

Eine breitere Anwendung des Verfahrens verlangt allgemeinere Methoden zur selektiven Aminoacylierung von tRNAs. Eine Fehlaminooacylierung von tRNAs mit nichtnatürlichen Aminosäuren durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen ist wegen der hohen Spezifität dieser Enzyme problematisch.<sup>[114,115]</sup> Die direkte chemische Acylierung der tRNA erwies sich wegen der großen Zahl an reaktiven Stellen als nicht praktikabel. In der Folge wurden semisynthetische Methoden entwickelt, um trunkierte tRNAs (an deren 3'-Ende ein Mono- oder ein Dinucleotid entfernt war) enzymatisch an chemisch aminoacylierte Mono- und Dinucleotide zu ligieren. Zum Beispiel wird bei einem Verfahren nach Hecht et al. das Dinucleotid pCpA chemisch mit einer N<sup>α</sup>-geschützten Aminosäure acyliert und dann enzymatisch mit einer RNA-Ligase an eine trunkierte tRNA (tRNA<sup>-CA</sup>, dieser fehlt am 3'-Acceptorstamm das terminale Dinucleotid pCpA) ligiert.<sup>[116]</sup> Mit dieser Methode wurden einige nichtnatürliche Aminosäuren in die erste Position von Dipeptiden eingebracht.<sup>[117-119]</sup> Das Verfahren hat jedoch Einschränkungen: die Ausbeuten der Aminoacylierungen waren niedrig, und die N-terminale Schutzgruppe der Aminosäure konnte ohne Hydrolyse des Aminoacylestes nicht effizient entfernt werden. Dies wirkt sich limitierend auf Substitutionen an den P-Donoren und folglich auch am N-Terminus des Peptids aus

(Abbildung 5). Brunner et al. entwickelten später eine Methode zur Herstellung einer vollständig entschützten Amidoacyl-pCpA und deren Ligation an die trunkierte tRNA. Die daraus resultierende Aminoacyl-tRNA konnte als A-Donor

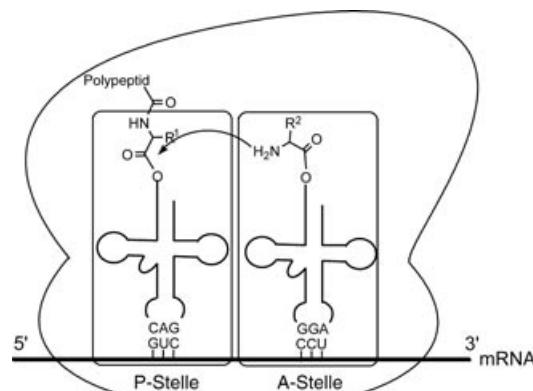
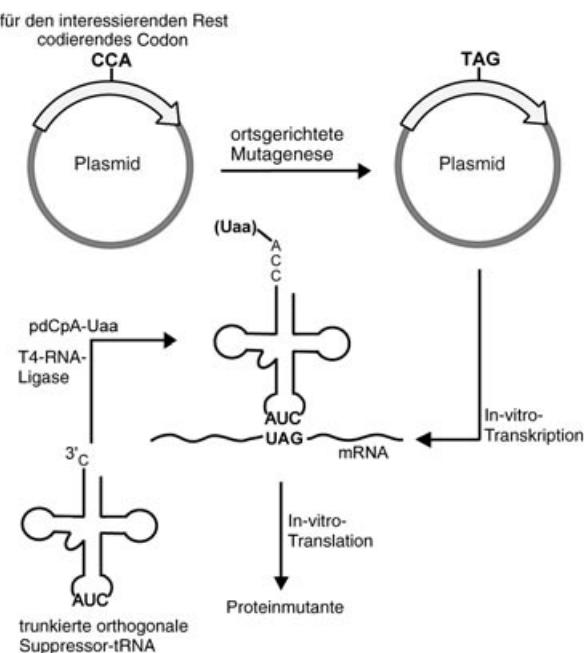


Abbildung 5. Schematische Darstellung eines Ribosoms und seiner P- und A-Bindungsstellen.

verwendet werden.<sup>[120]</sup> Die Ausbeuten an acyliertem Dinucleotid waren auch hier gering, und die Methode unterliegt ebenfalls den oben genannten Einschränkungen, die mit der Verwendung von endogener *E. coli*-tRNA als Aminosäurelieferant zusammenhängen; Probleme bereiten zum Beispiel konkurrierende endogene Aminosäuren und nichtselektiver Einbau. Trotz allem haben die Experimente mit chemisch aminoacylierten tRNAs gezeigt, dass die natürliche Translationsmaschinerie ein breites Spektrum von nichtnatürlichen Aminosäureseitenketten akzeptieren kann.

Eine allgemeine In-vitro-Methode für den ortsspezifischen Einbau einer großen Zahl von nichtnatürlichen Aminosäuren mit exzellenter Translationsgenauigkeit wurde 1989 durch unser Laboratorium vorgestellt (Abbildung 6).<sup>[121]</sup> Das Verfahren nutzt die Degeneriertheit der drei Stop Codons UAA, UAG und UGA (Nonsense-Codons). Diese Codons codieren nicht für Aminosäuren, sondern signalisieren die Beendigung der Polypeptidsynthese durch Bindung von Freisetzungsfaktoren.<sup>[122,123]</sup> Da die Beendigung der Proteinsynthese nur ein Stop Codon benötigt, verbleiben im genetischen Code zwei freie Codons, die zur eindeutigen Spezifizierung einer nichtnatürlichen Aminosäure verwendet werden können. Tatsächlich wurde nachgewiesen, dass Nonsense-Suppressor-tRNAs (tRNAs, die auf ein Stop Codon hin eine der Standard-Aminosäuren inserieren) in vivo und in vitro effizient mehrere der Standard-Aminosäuren in Proteine einbauen.<sup>[124,125]</sup> Speziell bei Experimenten mit [<sup>3</sup>H]Phe, und später mit α-Hydroxysäuren, konnte die gewünschte Aminosäure selektiv an der durch UAG spezifizierten Position in einem In-vitro-Translationssystem einführt werden.<sup>[121,126]</sup>

Um nichtnatürliche Aminosäuren selektiv in Proteine einzubauen, wird außerdem eine tRNA benötigt, die das freie Codon erkennt und dessen kognate Aminosäure effizient in die wachsende Polypeptidkette einbaut. Die tRNA muss dabei orthogonal zu den endogenen Aminoacyl-tRNA-Syn-

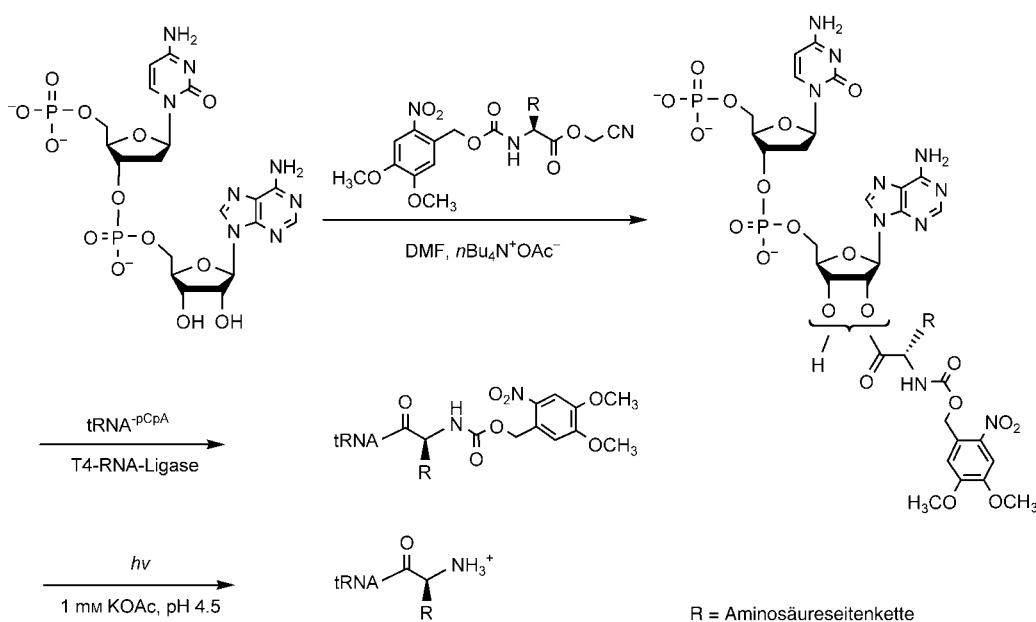


**Abbildung 6.** Eine biosynthetische In-vitro-Methode für den ortsspezifischen Einbau von nichtnatürlichen Aminosäuren in Proteine.  
Uaa = nichtnatürliche Aminosäure.

thetasen des Wirtsorganismus sein, aus dem sich das In-vitro-Translationssystem ableitet, d.h., sie darf kein Substrat für eine der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen im In-vitro-Proteinsyntheseextrakt sein. Würde die Suppressor-tRNA von einer endogenen Aminoacyl-tRNA-Synthetase erkannt werden, wäre sie einem Korrekturlesen („proofreading“) ausgesetzt (Desacylierung der nichtkognaten Aminosäure), und/oder es würde eine Reaminoacylierung mit der kognaten Aminosäure erfolgen. Dies würde entweder in einer niedrigen Suppres-

sionseffizienz oder im Einbau einer Standard-Aminosäure in Konkurrenz zur gewünschten nichtnatürlichen Aminosäure resultieren.

Eine orthogonale Amber-Suppressor-tRNA ( $tRNA_{CUA}^{Phe}$ ), abgeleitet von der Phenylalanin-tRNA aus Hefe, wurde für ein In-vitro-Transkriptions/Translationssystem aus *E. coli* konstruiert.<sup>[125,127-130]</sup> Die Nukleotide 34–37 in der Anticodonschleife dieser tRNA wurden durch 5'-CUAA-3' ausgetauscht, um eine wirksame Suppressor-tRNA zu erzeugen. Runoff-Transkription lieferte eine funktionale Suppressor-tRNA in relativ großen Mengen.<sup>[131,132]</sup> Die Zweitstufenmethode nach Hecht und Mitarbeitern<sup>[116]</sup> wurde modifiziert und zur effizienten Aminoacylierung der orthogonalen tRNA eingesetzt. Es wurde gefunden, dass die 2',3'-Hydroxygruppe des Dinucleotids selektiv durch den Cyanmethylester einer  $N^{\alpha}$ -geschützten Aminosäure monoacyliert wird (Abbildung 7).<sup>[133]</sup> Das gewünschte aminoacylierte Produkt entsteht in hoher Ausbeute, und auf Schutzgruppenoperationen am Dinucleotid kann verzichtet werden. Der Austausch von Cytidin durch Desoxycytidin in pCpA vereinfachte die Synthese und eliminierte ohne Verlust an biologischer Aktivität eine weitere reaktive 2'-OH-Gruppe. Vor der Acylierung des Dinucleotids werden die  $\alpha$ -Aminogruppe der Aminosäure und alle reaktiven Gruppen der Seitenkette in Form ihrer Nitroveratryloxycarbamate, -ester oder -ether geschützt.<sup>[134,135]</sup> Nach der Ligation können die Schutzgruppen in hoher Ausbeute und unter milden sauren Bedingungen, bei denen die Aminoacyl-tRNA nicht desacyliert wird, photochemisch von der intakten Aminoacyl-tRNA abgespalten werden.<sup>[133]</sup> Dieses Aminoacylierungsprotokoll ist relativ unkompliziert, führt zu hohen Ausbeuten (sowohl der Aminoacylierung als auch der Ligation) und wurde eingesetzt, um ein breites Spektrum von nichtnatürlichen Aminosäuren in Proteine einzubauen.<sup>[136]</sup>



**Abbildung 7.** Chemische Aminoacylierung von  $tRNA_{CUA}^{Phe}$  durch einen Aminosäurecyanmethylester, der mit einer photochemisch spaltbaren Gruppe geschützt ist.

Die erste Anwendung dieses allgemeinen In-vitro-Verfahrens zum ortsspezifischen Einbau von nichtnatürlichen Aminosäuren in ein Protein wurde an einer  $\beta$ -Lactamase-Mutante demonstriert, die *p*-Nitrophenylalanin, *p*-Fluorphenylalanin oder Homophenylalanin anstelle von Phe66 enthielt.<sup>[121]</sup> Die Mutagenese mit der chemisch acylierten Suppressor-tRNA wurde mit einem In-vitro-Transkriptions/Translationssystem aus *E. coli* durchgeführt. Dieses setzt sich zusammen aus einem *E. coli*-S-30-Extrakt, der alle für die Transkription und Translation nötigen Faktoren bereitstellt, und aus Plasmid-DNA (die das interessierende Gen enthält) mit einem TAG-Amber-Codon, das für die nichtnatürliche Aminosäure codiert. Es wurden zwar nur geringe Mengen an aufbereitetem Protein gewonnen (typische Ausbeuten 5–30 µg Protein pro mL Reaktionslösung), laut Peptidkartierungsexperimenten waren dafür aber Spezifität und Genauigkeit des Einbaus sehr hoch. Ein ähnliches Verfahren wurde kurz darauf durch Chamberlin und Mitarbeiter beschrieben, die eine von tRNA<sup>Gly</sup> aus *E. coli* abgeleitete Suppressor-tRNA verwendeten, um ortsspezifisch <sup>125</sup>I-Tyr in ein 16-mer-Peptid einzubauen.<sup>[137]</sup>

Mit der oben genannten Methodik wurden mehr als 50 unterschiedliche Aminosäuren und Aminosäureanaloga ortsspezifisch mit hoher Genauigkeit in Proteine eingebaut.<sup>[136]</sup> Zum Einsatz kamen konformativ eingeschränkte Aminosäuren (z.B. Methanoprolin, Cyclopropylglycin und  $\alpha$ -Methyl-L-leucin), Aminosäuren mit Spinmarkern und Photoaffinitätsmarkern als Seitenketten, Aminosäuren mit modifizierten Aciditäten und Wasserstoffbrückeneigenschaften, photolytisch aktivierbare („photocaged“) Aminosäuren,  $\alpha$ -Hydroxysäuren und Aminosäuren mit ungewöhnlichen sterischen Eigenschaften (z.B. *tert*-Butylglycin).

### 3.2. Anwendungen

In-vitro-Methoden für die Mutagenese mit nichtnatürlichen Aminosäuren wurden in der Proteinchemie vielfach angewendet, z.B. zur Analyse von Proteinstabilitäten und -faltungen oder in Untersuchungen von Enzymmechanismen und der Signaltransduktion. Darüber hinaus wurde das Verfahren zur Einführung von biophysikalischen Sonden in Proteine genutzt.<sup>[138]</sup>

Um herauszufinden, zu welchem Anteil der gefaltete Zustand von Proteinen durch die Wasserstoffbrücken der Seitenketten stabilisiert wird, wurde Tyr27 der Staphylococcus-Nuclease (SNase) durch fluorierte Tyrosinanaloga ausgetauscht (Abbildung 8a).<sup>[139]</sup> Denaturierungsstudien der entsprechenden Mutanten ergaben eine Freie-Enthalpie-Beziehung zwischen der Stabilitätskonstanten  $K_{app}$  und dem  $pK_a$ -Wert der Tyr27-Hydroxygruppe (Abbildung 8b), was ein starker Hinweis ist, dass intramolekulare Wasserstoffbrücken zwischen den Seitenketten den gefalteten Zustand eines Proteins gegenüber dem ungefalteten Zustand in Wasser stabilisieren. Um den Beitrag der Wasserstoffbrücken der Hauptkette zur Proteinstabilität zu bestimmen, wurden mehrere Amidverkettungen im Abschnitt 39–50 einer  $\alpha$ -Helix des T4-Lysozyms durch Esterverkettungen ersetzt. Hierzu wurden  $\alpha$ -Hydroxysäuren jeweils am N-Terminus, in der

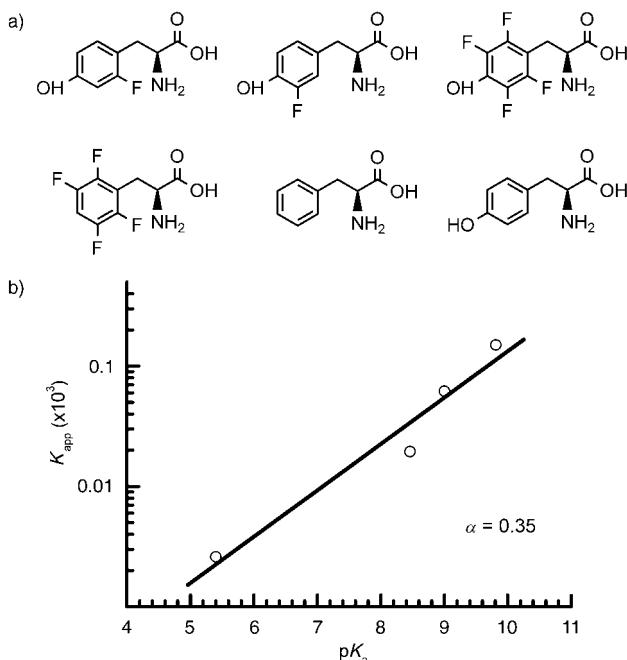


Abbildung 8. a) Struktur von fluorierten Aminosäuren, die Tyr27 in der SNase substituieren. b) Freie-Enthalpie-Beziehung zwischen der SNase-Stabilität und dem  $pK_a$ -Wert der Tyr27-Mutante.

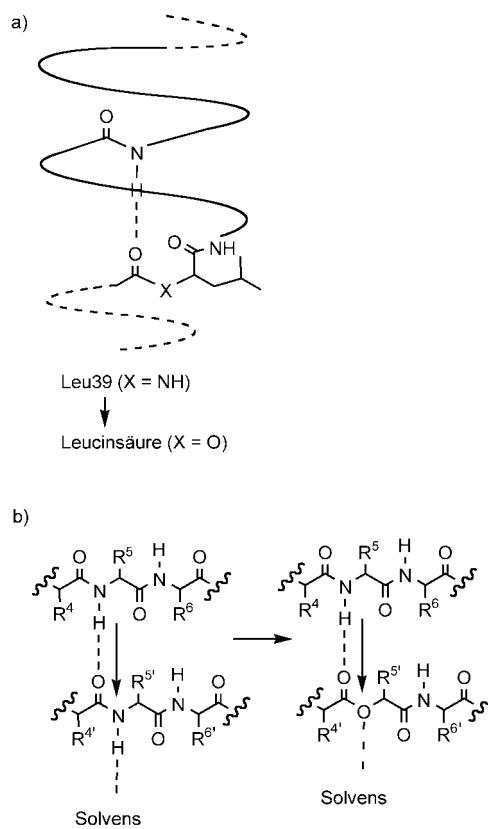


Abbildung 9. Mutation des Proteinrückgrats durch Einbau von  $\alpha$ -Hydroxysäuren: a) N-terminale Mutation von Leu39 zu Leucinsäure in einer  $\alpha$ -Helix des T4-Lysozyms; b) Substitution von Leu14 mit Leucinsäure in einem  $\beta$ -Faltblatt der SNase.

Mitte und am C-Terminus der Helix eingeführt (Abbildung 9a).<sup>[140]</sup> Die Estergruppe ist ein konservativer Ersatz der Amidgruppe, da Ester und Amide isosterisch sind und hauptsächlich in der *trans*-Konformation vorliegen.<sup>[141]</sup> Durch diese Mutationen wird ein guter Wasserstoffacceptor (die Carbonylgruppe des Amids) durch einen deutlich schwächeren ersetzt (die Carbonylgruppe des Esters).<sup>[142]</sup> Es wurde gefunden, dass die Estersubstitution an den N- und C-terminalen Positionen, an denen jeweils nur eine Wasserstoffbrücke beeinträchtigt wird, das Protein um 0.9 bzw. 0.7 kcal mol<sup>-1</sup> destabilisiert. In der Helixmitte werden hingegen zwei Wasserstoffbrücken modifiziert, sodass die Einführung der Esterverkettung das Protein um 1.7 kcal mol<sup>-1</sup> destabilisierte. In ähnlicher Weise wurde nach Amid/Ester-Austausch in antiparallelen β-Faltblättern eine verringerte Stabilität um 1.5–2.5 kcal mol<sup>-1</sup> festgestellt (Abbildung 9b).<sup>[143]</sup> Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Wasserstoffbrücken der Amidgruppen im Rückgrat ebenso wie die Wasserstoffbrücken in den Seitenketten erheblich zur Proteinstabilität beitragen.

### 3.3. Erweiterung und Verbesserung der Methodik

Eine Reihe von Verbesserungen wurde erzielt, um den In-vitro-Expressionsgrad von Proteinen zu erhöhen. Zum Beispiel zeigte in einem In-vitro-System zum Einbau von nichtnatürlichen polaren Aminosäuren in *E. coli* ein tRNA<sup>Asn</sup>-abgeleiteter Suppressor aus *E. coli* eine signifikant verbesserte Suppressionseffizienz gegenüber dem tRNA<sup>Phe</sup><sub>CUA</sub>-Suppressor aus Hefe.<sup>[144]</sup> Durch mildes Erwärmen eines S-30-Extrakts aus einem *E. coli*-Stamm mit temperaturempfindlichem Freisetzungsfaktor 1 (RF1) wurde die Aktivität des mit der Suppressor-tRNA um das Amber-Stopp-Codon konkurrierenden RF1 abgeschwächt, wodurch sich die UAG-Suppression erhöhte.<sup>[145]</sup> Das Optimieren von Präparation und Zusammensetzung des S-30-Extrakts aus *E. coli* sowie die Entfernung von inhibierenden Nebenprodukten der Translation führten ebenfalls zu verbesserten Proteinausbeuten.<sup>[146]</sup>

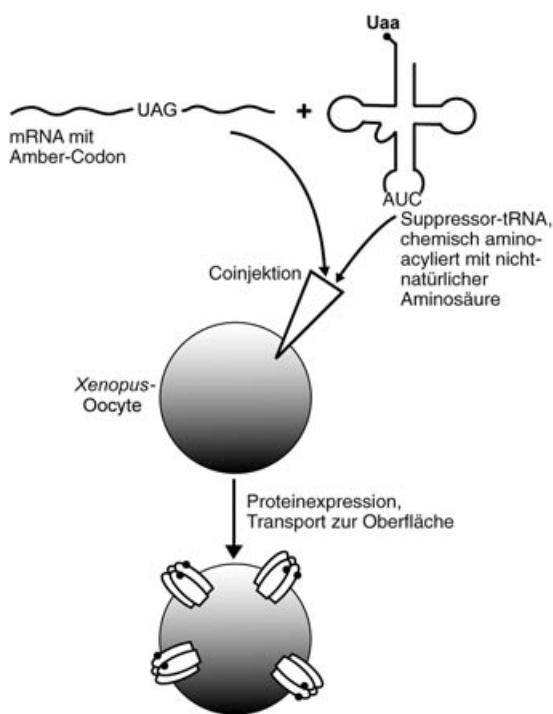
Ein beträchtlicher Forschungsaufwand wurde in die Codierung von nichtnatürlichen Aminosäuren mit anderen als Nonsense-Codons investiert. Zum Beispiel wurden mithilfe des seltenen Arginin-Codons AGG und der chemisch aminoacylierten tRNA<sup>Ile</sup><sub>CCU</sub> mehrere Phenylalanin-Analoga in ein Polypeptid eingeführt.<sup>[147]</sup> In diesem Fall konkurriert die natürlich auftretende kognate tRNA, obwohl nur in geringen Mengen vorhanden, mit der synthetischen tRNA um den Einbau von Arg und generiert ein heterogenes Vollängenprotein (im Unterschied zum trunkierten Protein beim Nonsense-Codon). Die konkurrierende Wirkung lässt sich abschwächen, indem man die Arginkonzentration in der In-vitro-Proteinsynthesemischung verringert.<sup>[148]</sup> Einige Organismen verwenden nicht alle Triplet-Codons; diese nichtcodierenden Codons können zur Spezifizierung von zusätzlichen Aminosäuren genutzt werden. Das nichtzugewiesene Codon AGA in *Micrococcus luteus* wurde z.B. für den Einbau von Phe in einem In-vitro-Transkriptions/Translationsextrakt aus *M. luteus* verwendet.<sup>[149]</sup> Kürzlich wurde ein In-vitro-Translationssystem, das sich nur aus Ribosomen, Initiations-

und Elongationsfaktoren zusammensetzt, zum simultanen Einbau von mehreren in Sense-Codons codierten nichtnatürlichen Aminosäuren in Peptide verwendet.<sup>[150]</sup> Falls es gelingt, noch effizientere Systeme zu entwickeln, könnten als ultimatives Ziel Peptide und Proteine mit multiplen nichtnatürlichen Aminosäuren synthetisiert werden.

Die Frameshift-Suppression von Vierbasencodes kann ebenfalls in vitro zur Einführung von nichtnatürlichen Aminosäuren in Proteine genutzt werden. Der korrekte Leserahmen wird nur dann aufrechterhalten, wenn die Suppressor-tRNA das erweiterte Codon in ein Vollängenprotein mit der nichtnatürlichen Aminosäure übersetzt. Bei Translation des Triplet-Codons durch eine endogene tRNA wird hingegen der Leserahmen verschoben („frameshifting“) und die Proteinsynthese vorzeitig abgebrochen. Um einen solchen Konkurrenzprozess zu vermeiden, entsprechen die ersten drei Nucleotide in den meisten erweiterten Codons entweder Stopps- oder seltenen Codons. In einem Beispiel ersetzten Sisido und Mitarbeiter das Anticodon der tRNA<sup>Phe</sup> aus Hefe durch unterschiedliche Vierbasen-Anticodons und führten mithilfe eines In-vitro-*E. coli*-Translationssystems eine Vielzahl von Phenylalanin-Analoga in Streptavidin ein.<sup>[151–156]</sup> Mithilfe von zwei chemisch aminoacylierten Frameshift-Suppressor-tRNAs, die entweder CGGG oder AGGU erkennen, konnten die Autoren simultan 2-Naphthylalanin und ein NBD-Derivat (NBD = 7-Amino-4-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol) von Lysin in Streptavidin einbauen – mit einer allerdings niedrigen Effizienz von 9%.<sup>[157]</sup> Durch Verwendung der Vierbasencodes CGGG und GGGU wurde die Einbaueffizienz auf 64% gesteigert.<sup>[158]</sup> Ein Fünfbasen-Codon-Anticodon-Paar CGGU-UACCG konnte ebenfalls den Einbau von nichtnatürlichen Aminosäuren in Streptavidin dirigieren.<sup>[159]</sup>

Ein Codon-Anticodon-Paar mit nichtnatürlichen Basen (iso-C)AG-CU(iso-dG) wurde eingesetzt, um Iodtyrosin mithilfe des Retikulocytenlysats in ein kurzes Peptid einzuführen.<sup>[160]</sup> Dieses Experiment zeigt überzeugend, dass das Ribosom Nucleotide mit nichtnatürlichen Basen toleriert und dass iso-C und iso-dG die Translation mit brauchbarer Effizienz dirigieren können. Allerdings müssen die iso-C und iso-dG enthaltenden mRNAs und tRNAs chemisch synthetisiert werden, was diese Methode für die meisten Anwendungen unpraktisch macht.

Die Mutagenese mit nichtnatürlichen Aminosäuren wurde auch bei Oozyten aus *Xenopus* beschrieben. Per Mikroinjektion wurde die mutierte mRNA zusammen mit einer chemisch aminoacylierten Amber-Suppressor-tRNA, abgeleitet von der tRNA<sup>Phe</sup> aus Hefe, in die Oozyten eingebracht (Abbildung 10).<sup>[161]</sup> Die Translationsmaschinerie der Oocyte setzt die nichtnatürliche Aminosäure an der durch das UAG-Codon spezifizierten Position ein. Später wurde entdeckt, dass ein von der tRNA<sup>Gln</sup> aus *Tetrahymena thermophila* abgeleiteter Amber-Suppressor die Effizienz und Genauigkeit beim Einbau der nichtnatürlichen Aminosäure steigert.<sup>[162]</sup> Diese Methode wurde bei Struktur-Funktions-Untersuchungen von integralen Membranproteinen angewandt, die im Allgemeinen nicht durch In-vitro-Expressionssysteme zugänglich sind.<sup>[163,164]</sup> Zum Beispiel wurde Trp 149 innerhalb der Bindungsdomäne des Nicotinacetylcholin-Rezeptors



**Abbildung 10.** Mikroinjektion von chemisch aminoacylierter tRNA und mutierter mRNA in eine Oocyte aus *Xenopus*.

durch fluorierte Tryptophanderivate ersetzt. Es wurde eine Korrelation zwischen der Rezeptoraktivierung durch Acetylcholin (ACh) und dem Fluorierungsgrad beobachtet, was darauf hindeutet, dass das quartäre Ammonium-Zentrum von ACh eine Kation- $\pi$ -Wechselwirkung mit der Indolseitenkette von  $\alpha$ Trp 149 eingeht.<sup>[165,166]</sup> Eine gravierende Einschränkung der Methode ist einmal der Umstand, dass die Suppressor-tRNA chemisch *in vitro* mit der nichtnatürlichen Aminosäure aminoacyliert werden muss, zum zweiten wird die acylierte tRNA während der Translation stöchiometrisch verbraucht und kann nicht regeneriert werden. Die Proteinproduktionen sind daher nur gering, und die Proteinmutanten müssen durch hoch empfindliche Techniken wie Patch-Clamp charakterisiert werden.

Die oben beschriebenen Methoden zur In-vitro-Mutagenese wurden zum ortsgereichten Einbau vielfältiger nichtnatürlicher Aminosäuren in Proteine angewandt. Mutagene-Studien mit nichtnatürlichen Aminosäuren gaben wichtigen Aufschluss über die Struktur und Funktion von Proteinen. Die Methode der Mutagenese ist allerdings technisch anspruchsvoll und die Ausbeuten an Proteinmutanten sind niedrig. Untersuchungen von Proteinen in der Zelle sind wegen der erforderlichen Mikroinjektion und der Nichtregerierbarkeit der Aminoacyl-tRNA nur stark eingeschränkt möglich. Darüber hinaus sind Modifizierungen der Aminosäureseitenketten durch die Aminoacylierungsschemie und die Stabilität der Aminoacyl-tRNA-Bindung limitiert.

## 4. Protein-Mutagenese *in vivo*

Die Möglichkeit, nichtnatürliche Aminosäuren *in vivo* in Proteine einzubauen, hat viele Vorteile gegenüber den *In-vitro*-Methoden. Zu nennen wären: hohe Ausbeuten an mutiertem Protein, technische Einfachheit und die Möglichkeit, Proteine in der Zelle oder in mehrzelligen Organismen zu untersuchen. Die beiden grundsätzlichen experimentellen Strategien bestehen darin, entweder eine der zwanzig Standard-Aminosäuren durch eine nichtnatürliche Aminosäure zu ersetzen oder den genetischen Code des Wirtsorganismus durch Hinzufügen einer „einundzwanzigsten“, nichtnatürlichen Aminosäure zu vergrößern. Im ersten Fall ersetzt die nichtnatürliche Aminosäure die Standard-Aminosäure typischerweise im gesamten Protein (und im Proteom). Der Ersatz verläuft oft in Konkurrenz mit einer anderen Standard-Aminosäure, was zu heterogenen Proteinen führt. Beim zweiten Verfahren werden die nichtnatürlichen Aminosäuren dem genetischen Repertoire hinzugefügt, ohne dass eine Standard-Aminosäure deletiert wird. Dies resultiert in einem erweiterten genetischen Code, der es ermöglicht, Proteine mit mehr als zwanzig Aminosäuren herzustellen.

### 4.1. Ortsgereichte Mutagenese

Die von Smith et al. entwickelte ortsgereichte Mutagenese ist eine leistungsfähige *In-vivo*-Methode zum Austausch von Aminosäuren in Proteinen durch eine andere der zwanzig Standard-Aminosäuren.<sup>[167]</sup> Die Substitution wird ausgeführt, indem man den Codon für die auszutauschende Aminosäure zu einem Codon mutiert, der für die gewünschte Mutante codiert. Diese Methode erweiterte drastisch unsere Möglichkeiten zur Modifizierung der Proteinstruktur und zur Erforschung von Struktur-Funktions-Beziehungen. Frühe bemerkenswerte Beispiele waren unter anderem Studien an der  $\beta$ -Lactamase,<sup>[168,169]</sup> der Tyrosyl-tRNA-Synthetase (TyrRS),<sup>[170]</sup> der Dihydrofolatreduktase,<sup>[171]</sup> an Trypsin<sup>[172]</sup> und Subtilisin.<sup>[173]</sup> Durch Mutagenesestudien an TyrRS aus *Bacillus stearothermophilus* quantifizierten Fersht et al. den Beitrag unterschiedlicher Aminosäureseitenketten zur Bindung von Substraten, Intermediaten und Übergangszuständen entlang des Reaktionspfades des Enzyms.<sup>[174]</sup> In einem anderen Beispiel wurden die komplementaritätsbestimmenden Abschnitte eines humanen Antikörpers durch die eines Maus-Antikörpers ersetzt. Man erhielt einen humanisierten Antikörper mit der Spezifität eines Maus-Antikörpers.<sup>[175]</sup> Auch die Spezifität von  $Zn^{2+}$ -Fingerproteinen wurde mithilfe der ortsgereichten Mutagenese modifiziert.<sup>[176–183]</sup>

Viele Varianten zur ortsgereichten Mutagenese sind entwickelt worden. Die Kassetten-Mutagenese ermöglicht z.B. die schnelle Erzeugung von sämtlichen möglichen Mutationen an einer einzigen Stelle.<sup>[184]</sup> Die Homolog- und Alanin-Scanning-Mutagenese liefern wertvolle Informationen über die Proteinfunktion, wenn keine Strukturdaten zur Verfügung stehen.<sup>[185,186]</sup> Die Zufallsmutagenese durch fehlerhafte Polymerasenkettenreaktion („error-prone PCR“) oder mithilfe von Mutatorstämmen ermöglicht die Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen über einen

großen Sequenzraum.<sup>[7,187–189]</sup> Genetische Rekombinationsmethoden wie das DNA-Shuffling,<sup>[190]</sup> ein dem „Molecular Breeding“ ähnelndes rekombinantes PCR-Verfahren, können zur Erzeugung von Variantenbibliotheken aus einem Pool von Elterngenen genutzt werden. Durch Screening-Verfahren können Proteine mit gewünschten Eigenschaften rasch selektiert werden. Alle diese Methoden haben dazu beigetragen, dass die Möglichkeiten zur Untersuchung von Proteinstruktur und -funktion rasch vorangetrieben und neuartige Proteineigenschaften entdeckt wurden. Leider sind auch alle auf Substitutionen der zwanzig Standard-Aminosäuren untereinander beschränkt.

#### 4.2. Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren mithilfe auxotropher Bakterienstämme

Vor mehr als 50 Jahren hat man erkannt, dass viele Analoga der zwanzig Standard-Aminosäuren das Wachstum von Bakterien inhibieren.<sup>[191–193]</sup> Demzufolge wurde spekuliert, dass diese Analoga durch die Proteinbiosynthesemaschinerie in die Proteine eingebaut werden. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde Ratten<sup>[194]</sup> und *Tetrahymena*<sup>[195]</sup> Ethionin verabreicht, ein <sup>14</sup>C-markiertes Analogon von Methionin. Die Detektion von Radioaktivität in den isolierten Proteinen und Peptiden war der klare Beweis, dass nichtnatürliche Aminosäuren durch Fehleinbau in Proteine gelangen können. Zum effizienten Einbau von Analoga der zwanzig Standard-Aminosäuren in bakterielle Proteine verwendeten Cohen und Mitarbeiter einen auxotrophen Bakterienstamm, der die entsprechende Standard-Aminosäure nicht biosynthetisieren kann. Die Proteinexpression wurde in Medien induziert, in denen die Standard-Aminosäure durch ihr Analogon ausge-

tauscht ist. Ergebnis war die Anreichung einer Proteinmutante, die die nichtnatürliche Aminosäure enthält (Abbildung 11).<sup>[196]</sup>

Mit diesem Verfahren wurde in einem für Phenylalanin auxotrophen *E.-coli*-Stamm *p*-Fluorphenylalanin in  $\beta$ -Galactosidase eingebaut.<sup>[196]</sup> Fluorphenylalanin ersetzte dabei im gesamten Protein partiell Phenylalanin und Tyrosin. Auf ähnliche Weise wurde Selenomethionin mithilfe eines für Methionin auxotrophen Stammes in  $\beta$ -Galactosidase eingebaut.<sup>[197,198]</sup> In vielen Folgeexperimenten wurden über 60 Analoga der zwanzig Standard-Aminosäuren in Proteine eingeführt.<sup>[193,199]</sup> Typische Substitutionen sind der Austausch von Wasserstoff durch Fluor, Methylen durch Sauerstoff oder Schwefel sowie Ringsubstitutionen. Tryptophan beispielsweise wurde durch Tryptazan ersetzt,<sup>[200]</sup> Arginin durch Canavanin,<sup>[201]</sup> Methionin durch Norleucin,<sup>[202]</sup> Leucin durch Trifluorleucin<sup>[203]</sup> und der Phenylring von Phenylalanin durch Thioenyl- oder Furylringe. Die meisten der frühen Studien untersuchten in erster Linie den Einfluss der Aminosäureanaloga auf das Bakterienwachstum sowie die Synthese und Prozessierung von Proteinen.<sup>[199]</sup> In neueren Arbeiten erwiesen sich die Methoden zudem als geeignet, um NMR- und Röntgenspektroskopie-Sonden in Proteine einzubringen.

##### 4.2.1. Aminoacyl-tRNA-Synthetasen: Lockerung der Substratspezifität

Der Einbau von Aminosäureanaloga mithilfe der oben genannten Verfahren stützt sich auf die Promiskuität der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen. An sich haben diese Enzyme eine sehr hohe Substratspezifität, um eine hohe Genauigkeit der Proteintranslation sicherzustellen. Dies schränkt die Möglichkeit von Substitutionen auf nahe Strukturverwandte der zwanzig Standard-Aminosäuren ein. Beispielsweise kann Thiaprolin quantitativ in Proteine eingebaut werden, Oxa-prolin und Selenaprolin hingegen nicht.<sup>[204]</sup> Um diese Einschränkung zu überwinden, versuchten mehrere Arbeitsgruppen, die Substratspezifität der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen zu lockern. Als erste berichteten Hennecke und Mitarbeiter, dass der Austausch von Ala294 durch Gly in der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase (PheRS) aus *E. coli* die Substratbindungsstasche vergrößert und dadurch die Acylierung von tRNA<sup>Phe</sup> durch *p*-Chlorphenylalanin (*p*-Cl-Phe) möglich wird.<sup>[205]</sup> In einem *E.-coli*-Stamm, der diese PheRS-Mutante enthält, kann Phenylalanin durch *p*-Cl-Phe substituiert werden.<sup>[206]</sup> Tirell und Mitarbeiter verwendeten diese Synthetasemutante zum Einbau von *p*-Brom-, *p*-Iod-, *p*-Cyan-, *p*-Ethinyl- und *p*-Azidophenylalanin sowie von Pyridylalanin.<sup>[207,208]</sup> In ähnlicher Weise bewirkte eine Punktmutation (Phe130 → Ser) nahe der Aminosäurebindungsstelle der Tyrosyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli*, dass Azatyrosin effizienter eingebaut wurde als Tyrosin.<sup>[209]</sup> Bei diesen Beispielen enthielt das isolierte Protein an der Substitutionsstelle meist eine Mischung von nichtnatürlichen und Standard-Aminosäuren.

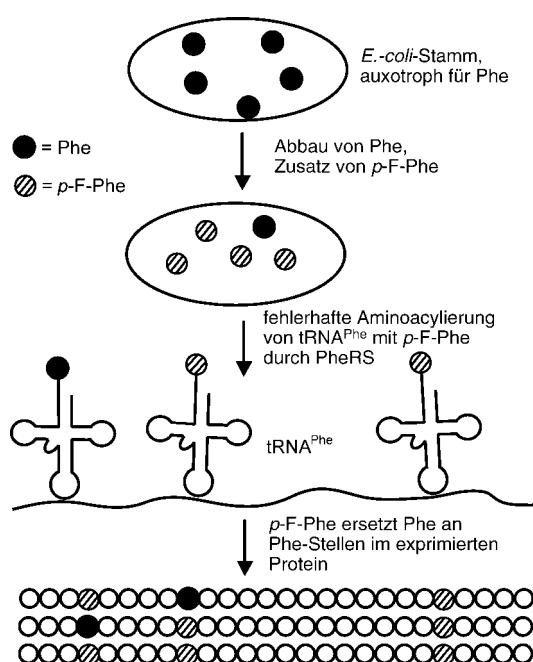


Abbildung 11. Multiple Substitution von Phenylalanin durch *p*-Fluorphenylalanin (*p*-F-Phe) mithilfe eines für Phenylalanin auxotrophen Stammes.

## 4.2.2. Aminoacyl-tRNA-Synthetasen: Unterdrückung der Korrekturleseaktivität

Die Genauigkeit der tRNA-Aminoacylierung wird sowohl durch eine Substratdiskriminierung als auch durch

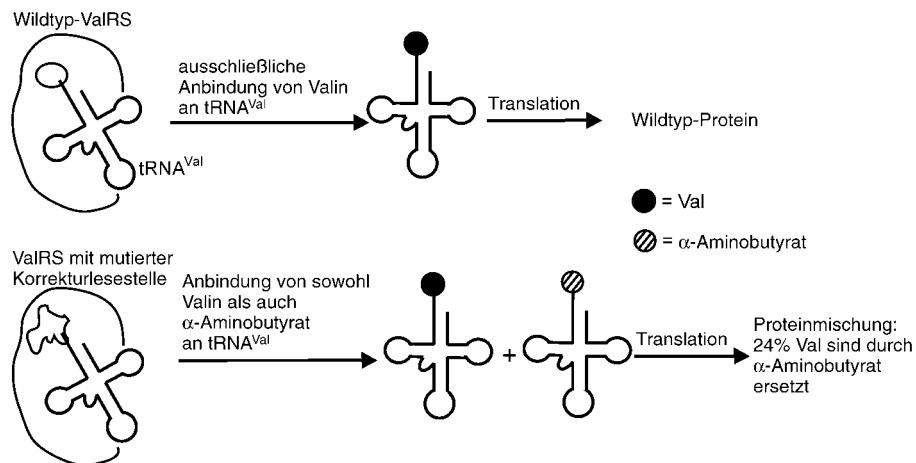


Abbildung 12. Einbau von  $\alpha$ -Aminobuttersäure durch eine ValRS-Mutante mit reduzierter Korrekturleseaktivität.

ein Korrekturlesen der nichtkognaten Intermediate und Produkte sichergestellt. Synthetasen mit verminderter Korrekturleseaktivität können daher nichtnatürliche Aminosäuren in Proteine einfügen, indem sie nahe Strukturanaloga der kognaten Aminosäure aus der Editierungsfunktion herausfallen lassen. Dieses Verfahren wurde erstmals bei einer Valyl-tRNA-Synthetase (ValRS) aus *E. coli* eingesetzt (Abbildung 12).<sup>[210]</sup> ValRS kann tRNA<sup>Val</sup> mit Cys, Thr oder Aminobuttersäure (Abu) fehlaminoacylieren, allerdings werden diese nichtkognaten Aminosäuren anschließend durch die Editierdomäne hydrolysiert. Durch Zufallsmutationen am *E. coli*-Chromosom wurde eine ValRS-Mutante mit einer Mutation in der Editierdomäne selektiert, die die Beladung von tRNA<sup>Val</sup> mit Cys bewirkt. Da Abu ähnliche sterische Merkmale aufweist wie Cys (in Abu ist die Thiolgruppe von Cys durch eine Methylgruppe ersetzt), ist die ValRS-Mutante in der Lage, auch Abu in Proteine einzubauen, wenn der mutierte *E. coli*-Stamm in Gegenwart von Abu gezüchtet wird. Laut massenspektrometrischer Analyse werden ungefähr 24 % der Valinreste an allen Valinpositionen im nativen Protein durch Abu ersetzt. In einer weiteren Studie verwendeten Tirrell und Mitarbeiter eine Thr252→Tyr252-Mutante zum partiellen Einbau von sechs Leucin-Analoga in Proteine.<sup>[211]</sup>

## 4.2.3. Anwendungen

Eine der wichtigsten Anwendungen der Mutagenesemethode mit auxotrophen Stämmen ist der Einbau von schweratomhaltigen Aminosäureanaloga zur Phasenbestimmung bei der Röntgenkristalllographie. Eine gängige Methode, um für das Verfahren der multiplen anomalen Dispersion ein Schweratom einzuführen, beruht auf dem Austausch von Methionin durch Selenomethionin.<sup>[212,213]</sup> Auf ähnliche Weise

wurden mit Methionin- und Tryptophan-auxotrophen *E. coli*-Stämmen Telluromethionin<sup>[214–216]</sup> bzw.  $\beta$ -Selenolo[3.2- $\beta$ ]pyrrolalanin<sup>[217]</sup> in Proteine eingebaut.

Isosterische Analoga von Aminosäuren wurden ebenfalls in *E. coli*-Proteine eingeführt, um die Faltung, Stabilität und Aktivität von Proteinen zu untersuchen. In einem Beispiel wurden Norleucin, Selenomethionin und Telluromethionin (bei diesen ist das Schwefelatom von Methionin jeweils durch Methylen, Se oder Te ausgetauscht) in humanes Annexin V eingebaut, um den Einfluss der Wechselwirkung durch die Seitenkettenpackung auf die Proteinstabilität zu analysieren.<sup>[218]</sup> Ähnliche Studien wurden mit fluorierten Aminosäuren durchgeführt<sup>[219–221]</sup> – so führte der Einbau von Trifluorleucin und Hexafluorleucin anstelle von Leucin zu einer erhöhten thermischen und chemischen Stabilität eines Leucin-Zipper-Proteins.<sup>[222,223]</sup>

Aminosäureanaloga können als spektroskopische Sonden eingesetzt werden. Zum Beispiel reagieren das Fluoreszenzemissionsmaximum und die Fluoreszenzintensität einer Barstar-Mutante, die eine Tryptophan-

Aminotryptophan-Mutation enthält, empfindlich auf den pH-Wert der unmittelbaren Umgebung.<sup>[224]</sup> Der Austausch von Tyr66 im verstärkt cyan fluoreszierenden Protein (ECFP, „enhanced cyan fluorescent protein“) durch 3-Aminotryptophan resultierte in einer signifikanten Rotverschiebung des Emissionspeaks und erzeugte ein „goldenes“ Fluoreszenzprotein ( $\lambda_{\text{max}} = 574 \text{ nm}$ ).<sup>[225]</sup> Fluorosubstituierte Aminosäuren können als NMR-Sonden verwendet werden. Beispielsweise wurde im bakteriophagen  $\lambda$ -Lysozym Methionin durch Fluormethionin substituiert und die Ligandenbindung mit <sup>19</sup>F-NMR-Spektroskopie untersucht.<sup>[226–228]</sup> Fluoriertes Tryptophan wurde für <sup>19</sup>F-NMR-spektroskopische Studien in das cyan fluoreszierende Protein (CFP)<sup>[229]</sup> und das Chaperon PapD eingebaut.<sup>[230]</sup>

Nichtproteinogene funktionelle Gruppen, die selektive Angriffspunkte zur weiteren Proteinmodifikation bereitstellen, wurden ebenfalls mithilfe der genannten Methoden eingeführt. Beispiele dafür sind der Austausch von Phenylalanin durch das elektroaktive 3-Thienylalanin<sup>[231]</sup> und von Methionin durch Alkenyl- und Alkinyldeivate.<sup>[232–235]</sup> Mithilfe eines Methionin-auxotrophen Stamms wurde Azidohomoalanin eingebaut. Dieses kann durch Staudinger-Ligation mit Triarylphosphan-Reagentien<sup>[236]</sup> oder durch eine Kupfer(I)-katalysierte Cycloaddition mit Alkinreagentien<sup>[237]</sup> selektiv modifiziert werden. Auch eine am Computer entworfene PheRS-Mutante aus *E. coli* wurde zum partiellen Einbau von *p*-Acetylphenylalanin in Proteine genutzt; die Ketogruppe wurde anschließend mit Biotinhydrazid unter milden Bedingungen markiert.<sup>[238]</sup>

Die Verwendung von auxotrophen Stämmen für die Mutagenese unterliegt jedoch mehreren Einschränkungen. Das Verfahren ist nicht ortsspezifisch, d.h., eine bestimmte Aminosäure kann an allen Stellen im gesamten Protein (und im gesamten Proteom) durch das Aminosäureanalogen er-

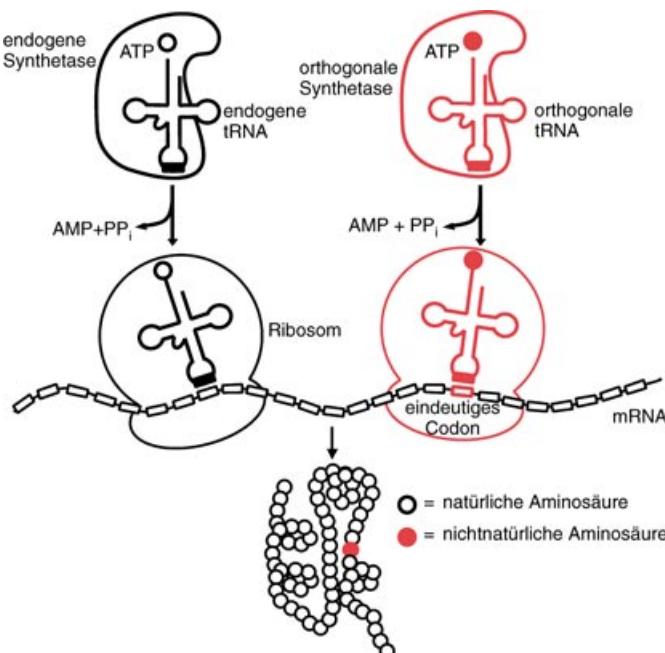
setzt werden. Der Anteil an nichtnatürlicher Aminosäure kann ebenfalls schwanken. Eine quantitative Substitution lässt sich nur in seltenen Fällen erreichen, da es schwierig ist, die endogenen Aminosäuren vollständig in der Zelle abzureichern. Allgemein anwendbar ist die Methode daher nur für nahe Strukturanaloga der Standard-Aminosäuren, denn die Substitutionen müssen sowohl von der Synthetase als auch an sämtlichen nichtpermissiven Positionen im Proteom, an denen eine bestimmte Aminosäure eingebaut werden soll, toleriert werden.

## 5. Ein erweiterter Code

Durch ortsgerichtete Mutagenese können Aminosäuren in einem Protein durch die anderen zwanzig Standard-Aminosäuren selektiv substituiert werden. Die Verwendung auotroper Stämme ermöglicht darüber hinaus die Substitution einer Aminosäure durch ein eng verwandtes Strukturanalagon im gesamten Proteom, normalerweise in Konkurrenz mit der Standard-Aminosäure. Idealerweise möchte man in der Lage sein, eine entsprechende ortsspezifische Mutagenese mit nichtnatürlichen Aminosäuren auszuführen. Dies setzt voraus, dass die nichtnatürliche Aminosäure auf ähnliche Weise wie die zwanzig Standard-Aminosäuren genetisch durch ein eindeutiges Codon codiert wird.

### 5.1. Methodik

Die „21.“ Aminosäure, Selenocystein (Sec), wird durch ein In-Frame-UGA-Nonsense-Codon codiert, das durch eine eindeutige Sec-tRNA<sup>Sec</sup> (generiert durch enzymatische Modifikation von Seryl-tRNA<sup>Sec</sup>) in Gegenwart eines speziellen



**Abbildung 13.** Ein allgemeines Verfahren zum ortsspezifischen Einbau von nichtnatürlichen Aminosäuren *in vivo*. PP<sub>i</sub> = Pyrophosphat.

Elongationsfaktors und eines *cis*-agierenden Elements translatiert wird.<sup>[4]</sup> In der Theorie genügen zur *In-vivo*-Gencodierung von nichtnatürlichen Aminosäuren ein eindeutiges tRNA-Codon-Paar, eine kognate Aminoacyl-tRNA-Synthetase (im Folgenden als Synthetase bezeichnet) und die nichtnatürliche Aminosäure (Abbildung 13). Die tRNA muss so konstruiert sein, dass sie nicht von den endogenen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen des Wirtes erkannt wird, in der Translation aber effizient arbeitet (orthogonale tRNA). Diese tRNA muss auf ein eindeutiges Codon hin, das für keine der zwanzig Standard-Aminosäuren codiert, die neuartige Aminosäure bereitstellen. Ebenfalls notwendig ist eine neue Aminoacyl-tRNA-Synthetase (eine orthogonale Synthetase), die die orthogonale tRNA aminoacyliert, aber keine der endogenen tRNAs. Diese Synthetase darf die tRNA ausschließlich mit der gewünschten Aminosäure und nicht mit einer endogenen Aminosäure aminoacylieren. Entsprechend kann die nichtnatürliche Aminosäure kein Substrat für die endogenen Synthetasen sein. Die Aminosäure schließlich muss nach Zugabe des Wachstumsmediums effizient in das Cytoplasma transportiert oder aber durch den Wirt biosynthetisiert werden.<sup>[239]</sup>

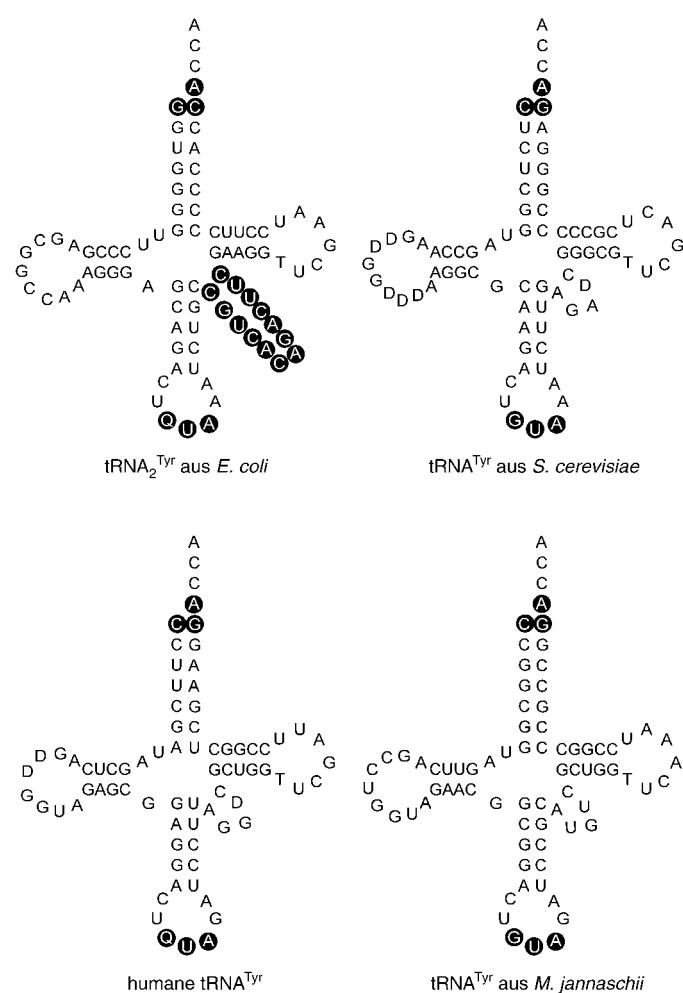
In einem ersten Ansatz für die Mutagenese mit nichtnatürlichen Aminosäuren wurde auf *E. coli* zurückgegriffen, das leicht genetisch manipuliert werden kann und eine hohe Transformationseffizienz zeigt. Zudem sind bereits vielfältige Selektions- und Screeningmethoden für *E. coli* etabliert. Zu Anfang wurde das Amber-Nonsense-Codon (UAG) zur Codierung der nichtnatürlichen Aminosäure genutzt, da dieses unter den drei Stop-Codons in *E. coli* und *S. cerevisiae* am wenigsten verwendet wird. Darüber hinaus enthalten manche *E. coli*-Stämme natürliche Amber-Suppressor-tRNAs, die ohne signifikanten Einfluss auf Wachstumsgeschwindigkeiten Standard-Aminosäuren effizient einbauen können (die meisten Gene, die für das normale *E. coli*-Wachstum essenziell sind, enden nicht mit dem TAG-Codon).<sup>[240, 241]</sup> Amber-Suppressoren können auch gezielt gentechnisch erzeugt werden, und sowohl natürliche wie auch gentechnisch erzeugte Amber-Suppressoren wurden routinemäßig für die konventionelle Proteinmutagenese in *E. coli*<sup>[124, 125, 242]</sup> und beim *In-vitro*-Einbau von nichtnatürlichen Aminosäuren in Proteine eingesetzt. Nonsense-Suppressoren wurden zudem zur Verwendung in Säugerzellen,<sup>[243, 244]</sup> Hefe<sup>[245, 246]</sup> und *C. elegans*<sup>[247, 248]</sup> entweder identifiziert oder erzeugt. Es sollte demnach bei einer Vielfalt von Organismen möglich sein, UAG oder UGA zum Einbau von nichtnatürlichen Aminosäuren in Proteine zu verwenden, ohne das Wachstum des Wirtsorganismus zu beeinträchtigen.

Bei unseren ersten Versuchen, ein orthogonales Amber-Suppressor-tRNA/Synthetase-Paar zu generieren, modifizierten wir die Spezifität eines existierenden *E. coli*-tRNA/Synthetase-Paares. Schlüsselnukleotide an der Grenzfläche tRNA/Synthetase wurden so mutiert, dass die Affinität der tRNA für ihre kognate Synthetase reduziert war, gleichzeitig aber die Orthogonalität zu den anderen endogenen Synthetasen aufrechterhalten blieb. Danach wurde eine Mutante der Wildtyp-Synthetase entwickelt, die eindeutig die mutierte orthogonale tRNA erkennt, aber weiterhin orthogonal zu den endogenen tRNAs in *E. coli* ist.

Gemäß der Röntgenstruktur des Komplexes aus Glutaminyl-tRNA-Synthetase (GlnRS) aus *E. coli* und der tRNA<sub>2</sub><sup>Gln</sup><sup>[249]</sup> befinden sich die Mutationen der tRNA<sub>2</sub><sup>Gln</sup> an drei spezifischen Kontaktstellen zur GlnRS.<sup>[250,251]</sup> Die tRNA-Mutanten wurden in vivo auf Aminoacylierungsreaktionen und in Suppressionsassays für das Amber-Codon einzeln getestet, wobei eine effiziente orthogonale Amber-Suppressor-tRNA identifiziert wurde. Dann wurde eine Bibliothek von GlnRS-Mutanten hergestellt, die nach ihrer Fähigkeit selektiert wurden, die orthogonale tRNA zu aminoacylieren. Die beste dieser Mutanten aminoacylierte die orthogonale tRNA mit ungefähr 10% der Geschwindigkeit der Wildtyp-tRNA<sup>Gln</sup>. Eine ideale orthogonale Synthetase sollte jedoch keine endogene *E. coli*-tRNA acylieren, da selbst eine moderate Fehlacylierung einer Wildtyp-tRNA mit einer nichtnatürlichen Aminosäure dazu führt, dass die nichtnatürliche Aminosäure an anderen nichtcodierten Stellen im Protein falsch eingebaut wird. Da es uns nicht gelang, ein orthogonales Glutaminyl-tRNA/Synthetase-Paar zu generieren und außerdem Mutationen innerhalb der tRNA nicht additiv, sondern auf komplizierte Weise miteinander wechselwirken<sup>[250]</sup> waren wir gezwungen, nach anderen Strategien zu suchen.

Ein zweiter Ansatz zur Erzeugung eines orthogonalen tRNA/Synthetase-Paares basiert auf der Verwendung eines tRNA/Synthetase-Paares aus einem anderen Organismus in *E. coli*. Grundlage war die Beobachtung, dass einige prokaryotische und eukaryotische tRNA/Synthetase-Paare wegen abweichender Identitätselemente der tRNAs keine signifikanten Kreuzreaktionen eingehen.<sup>[127,252]</sup> Es wurde z.B. nachgewiesen, dass der GlnRS aus *E. coli* die N-terminale RNA-Bindungsdomäne der GlnRS aus *S. cerevisiae* fehlt, sodass die GlnRS aus *E. coli* die tRNA<sup>Gln</sup> aus Hefe nicht aminoacyliert.<sup>[253]</sup> Unsere Untersuchungen ergaben, dass die Amber-Suppressor-tRNA<sup>Gln</sup> aus Hefe (*Sc*-tRNA<sub>CUA</sub><sup>Gln</sup>) ebenfalls kein Substrat für GlnRS aus *E. coli* ist, in der bakteriellen Translation aber effizient arbeitet. Darüber hinaus fanden wir, dass GlnRS aus Hefe keine der *E. coli*-tRNAs aminoacyliert, sehr wohl aber die Amber-Suppressor-*Sc*-tRNA<sub>CUA</sub><sup>Gln</sup> in vitro.<sup>[254]</sup> Das tRNA<sub>CUA</sub><sup>Gln</sup>/GlnRS-Paar aus *S. cerevisiae* ist daher ein orthogonales Paar in *E. coli*. Leider konnte keine GlnRS-Mutante aus Hefe entwickelt werden, die die orthogonale tRNA mit einer nichtnatürlichen Aminosäure in *E. coli* aminoacyliert. Grund ist möglicherweise die geringe intrinsische Aktivität der Synthetase in Bakterien.

Ebenfalls untersucht wurden tRNA/Synthetase-Paare aus Hefe, die für verschiedene hydrophobe Aminosäuren spezifisch sind.<sup>[255]</sup> Die Studien konzentrierten sich auf das tRNA<sup>Tyr</sup>/TyrRS-Paar, da TyrRS keine Korrekturlesefunktion hat und sich die prokaryotischen und eukaryotischen tRNA<sup>Tyr</sup>'s signifikant unterscheiden (Abbildung 14). In-vitro-Studien haben tatsächlich erwiesen, dass die tRNA<sup>Tyr</sup> von *S. cerevisiae* und *H. sapiens* nicht durch bakterielle Synthetasen aminoacyliert werden kann, ebensowenig aminoacyliert die TyrRS dieser Organismen die bakterielle tRNA.<sup>[256,257]</sup> Leider zeigten In-vivo-Suppressionsassays für den Amber-Codon, dass die Amber-Suppressor-tRNA<sub>CUA</sub><sup>Tyr</sup> aus *S. cerevisiae* oder *H. sapiens* nicht orthogonal in *E. coli* ist.<sup>[258]</sup>



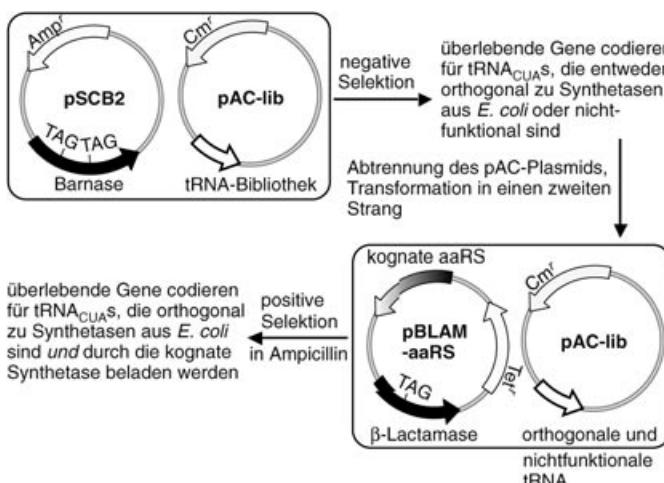
**Abbildung 14.** Vergleich der tRNA<sup>Tyr</sup> unterschiedlicher Spezies. Die Hauptidentitätselemente sind schwarz schattiert. Die prokaryotische tRNA<sup>Tyr</sup> enthält einen langen, variablen Arm und ein G1:C72-Paar, eukaryotische und archaeabakterielle tRNA<sup>Tyr</sup> enthalten dagegen einen kurzen Arm und ein C1:G72-Paar.

Wir richteten daraufhin unsere Aufmerksamkeit auf die Archaeabakterien als Quelle für orthogonale tRNA/Synthetase-Paare in *E. coli*. Die archaeabakteriellen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen ähneln hinsichtlich Homologie und tRNA-Erkennungselementen eher den eukaryotischen als den prokaryotischen Synthetasen.<sup>[115]</sup> Anders als die Synthetasen aus eukaryotischen Zellen, die in *E. coli* oft nur schwach exprimiert werden oder geringe Aktivität aufweisen, können die archaeabakteriellen Synthetasen in *E. coli* effizient und in aktiver Form exprimiert werden. Außerdem stehen mehr als 16 Genomsequenzen aus Archaeabakterien zur Verfügung, und in den Genomen kommen keine Introns vor, was die Klonierung von archaeabakteriellen Synthetase-Genen erleichtert. Schließlich wurde gezeigt, dass fast alle tRNAs aus *Halobacterium cutirebrum*, einem archaeabakteriellen Halophil, nicht durch Synthetasen aus *E. coli* beladen werden können.<sup>[127]</sup>

Das erste orthogonale tRNA/Synthetase-Paar in *E. coli*, das aus Archaeabakterien generiert wurde, war das Amber-Suppressor-Tyrosyl-tRNA/Synthetase-Paar aus *Methanococ-*

*cus jannaschii*.<sup>[258]</sup> Die TyrRS aus *M. jannaschii* (*MjTyrRS*) diskriminiert zwischen tRNAs mit C1:G72 (einem eukaryotischen Erkennungselement) und solchen mit G1:C72 (einem prokaryotischen Erkennungselement) und aminoacyliert nicht den tRNA-Rohextrakt aus *E. coli*.<sup>[259]</sup> Weiterhin fehlt *MjTyrRS* der größte Teil der C-terminalen Bindungsdomäne für die Anticodon-Schleife ihrer tRNA<sup>Tyr</sup>, was darauf hinweist, dass die Identitätselemente außerhalb der Anticodon-region hauptsächlich für die Erkennung durch TyrRS zuständig sind und die Orthogonalität dieses Paares sicherstellen. Eine Mutation in der Anticodon-Schleife sollte daher kaum Einfluss auf die Erkennung dieser tRNA durch andere Synthetasen und ihre Affinität für *MjTyrRS* haben. Zellen, die ein β-Lactamase-Gen mit einem Amber-Codon an permissiver Position exprimieren und sowohl mit einer Suppressor-tRNA<sub>CUA</sub><sup>Tyr</sup> (*MjtRNA<sub>CUA</sub><sup>Tyr</sup>*) aus *M. jannaschii* als auch der *MjTyrRS* cotransformiert werden, überleben in der Tat hohe Konzentrationen von Ampicillin (die Suppression der Ambergmutation führt zur Produktion von Volllängen-β-Lactamase und ermöglicht den Zellen, in Ampicillin zu überleben).<sup>[258]</sup> Dieses Ergebnis belegte zwar, dass *MjtRNA<sub>CUA</sub><sup>Tyr</sup>* ein ausgezeichnetes Substrat für *MjTyrRS* in *E. coli* ist, leider beobachteten wir aber auch eine deutliche Aminoacylierung dieser tRNA durch endogene Synthetasen.

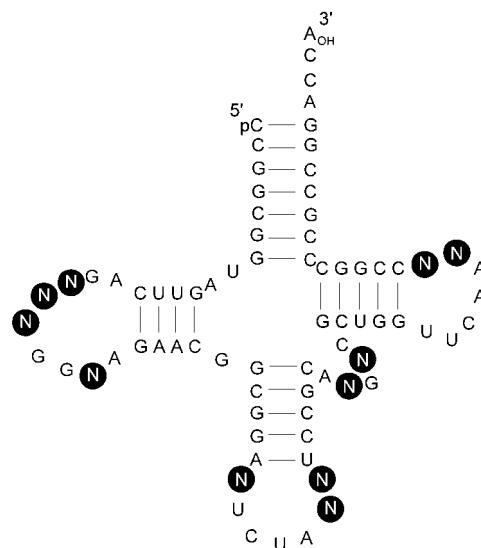
Um die Erkennung der  $MjtRNA_{CUA}^{Tyr}$  durch endogene Synthetasen in *E. coli* weiter abzuschwächen, wurde entsprechend eine allgemeine Strategie zur Selektion von orthologen tRNAs in *E. coli* entwickelt. Die Aktivität für die kognate Synthetase und auch bezüglich der Translationsmaschinerie (z.B. der ribosomalen A-Stelle, dem Elongationsfaktor Tu) sollte dabei aufrechterhalten bleiben.<sup>[260]</sup> Die Methode basiert auf einer Kombination von negativen und positiven Selektionsschritten an einer Bibliothek von Suppressor-tRNA-Mutanten in Gegenwart und Abwesenheit der kognaten Synthetase (Abbildung 15). Im negativen Selektionsschritt werden Amber-Nonsense-Codons an Positionen in das Barnase-Gen eingeführt, die für andere Aminosäuren substitutionspermissiv sind. Wird ein Mitglied der Suppressor-tRNA-Bibliothek durch eine endogene Synthetase aus *E.*



**Abbildung 15.** Negative und positive Selektion zur Gewinnung von orthogonalen tRNAs.

*coli* aminoacyliert (d.h., die tRNA ist nicht orthogonal zu den Synthetasen aus *E. coli*), dann werden die Amber-Codons supprimiert, die Ribonuclease Barnase wird produziert, und die Zellen sterben ab. Nur Zellen mit orthogonalen oder nichtfunktionalen tRNAs können überleben. Alle überlebenden Klone werden einer positiven Selektion unterzogen, bei der in das  $\beta$ -Lactamase-Gen an permissiver Position ein Amber-Codon eingebaut wird. tRNAs, die für die kognate Synthetase gute Substrate abgeben, werden nach ihrer Fähigkeit selektiert, das Amber-Codon zu supprimieren und aktive  $\beta$ -Lactamase zu produzieren. Zellen mit nichtfunktionalen tRNAs oder mit tRNAs, die nicht durch ihre kognate Synthetase erkannt werden, reagieren empfindlich auf Ampicillin. Beide Selektionen überleben nur Zellen mit tRNAs, die 1) keine Substrate für endogene Synthetasen in *E. coli* sind, 2) durch die interessierende Synthetase aminoacyliert werden können und 3) in der Translation funktionieren.

Zum Aufbau der Suppressor-tRNA-Bibliothek wurden elf Nukleotide der  $Mjt\text{tRNA}_{\text{CUA}}^{\text{Tyr}}$ , die nicht direkt mit der  $Mjt\text{tRyRS}$  wechselwirken, zufallsmutiert (Abbildung 16). Nach negativen und positiven Selektionsrunden wurde eine tRNA-Mutante identifiziert ( $\text{mutRNA}_{\text{CUA}}^{\text{Tyr}}$ ), die die  $\beta$ -Lactamase-Amber-Mutation bis auf etwa den Hintergrundwert in *E. coli* supprimiert. Offensichtlich ist diese tRNA-Mutante für die *E. coli*-Synthetasen ein schlechteres Substrat als die Wildtyp- $Mjt\text{tRNA}_{\text{CUA}}^{\text{Tyr}}$ . Wenn die  $\text{mutRNA}_{\text{CUA}}^{\text{Tyr}}$  mit  $Mjt\text{tRyRS}$



Suppressor-tRNA	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ampicillin)		
	mit pBLAM	mit pBLAM JYRS	mit pBLAM JYRS
ohne tRNA	10	10	
Wildtyp- <i>M/Tyr</i>	56	1220	
mutRNA <sub>Tyr</sub> <sub>CUA</sub>	12	436	
Mutante 2	20	632	
Mutante 3	14	459	

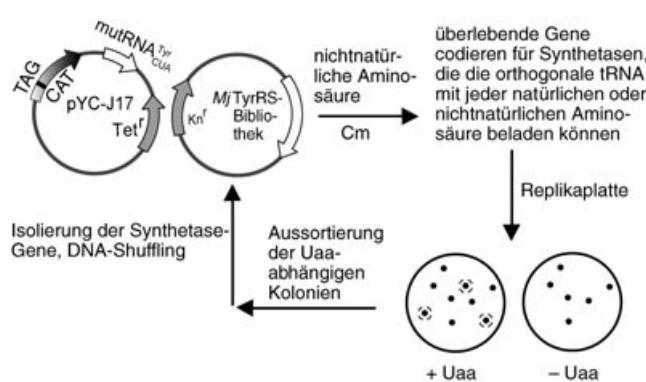
**Abbildung 16.** Eine Bibliothek von tRNA-Mutanten auf der Basis der tRNA<sup>Tyr</sup> von *M. jannaschii* mit randomisierten Nukleotiden N. In der Tabelle sind die Suppressionseffizienzen ausgewählter tRNA-Mutanten angegeben.

coexprimiert wird, überleben die Zellen hohe Konzentrationen von Ampicillin. Das bedeutet, dass die tRNA nach wie vor von ihrer eigenen TyrRS aminoacyliert wird und bei der Translation effizient funktioniert.<sup>[260]</sup> Der niedrige Hintergrundwert und die hohe Aktivität machen dieses mutRNA<sub>CUA</sub><sup>Tyr</sup>/MjTyrRS-Paar zu einem ausgezeichneten orthogonalen Paar in *E. coli*.

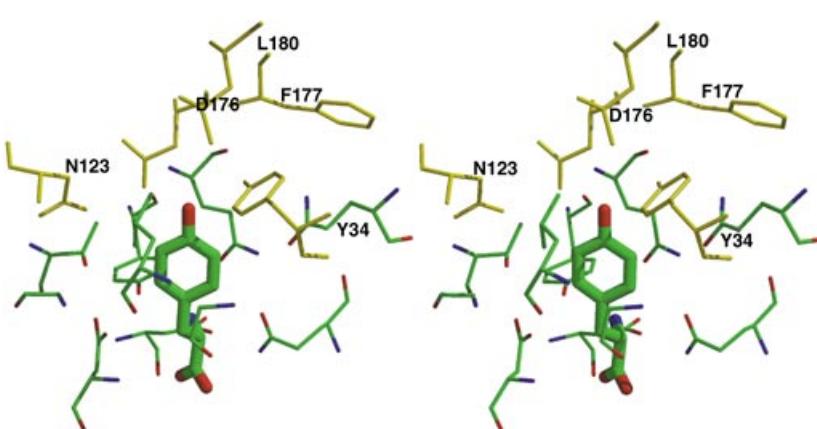
Als nächstes wurde die Substratspezifität der orthogonalen Synthetase so verändert, dass die kognate orthogonale tRNA nur mit der gewünschten nichtnatürlichen Aminosäure und mit keiner der zwanzig Standard-Aminosäuren beladen wird. Eine Aminosäurepromiskuität in der orthogonalen Synthetase würde Proteine hervorbringen, die an der Mutationsstelle eine Mischung von nichtnatürlichen und Standard-Aminosäuren enthalten. So wurde bei dem Versuch, *p*-Fluorphenylalanin (*p*-F-Phe) ortsspezifisch in Proteine einzubauen, das Paar Amber-Suppressor-tRNA<sub>CUA</sub><sup>Phe</sup> aus Hefe/PheRS in einen *E. coli*-Stamm eingeführt, der auxotroph für Phe ist und *p*-F-Phe nicht prozessieren kann.<sup>[261]</sup> Da PheRS aus Hefe ihre kognate tRNA sowohl mit Phe als auch mit *p*-F-Phe aminoacyliert, wurden 64–75 % *p*-F-Phe an der Mutationsstelle eingebaut; den übrigen Anteil nehmen Phe und Lys ein (selbst bei einem Überschuss von *p*-F-Phe im Wachstumsmedium). Zudem wurden 7 % *p*-F-Phe an Positionen nachgewiesen, für die das Phe-Codon codiert, was darauf hinweist, dass die endogene PheRS aus *E. coli* außer Phe auch *p*-F-Phe einbaut.

Wir entwickelten daraufhin einen allgemeinen Ansatz zur Erzeugung von Synthetasemutanten, die selektiv ihre kognate orthogonale tRNA mit nichtnatürlichen Aminosäuren aminoacylieren.<sup>[262]</sup> Mit der Kristallstruktur der homologen TyrRS aus *Bacillus stearothermophilus* als Orientierung wurden im aktiven Zentrum der TyrRS von *M. jannaschii* fünf Reste (Tyr32, Asn123, Asp158, Ile159 und Leu162) im Umkreis von 6.5 Å um die *para*-Position des Arylringes des gebundenen Tyrosins gegen alle vorkommenden Standard-Aminosäuren randomisiert (Abbildung 17). Um einen hohen Hintergrund von Wildtyp-TyrRS zu vermeiden, wurden die Reste zunächst alle zu Alanin mutiert. Die resultierende

inaktive Ala<sub>5</sub>-TyrRS wurde als Templat für die PCR-Mutagene verwendet; damit wurde die TyrRS-Bibliothek durch Mutation der fünf Positionen zu NNK (N = A, T, G oder C; K = G oder T) aufgebaut. Die Größe dieser Bibliothek war  $1.6 \times 10^9$ , sodass alle möglichen Mutanten komplett erfasst waren. Die Bibliothek wurde einer positiven Selektion unterzogen, basierend auf der Suppression eines Amber-Stop-Codons im CAT-Gen (CAT = Chloramphenicolacetyltransferase) in Gegenwart der nichtnatürlichen Aminosäure und Chloramphenicol (anders als  $\beta$ -Lactamase, die in das Periplasma sekretiert wird, befindet sich CAT im Cytoplasma). Die überlebenden Zellen wurden dann in Gegenwart von Chloramphenicol und ohne die nichtnatürliche Aminosäure angezüchtet. Die nicht überlebenden Zellen wurden mit einer Replikaplatte isoliert, die mit der nichtnatürlichen Aminosäure ausgestattet war. Aus diesen Zellen wurden die mutierten Synthetase-Gene isoliert, in vitro durch DNA-Shuffling rekombiniert und für weitere Selektionsrunden mit steigenden Konzentrationen an Chloramphenicol in *E. coli* rücktransformiert (Abbildung 18).



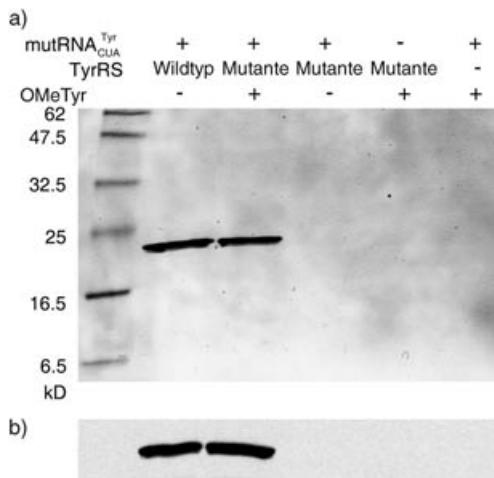
**Abbildung 18.** Ein allgemeines Schema mit positiver Selektion und negativem Screening zur Auffindung von Synthetasen, die für nichtnatürliche Aminosäuren spezifisch sind. Cm = Chloramphenicol.



**Abbildung 17.** Stereobild des aktiven Zentrums von TyrRS; dargestellt sind die Aminosäurereste der TyrRS aus *B. stearothermophilus*. Die entsprechenden Reste der TyrRS aus *M. jannaschii* erhalten die Nummerierung: Tyr32 (Tyr34), Glu107 (Asn123), Asp158 (Asp176), Ile159 (Phe177) und Leu162 (Leu180) (Reste aus *B. stearothermophilus* in Klammern). Mutierte Reste sind gelb eingezzeichnet.<sup>[262]</sup>

Mit diesem Selektionsschema wurde zunächst eine MjTyrRS-Synthetasemutante erzeugt, die selektiv O-Methyl-L-tyrosin (OMeTyr) auf das Amber-Codon hin in Proteine einfügen kann.<sup>[262]</sup> OMeTyr ähnelt Tyrosin und Phenylalanin strukturell, sodass sich eine ausgezeichnete Möglichkeit bietet, die Translationsgenauigkeit dieser Methode zu testen. Nach zwei Selektionsrunden und DNA-Shuffling wurde ein Klon isoliert, dessen Überlebensfähigkeit in Chloramphenicol entscheidend davon abhing, ob dem Wachstumsmedium 1 mM OMeTyr zugesetzt wurde. Die Zellen überlebten in Chloramphenicol in Gegenwart von OMeTyr, starben aber ohne die Aminosäure ab. Um zu belegen, dass der beobachtete Phänotyp auf den ortsspezifischen Einbau von OMeTyr durch das mutRNA<sub>CUA</sub><sup>Tyr</sup>/mutTyrRS-Paar und das Amber-Stop-Codon zurückgeht, wurde eine OMeTyr-Mutante der Dihydrofolatreduktase (DHFR) aus *E. coli* erzeugt und charakterisiert. Die Mutation

betraf dabei das dritte Codon des DHFR-Gens von *E. coli*, das zu TAG mutiert wurde. Dazu wurde ein His6-Tag an den C-Terminus gekuppelt, um die Proteinaufbereitung und die Trennung von der endogenen DHFR zu erleichtern. Die Volllängen-DHFR wurde nur dann produziert, wenn die TyrRS-Mutante, die mutRNA<sub>CUA</sub><sup>Tyr</sup> und OMeTyr vorhanden waren (Abbildung 19). Massenanalysen des intakten Proteins



**Abbildung 19.** Anreicherung der DHFR aus *E. coli* unter verschiedenen Bedingungen. a) Silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel von aufbereiteter DHFR; die linke Spur enthält den Molekulargewichtsmarker. b) Western-Blot des Proteinges. Der His6-Tag am COOH-Ende von DHFR wurde durch einen His5-Antikörper detektiert.

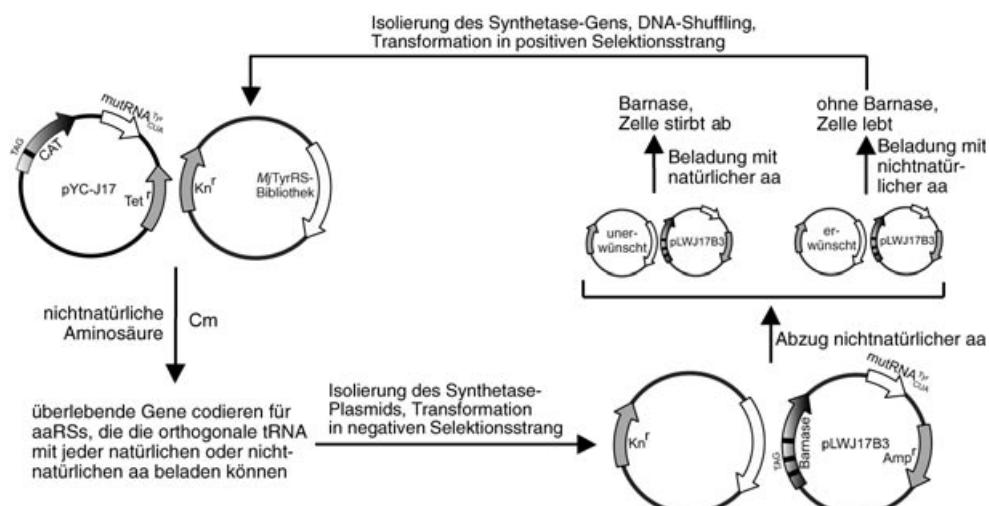
und tryptischer Fragmente bestätigten, dass OMeTyr auf das TAG-Codon hin eingebaut wurde. Es wurde kein Einbau von Tyrosin oder anderen Aminosäuren an der TAG-Position beobachtet, und OMeTyr wurde nur auf das TAG Codon hin eingefügt und an keiner anderen Stelle. Das Wachstum der *E. coli*-Zellen war nicht signifikant beeinträchtigt, und die Ausbeute an Protein betrug 2 mg pro Liter in Minimalmedium, was 77% der Ausbeute der Wildtyp-DHFR entspricht. Diese Ergebnisse zeigten erstmals, dass gentechnisch veränderte Bakterien mit hoher Effizienz und fehlerfreier Translation für eine nichtnatürliche Aminosäure codieren können.<sup>[262]</sup>

Nach diesem erfolgversprechenden Ansatz versuchten wir, L-3-(Naphthyl)alanin, das bezüglich der Tyrosinstruktur eine signifikante Störung darstellt, genetisch zu codieren.<sup>[263]</sup> Es wurde eine gegenüber der ersten Variante leicht veränderte Bibliothek von TyrRS-Mutanten aufgebaut (durch Zufallsmutationen von Tyr32, Asp158, Ile159, Leu162 und Ala167). Aus der Bibliothek wurden vier Synthetasemutanten identifiziert, die für L-3-(Naphthyl)alanin hoch affin sind. Nach DNA-Shuffling der vier Synthetase-Gene wurde eine Synthetasemutante (SS12) erhalten, die für L-3-(Naphthyl)alanin eine verstärkte, für die endogenen Aminosäuren aber eine erheblich reduzierte Aktivität aufwies. Um den Einbau der nichtnatürlichen Aminosäure zu verifizieren, wurde im Mittelteil des DHFR-Gens der Maus ein Amber-Codon eingefügt. Die Proteinexpression und massenspektrometrische Analyse bestätigten, dass das Paar mutRNA<sub>CUA</sub><sup>Tyr</sup>/SS12-Synthetasemutante selektiv L-3-(Naphthyl)alanin in

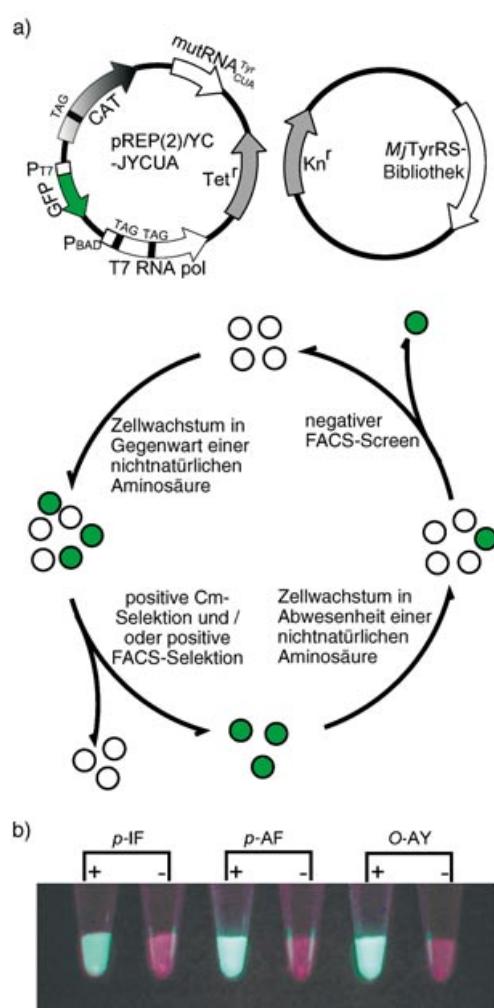
Proteine einbaut. Effizienz und Genauigkeit kommen dem Einbau der zwanzig Standard-Aminosäuren gleich.<sup>[263]</sup> Dieses Ergebnis bedeutet, dass die Methodik auf eine Vielfalt nichtnatürlicher Aminosäuren anwendbar ist.

Alternative Selektionsschemata wurden entwickelt, um die Aminosäurespezifität der orthogonalen *Mj*TyrRS aufzufinden. Eine der weiterentwickelten Methoden basiert darauf, die Bibliothek von Synthetasemutanten einer positiven Selektion auszusetzen. Dabei wird die Fähigkeit der Synthetasemutanten geprüft, in Gegenwart der nichtnatürlichen Aminosäure an permissiven Positionen im CAT-Gen Ambermutationen zu supprimieren. Bei einer anschließenden negativen Selektion ohne die nichtnatürliche Aminosäure werden diejenigen Synthetasen eliminiert, die endogene Aminosäuren erkennen. Die negative Selektion beruht auf der Suppression von Amber-Nonsense-Mutationen im Barnase-Gen.<sup>[254]</sup> Bei dem Paar mutRNA<sub>CUA</sub><sup>Tyr</sup>/*Mj*TyrRS aus *M. jannaschii* wurden zur Optimierung der Selektionsbedingungen zunächst inaktive und OMeTyr-spezifische *Mj*TyrRS-Synthetasemutanten aus einem großen Pool von Wildtyp-*Mj*TyrRS selektiert.<sup>[264]</sup> Eine Barnase-Mutante mit drei Amber-Codons (in pLWJ17B3 codiert) zeigte dabei eine optimale Selektionsstringenz und Anreicherungseffizienz.<sup>[265]</sup> Die Zellen, die die positive und negative Selektion überleben, codieren für Synthetasen, die die orthogonale tRNA ausschließlich mit der nichtnatürlichen Aminosäure beladen. Synthetasebibliotheken der zweiten Generation werden generiert, wenn durch Mutagenese oder DNA-Shuffling weitere Mutationen eingeführt werden. An diesen Bibliotheken lassen sich weitere Selektionsrunden anwenden, bis eine Synthetasemutante mit der gewünschten Aktivität erhalten wird. Mit diesem neuen Schema wurden orthogonale mutRNA<sub>CUA</sub><sup>Tyr</sup>/*Mj*TyrRS-Paare von *M. jannaschii* isoliert, die für ein breites Spektrum nichtnatürlicher Aminosäuren verwendbar sind (Abbildung 20). Durch Verändern von Stringenz, Reihenfolge und Zahl der positiven und negativen Selektionsschritte lassen sich sowohl die Aktivität als auch die Genauigkeit beeinflussen.<sup>[265]</sup>

Bei einer zweiten Methode zum Auffinden von spezifischen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen wird der amplifizierbare Fluoreszenzreporter T7/GFPuv (pREP) verwendet, der auf eine Amber-Suppression anspricht.<sup>[266]</sup> Wenn im Gen der T7-RNA-Polymerase Amber-Codons an permissiven Positionen supprimiert werden, produziert das Reportersystem ein Volllängenprotein, das wiederum die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFPuv) induziert. Dieses System wurde mit dem CAT-Reporter (pYC-J17) zum Plasmid pREP(2)/YC-JYC<sub>UA</sub> kombiniert, bestehend aus der orthogonalen mutRNA<sub>CUA</sub><sup>Tyr</sup>, der Ambermutante von CAT und den T7/GFPuv-Reportergenen (Abbildung 21 a).<sup>[266]</sup> Wenn *E. coli*-Zellen, die diesen Reporter enthalten, mit einer *Mj*TyrRS-Bibliothek transformiert und in Gegenwart einer nichtnatürlichen Aminosäure angezüchtet werden, können die aktiven Synthetasen fluoreszenzspektroskopisch und/oder anhand ihrer Resistenz gegen Chloramphenicol identifiziert werden. Anschließend werden die Zellen ohne die nichtnatürliche Aminosäure und ohne Chloramphenicol weiter angezüchtet, und die nichtfluoreszierenden Zellen, die die gewünschte Synthetasemutante enthalten, werden durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung („fluorescence activated



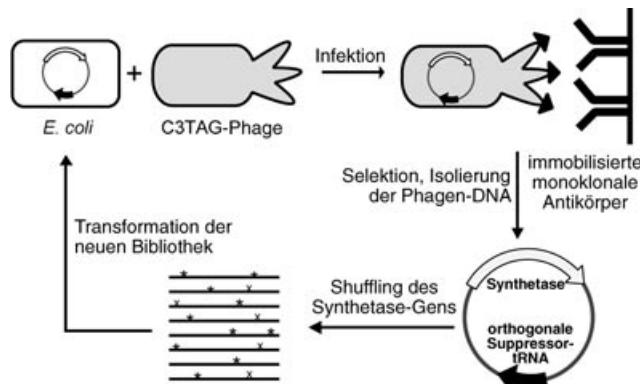
**Abbildung 20.** Ein allgemeines Schema mit positiver und negativer Selektion zur Auffindung von Synthetasen, die für nichtnatürliche Aminosäuren spezifisch sind.



**Abbildung 21.** a) Ein kombiniertes System mit einem Fluoreszenzreporter und Chloramphenicol-Selektion zur Auffindung von Synthetase-spezifität. b) Anhand der grünen Fluoreszenz kann das von nichtnatürlichen Aminosäuren aktivierte GFP nachgewiesen werden.

cell sorting“, FACS) gesammelt. Die Vorteile dieser Methode bestehen darin, dass ein einzelner *E.-coli*-Stamm sowohl positive als auch negative Selektionsrunden ausführen kann und dass Zellen, die den Reporter enthalten, mit und ohne Aminosäure repliziert werden und anhand der aminosäure-abhängigen Fluoreszenz visuell nachweisbar sind (Abbildung 21b).<sup>[266]</sup> Alternativ kann die doppelt positive Chloramphenicol- und FACS-Selektion auch durch eine negative Barnase-Selektion verfolgt werden.<sup>[265]</sup>

Auch eine direkte positive Selektion wurde entwickelt. Diese beruht auf der Verwendung eines für die nichtnatürliche Aminosäure (oder ein Peptid, das die Aminosäure enthält) spezifischen Antikörpers. Mithilfe des Antikörpers werden Phagen angereichert, in die die nichtnatürliche Aminosäure eingeschlossen ist (Abbildung 22).<sup>[267]</sup> Ein C<sub>3</sub>-Peptid mit einer Ambermutation wird mit dem N-Terminus des Hülleproteins pIII des VSM13-Phagen so fusioniert, dass zur Produktion von C3TAG das Amber-Stopp-Codon suppri-



**Abbildung 22.** Selektionsverfahren zum Einbau von nichtnatürlichen Aminosäuren auf der Basis von Phagen. Zellen von *E. coli* werden durch einen Phagen infiziert, der in einem Hülleprotein-Gen ein Stop-Codon enthält. Die Phagen mit aktiver Synthetase präsentieren an der Oberfläche die nichtnatürliche Aminosäure und werden mithilfe immobilisierter monoklonaler Antikörper selektiert.

miert werden muss. Zellen mit einem Phagemid, der eine orthogonale Suppressor-tRNA und eine Synthetasebibliothek exprimiert, werden mit dem C3TAG-Phagen infiziert. Bei einer aktiven Synthetase wird nun das C3TAG supprimiert und die kognate Aminosäure auf der Phagenoberfläche präsentiert. Der Phagen-Pool wird mit immobilisierten monoklonalen Antikörpern gegen die nichtnatürliche Aminosäure inkubiert. Anschließend können die Phagen mit der für die nichtnatürliche Aminosäure spezifischen Synthetase isoliert werden. Bei einer simulierten Selektion mithilfe von Antikörpern, die auf das Asp-Epitop ansprechen, wurden Asp-präsentierende Phagen aus einem Pool von Asn-präsentierenden Phagen 300fach angereichert.

### 5.2. Genetisch codierte nichtnatürliche Aminosäuren: ein Überblick

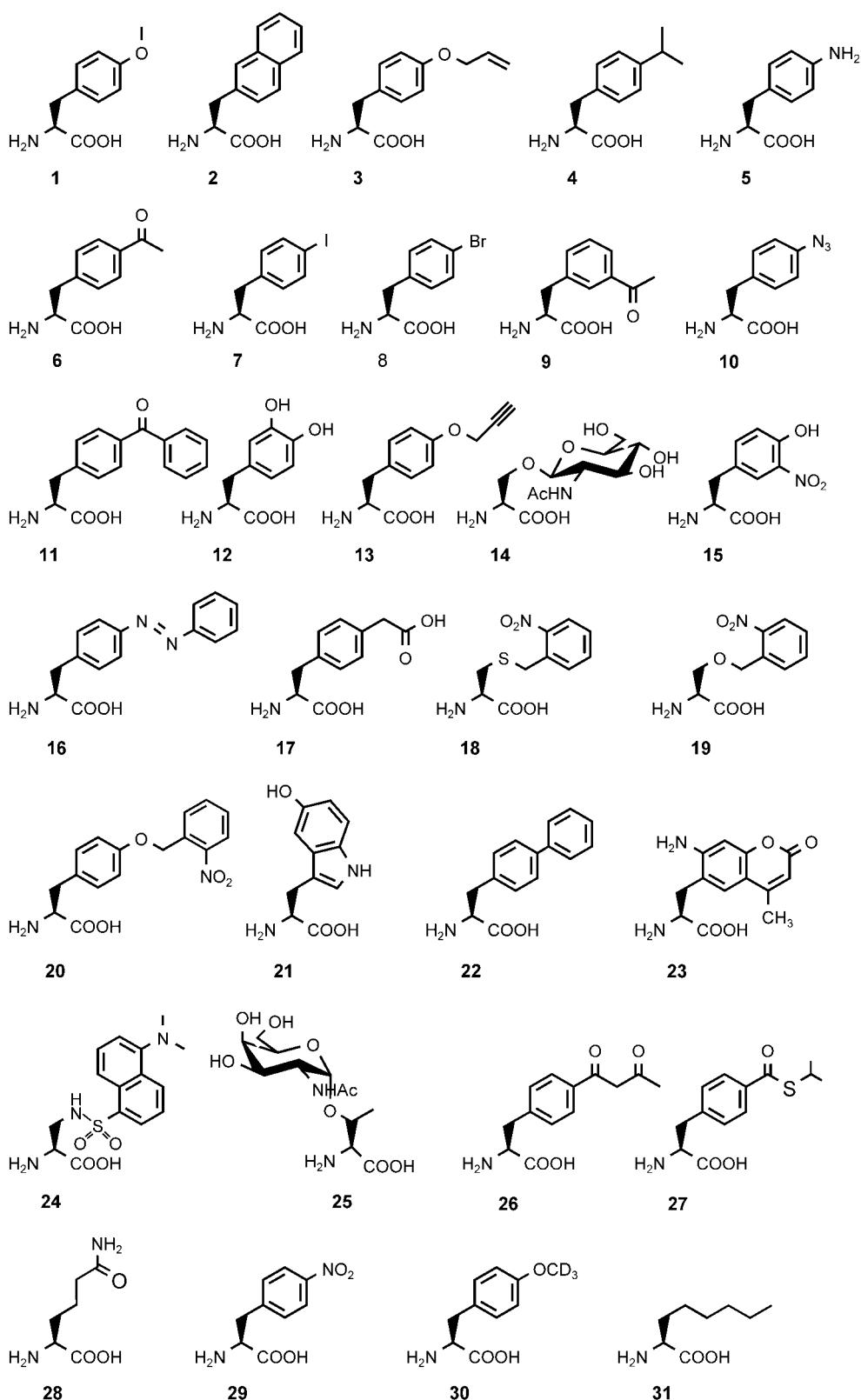
Mit den obigen Selektionsverfahren wurde der genetische Code von *E. coli* um mehr als dreißig neue Aminosäuren erweitert (Abbildung 23).<sup>[262,263,266,268–275]</sup> Darunter sind: 1) substituierte Analoga von Tyrosin und Phenylalanin wie *O*-Methyl-L-tyrosin (**1**),<sup>[262]</sup> 3-Nitro-L-tyrosin (**15**),<sup>[276]</sup> *p*-Amino-L-phenylalanin (**5**),<sup>[266]</sup> *p*-Nitro-L-phenylalanin (**29**),<sup>[276]</sup> *m*-Methoxy-L-phenylalanin<sup>[276]</sup> und *p*-Isopropyl-L-phenylalanin (**4**);<sup>[266]</sup> 2) photovernetzbare Aminosäuren mit Arylazid- (**10**) und Benzophenongruppen (**11**);<sup>[269,270]</sup> 3) Aminosäuren mit besonderer chemischer Reaktivität, darunter *p*-Acetyl-L-phenylalanin (**6**), *m*-Acetyl-L-phenylalanin (**9**),<sup>[271,273]</sup> *O*-Allyl-L-tyrosin (**3**),<sup>[268]</sup> *O*-(2-Propinyl)-L-tyrosin (**13**),<sup>[276]</sup> *p*-Ethylthiocarbonyl-L-phenylalanin (**27**) und *p*-(3-Oxobutanoyl)-L-phenylalanin (**26**);<sup>[276]</sup> 4) Aminosäuren mit Schweratom zur Phasenbestimmung in der Röntgenkristallographie, darunter *p*-Iod-L-phenylalanin (**7**) und *p*-Brom-L-phenylalanin (**8**);<sup>[272]</sup> 5) die redoxaktive Aminosäure Dihydroxy-L-phenylalanin (**12**);<sup>[274]</sup> 6) glycosyierte Aminosäuren, darunter  $\beta$ -*N*-Acetylglucosamin-*O*-serin (**14**) und  $\alpha$ -*N*-Acetylgalactosamin-*O*-threonin (**25**);<sup>[275]</sup> 7) fluoreszierende Aminosäuren mit Naphthyl- (**2**), Dansyl- (**24**), 7-Aminocumarinseitenketten (**23**);<sup>[263,276]</sup> 8) photospaltbare und photoisomerisierbare Aminosäuren mit Azobenzyl- (**16**) und Nitrobenzyl-Cys-, -Ser- und -Tyr-Seitenketten (**18–20**);<sup>[276]</sup> 9) das Phosphotyrosinmimetikum *p*-Carboxymethyl-L-phenylalanin (**17**); 10) das Glutamin-Homolog Homoglutamin (**28**);<sup>[276]</sup> 11) 2-Aminoctansäure (**31**). Diese Liste legt den Schluss nahe, dass Synthetasen für eine große Zahl von strukturdiversen Aminosäureseitenketten (von Zuckern bis hin zu großen aromatischen Systemen) erzeugt werden können. Zudem scheinen die Ribosom- und Elongationsfaktoren auch eine gewisse strukturelle Diversität zu tolerieren, in Einklang mit vorherigen In-vitro-Mutagenesestudien.

Die nichtnatürlichen Aminosäuren werden im Allgemeinen mit ausgezeichneter Genauigkeit und Effizienz durch die kognaten tRNA/Synthetase-Paare eingebaut. Jedes Paar wurde hinsichtlich seiner Fähigkeit charakterisiert, Zellen, die mit dem Gen für die CAT-Amber-Mutante transformiert sind, in Gegenwart und Abwesenheit der nichtnatürlichen Aminosäure gegen Chloramphenicol resistent zu machen.<sup>[262]</sup> Weiter wurde jedes orthogonale tRNA/Synthetase-Paar zum

Einbau der entsprechenden nichtnatürlichen Aminosäure in Proteine an permissiven Stellen in den Genen (*E. coli* oder Maus) für DHFR,<sup>[262,263]</sup> die Z-Domäne von Protein A<sup>[268,271]</sup> und Myoglobin<sup>[266]</sup> eingesetzt. Jedes Protein wurde mit einem His<sub>6</sub>-Tag markiert und aufbereitet (His<sub>6</sub>= Hexahistidin). In Gegenwart der nichtnatürlichen Aminosäure und des orthogonalen tRNA-Synthetase-Paars konnten Milligramm-Mengen des mutierten Proteins pro Liter Minimalmedium isoliert werden. Die Ausbeuten bezogen auf das Wildtyp-Protein lagen üblicherweise bei 25–50 % und in manchen Fällen bei über 75 %.<sup>[262,263]</sup> Das intakte Protein und tryptische Fragmente wurden mithilfe hoch auflösender Massenspektrometrie analysiert,<sup>[271]</sup> um zu verifizieren, dass ausschließlich die nichtnatürliche Aminosäure auf das TAG-Codon hin eingebaut wird und diese auch an keiner anderen Stelle des Proteins auftaucht.

Einige dieser nichtnatürlichen Aminosäuren haben neuartige Eigenschaften, die für biochemische und zelluläre Untersuchungen von Nutzen sind. Zum Beispiel tragen *p*-Azidophenylalanin (**10**) und *p*-Benzoylphenylalanin (**11**) Seitenketten, die in vitro und in vivo durch Lichtenregung vernetzt werden können.<sup>[269,270,277]</sup> Benzophenon ist ein besonders nützlicher Photovernetzer, da es bei verhältnismäßig langen Wellenlängen absorbiert ( $\approx 360$  nm) und im angeregten Zustand effizient in C-H-Bindungen inserieren kann.<sup>[278]</sup> Tatsächlich konnte eine homodimere Mutante der Glutathion-S-Transferase (GST), an deren Dimerschnittstelle *p*-Benzoylphenylalanin eingebaut war, im Cytoplasma von *E. coli* mit mehr als 50 % Ausbeute vernetzt werden (Abbildung 24). Diese Aminosäuren könnten zur Untersuchung von Proteinstruktur und -dynamik sowie von Protein-Protein- und Protein-Nucleinsäure-Wechselwirkung in vitro und in vivo verwendet werden. Weitere Einsatzmöglichkeiten finden sich bei der Identifizierung von Rezeptoren für Orphan-Liganden oder der selektiven Immobilisierung von Proteinen und Zellen auf Oberflächen.

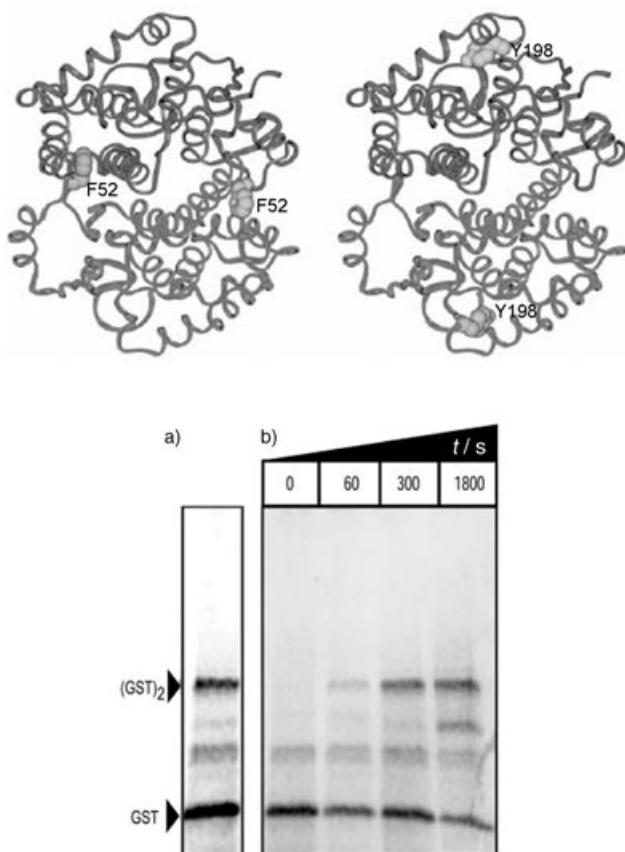
Die Ketoaminosäuren **6** (*p*-Ac-Phe) und **9** können zur selektiven chemischen Modifizierung von Proteinen, speziell solchen mit multiplen Cysteinresten, genutzt werden.<sup>[271,273]</sup> Die Ketogruppe geht eine Reihe von Reaktionen ein, darunter Additionen, Aldolreaktionen, Transaminierungen und Isomerisierungen. Sie reagiert unter milden wässrigen Bedingungen mit Hydraziden, Alkoxyaminen und Semicarbaziden unter Bildung von Hydrazon-, Oxim- und Semicarbazongruppen, die unter physiologischen Bedingungen stabil sind. Zum Beispiel lieferte die In-vitro-Reaktion einer *p*-Ac-Phe-Mutante der Z-Domäne von Protein A mit 1 mm Fluoresceinhydrazid bei pH 6.5 ein fluoresceinmarkiertes Protein (molares Verhältnis 1:1) mit über 90 % Ausbeute (Abbildung 25a).<sup>[271]</sup> Durch Markierung von *p*-Ac-Phe-substituierten Proteinen mit Aminoxyzuckern wurden homogene Glycoprotein-Mimetika in ebenfalls über 90 % Ausbeute erzeugt (Abbildung 25b). Protein-Oligosaccharid-Konjugate mit definierter Struktur werden synthetisiert, indem man entweder stufenweise Monosaccharide mithilfe von Glycosyltransferasen anknüpft oder in einer Stufe direkt ein Aminoxyglycan verwendet.<sup>[279]</sup> Auf ähnliche Weise konnten Keto-Mutanten effizient mit Hydrazid-Derivaten von Biotin (Abbildung 25c) und Polyethylenglycol markiert werden. Mit



**Abbildung 23.** Strukturen von nichtnatürlichen Aminosäuren, um die der genetische Code von *E. coli* erweitert wurde.

Polyethylenglycol könnten homogene Proteine ortsspezifisch mit hoher chemischer Reinheit hergestellt werden. Durch Umsetzung mit *m*-Acetylphenylalanin wurde eine Keto-Mu-

tante des Membranproteins LamB aus *E. coli* erzeugt, die *in vivo* mit jeweils einem der wasserlöslichen Fluorophore Kaskadenblau, Alexa 568 oder Alexa 647 markiert werden



**Abbildung 24.** Die Reste Phe52 (oben links) und Tyr198 (oben rechts) in Glutathion-S-Transferase wurden zum *p*-Benzoylphenylalanin (*p*Bpa) mutiert. a) Die aufbereitete GST (Phe52pBpa) wurde *in vitro* vernetzt und durch Western-Blot mit einem anti-GST-Antikörper nachgewiesen. b) Kovalente Dimerisierung von GST (Phe52pBpa) in *E. coli* als Funktion der Zell-Einstrahlhäufigkeit bei 365 nm. Die Tyr198pBpa-GST konnte nicht vernetzt werden.

konnte.<sup>[273]</sup> In einem ähnlichen Experiment wurden Proteinmutanten, die nichtnatürliche Alkinyl- (**13**) oder Azidaminoäuren (**10**) enthielten, mit einem entsprechenden Azid- oder Alkinyl-derivatisierten Markierungsreagens in einer Kupfervermittelten [2+3]-Cycloaddition umgesetzt und auf diese Weise selektiv und in hoher Ausbeute (> 75 %) mit Fluorophoren und Polyethylenglycol modifiziert (Abbildung 25d).<sup>[280]</sup> Darüber hinaus haben wir kürzlich nachgewiesen, dass Thioestergruppen enthaltende Aminosäuren Proteine selektiv mit nichtpeptidischen Gruppen versehen können.<sup>[281]</sup>

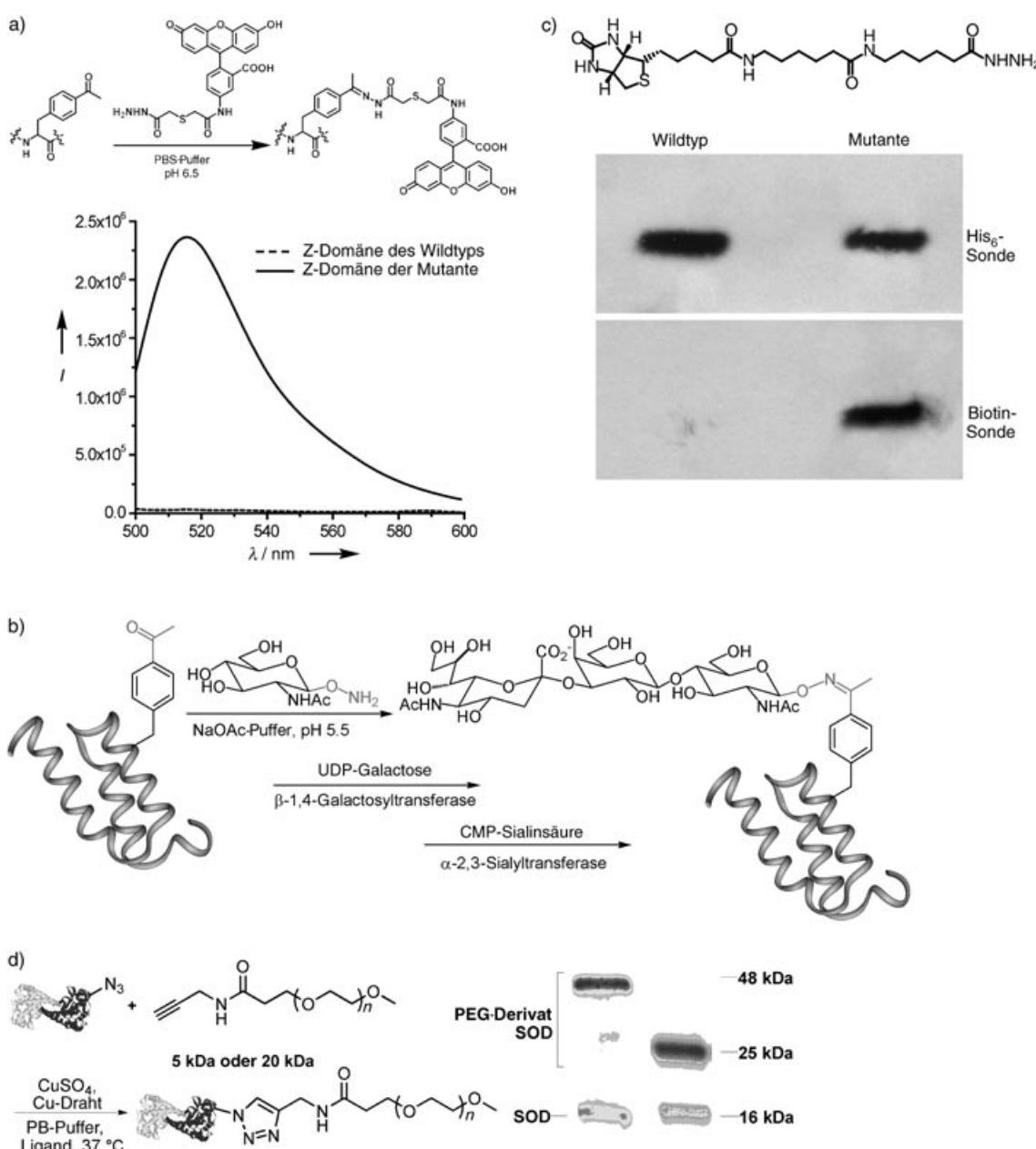
Die Proteinglycosylierung ist eine essenzielle posttranskriptionale Modifikation in eukaryotischen Zellen. Sie moduliert die Faltung und Sekretion von Proteinen, ihre biologische Aktivität, ihre Lokalisation und die Halbwertszeit im Serum.<sup>[282]</sup> Es existieren zwar etliche Methoden zur Herstellung der reinen Glycoform eines Proteins,<sup>[283–286]</sup> für die meisten gelten aber gravierende Einschränkungen hinsichtlich der Größe, Quantität und/oder Qualität der produzierten Glycoproteine. Um einen allgemeinen Ansatz zur Lösung dieses Problems zu finden, versuchten wir, die Spezifität der *MjTyrRS* so zu modifizieren, dass sie die nichtnatürliche

Aminosäure  $\beta$ -N-Acetylglucosamin-*O*-serin (**14**;  $\beta$ -GlcNAc-Ser) akzeptiert. Um den Transport in die Zelle zu erleichtern, wurde die veresterte Aminosäure verwendet; diese wird dann in der Zelle durch cytosolische Esterasen desacyliert. Es wurden Synthetasemutanten isoliert, die auf das Amber-Codon hin die glycosyierte Aminosäure ortsspezifisch mit hoher Translationsgenauigkeit und in Ausbeuten von 20 bis 30 % bezogen auf das Wildtyp-Myoglobin einbauen. In einem ELISA-Assay wurde gezeigt, dass ein für GlcNAc spezifisches Lectin (*Bandeiraea simplicifolia* II, BSII) signifikant an die  $\beta$ -GlcNAc-Ser-Mutante von Myoglobin bindet; eine Bindung des Wildtyp-Myoglobins wurde hingegen nicht beobachtet.<sup>[275]</sup>

Die O-GlcNAc-Ser-Mutante von Myoglobin ist auch ein Substrat für Galactosyltransferasen. Wenn eine Myoglobin-mutante mit radioaktivem UDP-[6-H<sup>3</sup>]-Gal in der GlcNAc-Seitenkette zusammen mit einer  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase inkubiert wird, resultiert ein radiomarkiertes Produkt (Abbildung 26).<sup>[275]</sup> Das Verfahren, das auch zur selektiven Einführung von  $\alpha$ -GalNAc-Thr in Proteine eingesetzt wurde,<sup>[275]</sup> wird momentan auf andere O- und N-verknüpfte Zucker ausgedehnt. Außerdem versuchen wir, andere posttranskriptional modifizierte Aminosäuren wie methyliertes und acetyliertes Lysin oder phosphoryliertes Tyrosin, Serin und Threonin genetisch zu codieren. Kürzlich isolierten wir eine *MjTyrRS*-Mutante, die selektiv *p*-Carboxymethyl-L-phenylalanin (**17**) einbaut. **17** ist ein stabiles Mimetikum von Phosphotyrosin, das in Studien der Signaltransduktion Anwendung findet. Der erfolgreiche Einbau der 2-Aminoocostsäure **31** zeigt, dass prinzipiell auch lipidmodifizierte Aminosäuren direkt in Proteine eingeführt werden können.

Die genetische Codierung schweratomhaltiger Aminosäuren könnte die Phasenbestimmung in der Röntgenkristallographie erleichtern. Zu diesem Zweck wurde ein orthogonales tRNA/Synthetase-Paar generiert, das selektiv *p*-Iod-phenylalanin (**7**; *p*-Iod-Phe) auf das Amber-Codon hin einbaut.<sup>[265]</sup> Mit dieser Methode wurde eine durch *p*-Iod-Phe mutierte Z-Domäne von Protein A in einer Ausbeute von etwa 60 % bezogen auf das Wildtyp-Protein erhalten (5.5 bzw. 9.2 mg L<sup>-1</sup> in Minimalmedium). Um zu testen, ob das Verfahren zur Phasenbestimmung durch einfache anomale Dispersion (SAD) genutzt werden kann (das anomale Signal  $\Delta f''$  von Iod bei 8 keV beträgt 6.91 und ist somit sechsmal intensiver als das von Selen (1.15)), wurde Bakteriophagen-T4-Lysozym, dessen Reste Ser44 oder Phe153 zu *p*-Iod-Phe mutiert waren, exprimiert, aufbereitet und kristallisiert. Die Kristallstruktur wurde mit einer Cu<sub>Kα</sub>-Quelle bei 1.54 Å Auflösung durch SAD-Phasierung mit dem eingebauten Iodatom ermittelt.<sup>[287]</sup>

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) ist ein leistungsfähiges biologisches Werkzeug, das die Expression, Lokalisierung, Dynamik und Wechselwirkungen von Proteinen direkt in der intakten Zelle sichtbar machen kann.<sup>[288]</sup> Hindernis für seine Verwendung sind häufig jedoch die Größe des GFP und der Umstand, dass GFP nur als ein N- oder C-terminales Fusionsprotein eingebaut werden kann. Außerdem benötigt das GFP Zeit für die Reifung des Fluorophors. Die cotranslative Einführung von nichtnatürlichen Aminosäuren mit relativ kleinen fluoreszenten Seitenketten könnte

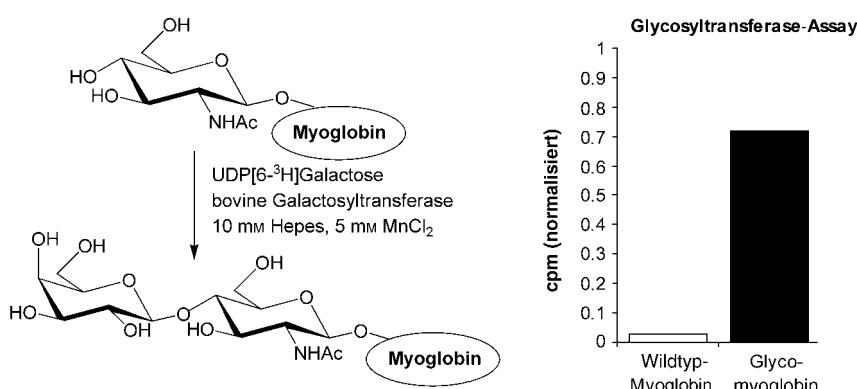


**Abbildung 25.** a) In-vitro-Markierung eines mit *p*-Acetyl-L-phenylalanin substituierten Proteins mit Fluoresceinhydrazid: Markierungsschema und Fluoreszenzspektrum der markierten Proteine. b) Erzeugung von homogenen Glycoprotein-Mimetika durch Konjugation mit einem Aminoxyzucker und anschließende Extension durch Glycosyltransferasen. c) In-vitro-Markierung eines mit *p*-Ac-Phe substituierten Proteins mit Biotinhydrazid. An den C-Terminus von Wildtyp und Proteinmutante wurde ein His<sub>6</sub>-Tag gekuppelt und durch Western-Blot mit einem His<sub>6</sub>-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Nur das substituierte Protein wurde markiert und detektiert. d) Protein-Derivatisierung mit PEG durch Kupfer-vermittelte Cycloaddition: Reaktionsschema und SDS-PAGE-Analyse.

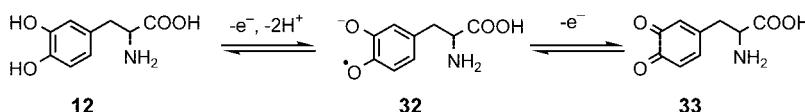
Störungen in der Struktur des Wirtproteins minimieren, einen breiteren Spektralbereich zugänglich machen und eine bessere Steuerung der Position des Fluoreszenzreporters ermöglichen (Einbau an jedem permissivem oberflächenexponiertem Rest statt nur am N- oder C-Terminus). Zu diesem Zweck isolierten wir zum einen TyrRS-Mutanten von *M. jannaschii*, die selektiv 7-Amino- (**23**) und 7-Hydroxycumarin in Proteine in *E. coli* einbauen,<sup>[289]</sup> zum anderen erzeugten wir eine orthogonale Leucyl-Synthetase, die die Dansylaminosäure **24** in Proteine in Hefe einbaut.<sup>[290]</sup> Mit der umgebungs-

empfindlichen Cumarinaminosäure **23** wurde das Auffalten von Apomyoglobin und die Wechselwirkung von GroEL mit seinen Substraten beobachtet.

Eine weitere neuartige Aminosäure, die in Proteine eingeführt wurde, ist Dihydroxyphenylalanin (DHP; **12**).<sup>[274]</sup> DHP lässt sich in zwei Stufen zum Chinon oxidieren (Abbildung 27) und könnte als Sonde und zur Modifizierung von Elektronenübertragungsprozessen in Proteinen genutzt werden. Die redoxaktive Aminosäure 5-Hydroxytryptophan wurde ebenfalls selektiv in Proteine in Säugerzellen einge-



**Abbildung 26.** Direkter Einbau von  $\beta$ -GlcNAc-Ser in Myoglobin in *E. coli* und Extension durch Galactosyltransferase und UDP[6- $^3$ H]-Galactose.



**Abbildung 27.** Oxidation von Dihydroxyphenylalanin (12) zum Semichinonradikal 32 und zum Chinon 33.

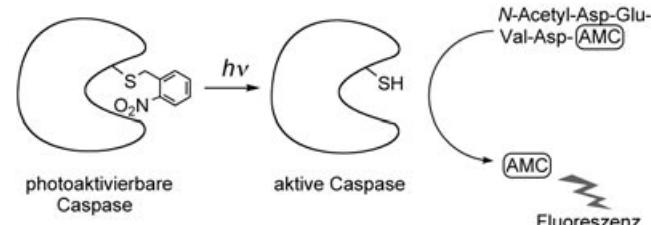
baut (unter Verwendung des Opal-Codons). Durch elektrochemische Oxidation bildet 5-Hydroxytryptophan ein effizientes Proteinvernetzungsgens in vitro. Nichtnatürliche Aminosäuren können auch zur Modulierung der elektronischen Eigenschaften eines Proteins genutzt werden. Die Einführung von mehreren nichtnatürlichen Aminosäuren anstelle von Tyr65 in GFP ergab beispielsweise blauverschobene Emissionsspektren und veränderte Quantenausbeuten.<sup>[272]</sup> Weiterhin wurden deuterierte und  $^{15}$ N-Derivate von OMeTyr als NMR-Sonden ortsspezifisch in Proteine eingebaut.<sup>[227]</sup>

Die Azobenzol-derivatisierte Aminosäure **16**<sup>[291]</sup> und die photoaktivierbaren Aminosäuren Nitrobenzyl-Cys, -Ser und -Tyr (**18–20**)<sup>[292]</sup> wurden kürzlich in Proteine in *E. coli* und/oder Hefe eingebaut. Diese Aminosäuren ermöglichen die Regulierung der Proteinaktivität in vivo durch Lichteinstrahlung. Wird z.B. das Cystein im aktiven Zentrum der pro-

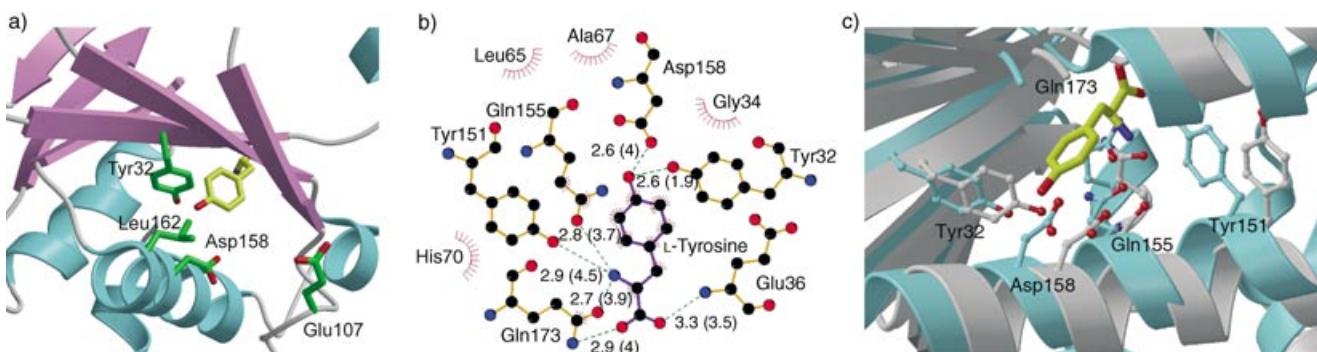
apoptotischen Protease Caspase 3 zu Nitrobenzylcystein mutiert, erhält man zunächst ein katalytisch inaktives Enzym. Die Aktivität wird wiederhergestellt, indem man die Nitrobenzylschutzgruppe durch Lichtanregung abspaltet (Abbildung 28). Die Aminosäure **16** kann photochemisch vom *trans*- in das *cis*-Isomer umgewandelt werden, woraus sich Perspektiven für die Photoregulierung von biologischen Prozessen in vivo ergeben. Zum Beispiel wurde diese Aminosäure zur Photoregulierung der Bindung von cAMP an das katabolitische Aktivatorprotein von *E. coli* verwendet.<sup>[291]</sup>

Unsere Versuche, TyrRS-Mutanten aus *M. jannaschii* mit veränderter Spezifität aufzufinden, brachten erstaunlichen Erfolg. Die meisten der Mutanten gingen aus einer Bibliothek mit fünf randomisierten Aminosäuren im aktiven Zentrum hervor.<sup>[239, 262]</sup> Anhand kristallographischer Untersuchungen der Wildtyp- und der mutanten Synthetasen lassen sich Rückschlüsse auf den Ursprung der Aminosäurespezifität dieser

wichtigen Enzymklasse ziehen. Ein Strukturvergleich des aktiven Zentrums der Wildtyp-*Mj*TyrRS mit und ohne Aminosäure macht deutlich, dass die Bindung von Tyrosin erhebliche Strukturveränderungen verursacht (Abbildung 29).<sup>[293, 294]</sup> Der Rest Asp 158 bewegt sich bei Annähe-



**Abbildung 28.** Eine photoaktivierbare Caspase mit Nitrobenzylcystein im aktiven Zentrum. AMC = 7-Amino-4-methylcumarin.



**Abbildung 29.** a) Domäne zur Aminosäureerkennung der Wildtyp-TyrRS von *M. jannaschii*.<sup>[294]</sup> b) Wasserstoffbrücken zwischen dem Substrat Tyrosin und den wechselwirkenden Resten in der Bindungstasche. Angegeben sind die Bindungslängen (in Å) aus der Kristallstruktur des Komplexes TyrRS-Tyr-tRNA<sup>Tyr</sup>.<sup>[294]</sup> c) Vergleich von TyrRS aus *M. jannaschii* mit (cyan) und ohne Tyrosin (grau) im aktiven Zentrum.<sup>[293]</sup>

rung der Aminosäure dichter an das aktive Zentrum heran und bindet dort die Hydroxygruppe des Tyrosins, während sich Tyr32 entfernt, um der Hydroxygruppe des Tyrosins Platz zu machen. Ferner dreht sich die Tyr151-Seitenkette um 60° und bildet mit der  $\alpha$ -Aminogruppe des Tyrosins eine Wasserstoffbrücke von 2.9 Å Länge. Die Kristallstruktur einer für *p*-Bromphenylalanin spezifischen Synthetase wurde kürzlich aufgeklärt.<sup>[276]</sup> Sie lässt erkennen, dass die flexible Struktur der Wildtyp-Synthetase eine wichtige Rolle für die Spezifität dieses mutanten Enzyms spielt. Die Synthetasemutante unterscheidet sich vom Wildtyp durch fünf Mutationen (Y32L, E107S, D158P, I159L, L162E). Überraschenderweise ist die Helix  $\alpha$ 8 der Mutante gespalten, und die Reste 158, 159 und 162, die das aktive Zentrum im Wildtyp auskleiden, sind in der Mutante vom aktiven Zentrum weggedreht. Die Reste H160 und Y161, die in der Wildtyp-Struktur lösungsmittellexponiert sind, drehen sich dagegen in das Zentrum hinein und bilden so eine neue Bindungstasche mit ausgedehnten Van-der-Waals-Wechselwirkungen zum *p*-Bromphenylalanin. Zurzeit konstruieren wir neue Bibliotheken, in denen die gesamte Region (Reste 158–162) randomisiert wird, und nutzen dabei die Flexibilität dieser Region zur Auffindung von neuer Synthetaseaktivität.

Angesichts dieser erfolgreichen Experimente und der Verfügbarkeit von weiteren orthogonalen tRNA/Synthetase-Paaren, ist es nur wahrscheinlich, dass noch viel mehr nichtnatürliche Aminosäuren genetisch codiert werden. Wir versuchen derzeit, orthogonale tRNA/Synthetase-Paare zu entwickeln, die selektiv Aminosäuren mit Spinmarkierung (*p*-Cyanphenylalanin, eine IR-Sonde) sowie metallbindende und rückgratmodifizierte Aminosäuren (z. B. *N*-Methylaminosäuren,  $\beta$ -Aminosäuren und  $\alpha$ -Hydroxysäuren) einbauen. Es werden auch Verfahren entwickelt, um die Ausbeute der Proteinmutante weiter zu erhöhen. Ansätze betreffen die Optimierung der Expression (und der Protokolle zur Induktion) der orthogonalen tRNA und der Synthetase sowie die Selektion der Synthetase in Vollmedium. Tatsächlich konnten Cho und Mitarbeiter zeigen, dass solche modifizierten Verfahren Proteinmutanten in Mengen von 750 mg L<sup>-1</sup> liefern.<sup>[328]</sup> Synthetase- und tRNA-Mutanten mit erhöhter Aktivität können auch durch zusätzliche Mutagenese- und Selektionsrunden oder durch rationales Design unter Verwendung von Röntgenstrukturen von Komplexen der Synthetase- und Aminosäuremutante generiert werden. Es wurde nachgewiesen, dass die Affinität aminoacylierter tRNAs für den Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) und für die ribosomale A-Domäne je nach gekuppelter Aminosäure und tRNA variiert.<sup>[295]</sup> Wir beginnen ebenfalls damit, durch transposonale und chemische Mutagenese sowie durch Komplementierung mit genomischen DNA-Bibliotheken den Einfluss der endogenen Faktoren auf die Effizienz und Genauigkeit des Einbaus nichtnatürlicher Aminosäuren zu untersuchen. Zum Beispiel wurden transposonale Mutationen im *fis*-Gen identifiziert, die in einigen Fällen die Effizienz von Ambersuppressionen steigerten. Ähnliche Methoden könnten den Transport von nichtnatürlichen Aminosäuren verbessern und höhere Suppressionseffizienzen bei Zufallsmutationen im Ribosom, in den Freisetzungsfaktoren oder den tRNA-Genen ermöglichen.

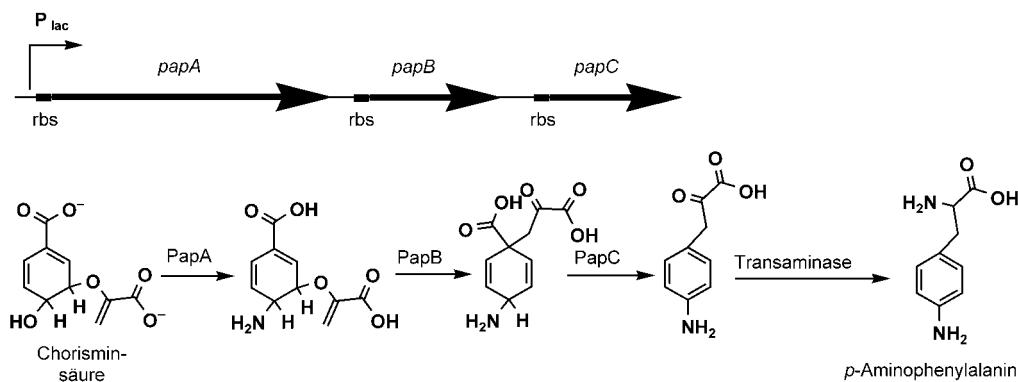
Anhand der mutierten Bakterien, die nun zur Verfügung stehen, kann experimentell untersucht werden, ob zusätzliche Aminosäuren Proteine mit verbesserten chemischen oder biologischen Eigenschaften hervorbringen oder einem Organismus einen evolutionären Vorteil verschaffen.<sup>[265]</sup> Mithilfe von Amber-Codon-Walk kann an jeder Position in einem Zielprotein eine Bibliothek von nichtnatürlichen Aminosäuren eingeführt werden. Alternativ kann die Mutagenese auch genutzt werden, um Amber-Codons statistisch in das Genom und in die resultierenden Stämme einzubauen, die auf Medien gezüchtet werden, die jede der oben genannten nichtnatürlichen Aminosäuren enthalten. Die so erzeugten Bibliotheken können unterschiedlichen Selektionsstufen unterzogen werden, um die Mutationen, die einen Wachstumsvorteil vermitteln, zu kartieren.

In einem verwandten Experiment haben wir gezeigt, dass nichtnatürliche Aminosäuren effizient in Polypeptide eingebaut werden, die mit dem pIII-Protein von filamentösen Phagen fusioniert sind, und so einen infektiösen Phagen generieren.<sup>[296]</sup> Damit ist es möglich, große Bibliotheken durch Phagen-Display von Peptiden und Proteinen mit natürlichen und nichtnatürlichen Aminosäuren als Bausteinen aufzubauen und auf neuartige Bindungs- oder katalytische Eigenschaften hin zu durchsuchen.

### 5.3. Biosynthese nichtnatürlicher Aminosäuren

Bei allen oben beschriebenen Experimenten müssen die Aminosäuren dem Wachstumsmedium zugefügt und von der Zelle aufgenommen werden, um durch das Amber-Codon in ein Protein eingebaut werden zu können. Es existiert eine große Zahl von Aminosäure- und Amintransportern, die relativ unspezifisch sind. Aus diesem Grund werden die meisten der von uns untersuchten Aminosäuren aus dem Wachstumsmedium in das Cytoplasma von *E. coli* transportiert und reichern sich dort in signifikanten Konzentrationen an. In manchen Fällen ist es notwendig, enzymatisch labile Derivate von hoch polaren Aminosäuren zu verwenden oder Aminosäuren abbauende Enzyme zu mutieren oder zu deaktivieren.

Eine alternative Strategie wäre die direkte Biosynthese der nichtnatürlichen Aminosäure im Wirtorganismus. Zu diesem Zweck wurde ein vollständig autonomes 21-Aminosäuren-Bakterium generiert, das folgende Komponenten enthält: die Gene für die Biosynthese von *p*-Amino-*L*-phenylalanin (*p*-AF, 5) aus einfachen Kohlenstoffquellen,<sup>[297]</sup> eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase<sup>[266]</sup> für *p*-AF (und für keine andere endogene Aminosäure) und eine tRNA,<sup>[262]</sup> die auf das Amber-Codon hin *p*-AF in Proteine einsetzt. Die Biosynthese von *p*-AF aus endogener Chorisminsäure (einem Zwischenprodukt bei der Biosynthese von aromatischen Aminosäuren) gelang mit den Genen *papA*, *papB* und *papC* aus *S. venezuelae* in Kombination mit einer unspezifischen Transaminase von *E. coli* (Abbildung 30). Mit *papA-C* ausgestattete *E. coli*-Zellen produzierten *p*-AF in ähnlichen Mengen wie andere aromatische Aminosäuren und wiesen ein normales Wachstum auf. In Gegenwart eines *p*-AF-spezifischen orthogonalen muttRNA<sub>CUA</sub><sup>Tyr</sup>/Synthetase-Paares



**Abbildung 30.** Biosynthese von *p*-Aminophenylalanin in *E. coli* durch die Gene *papA*, *papB* und *papC* aus *S. venezuelae*.

produzierten die mit *papA–C* transformierten *E. coli*-Zellen mit hoher Ausbeute und Genauigkeit Proteinmutanten, die an den vom Amber-Codon codierten Stellen *p*-AF enthalten.<sup>[297]</sup> Es sollte möglich sein, noch andere Aminosäuren in vivo genetisch zu codieren, z.B. methylierte, acetylierte und glycosyierte.

#### 5.4. Quadruplett-Codons

Die Zahl an nichtnatürlichen Aminosäuren, die in einem Organismus codiert werden kann, ist letztlich durch die Zahl der nichtcodierenden Codons vorgegeben. Es sollte möglich sein, zusätzlich zu den Nonsense-Codons auch seltene Codons zur Codierung von nichtnatürlichen Aminosäuren zu verwenden, wenngleich eine Konkurrenz mit kognaten Aminosäuren zu erwarten ist. Alternativ könnte man eine synthetische Variante von *E. coli* generieren, in der seltene Codons aus dem Wildtyp-Genom deletiert sind (durch Austausch gegen degenerierte Codons, die die gleiche Aminosäure spezifizieren) und stattdessen zur Codierung von nichtnatürlichen Aminosäuren genutzt werden.

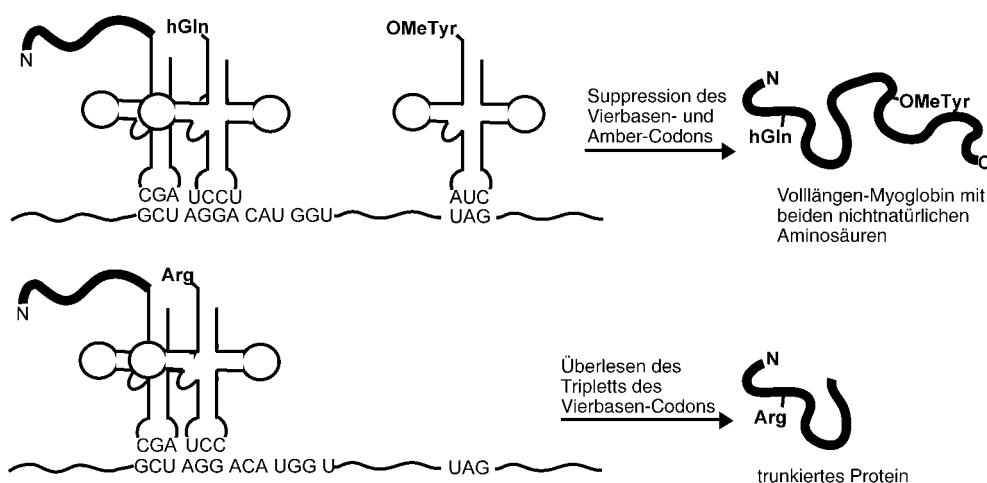
Ein weiterer Ansatz zur Codierung zusätzlicher Aminosäuren wäre die Verwendung von Quadruplett-Codons und kognaten Suppressor-tRNAs mit erweiterten Anticodon-Schleifen. Es gibt zahlreiche Beispiele für natürliche +1-Frameshift-Suppressoren, darunter vom *Su7*-Gen abgeleitete UAGN-Suppressoren ( $N = A, G, C$  oder  $T$ ) für Glutamin,<sup>[298]</sup> von *sufJ* abgeleitete Suppressoren des ACCN-Codons für Threonin<sup>[299]</sup> sowie von tRNA<sup>Lys</sup> und tRNA<sup>Gln</sup> abgeleitete CAAA-Suppressoren.<sup>[300]</sup> Darüber hinaus wurden durch genetische Selektion effiziente Suppressor-tRNAs für Vier- und Fünfbasen-Codons aus einer großen Bibliothek von tRNA-Mutanten identifiziert.<sup>[301,302]</sup> In dieser Studie wurde eine tRNA-Bibliothek, in der die Anticodon-Schleife der tRNA<sub>2</sub><sup>Ser</sup> (Position 31–38) gegen alle möglichen 8-bp-Sequenzen ausgetauscht war, mit einer zweiten Bibliothek gekreuzt, die alle möglichen Vierbasen-Codon-Sequenzen enthielt, die für Ser 70 der  $\beta$ -Lactamase codieren. Durch In-vivo-Selektion wurden nun die effizienten Paare von Suppressor-tRNA und Vierbasen-Codon identifiziert.<sup>[301]</sup> Darunter war auch eine tRNA-Mutante, die in der Anticodon-Schleife die Sequenz CUUCCUAG aufweist und effizient ein AGGA-Codon supprimiert.<sup>[302]</sup> Hierbei konkurriert die AGGA-Suppression

mit dem seltenen Codon AGG, was ein Grund für die Effizienz und Nichttoxizität dieser Suppressor-tRNA sein kann. Die Frameshift-Suppressor-tRNAs können *in vivo* eine Reihe der zwanzig Standard-Aminosäuren effizient in Proteine einbauen.<sup>[303]</sup> Wie oben beschrieben, wurden auch chemisch aminoacylierte Frameshift-Suppressoren eingesetzt, um mithilfe von Vierbasen- und Fünfbasen-Codons durch In-vitro-Translation nichtnatürliche Aminosäuren in Proteine einzubauen.

Ein orthogonales Vierbasen-Suppressor-tRNA/Synthetas-Paar aus archaebakteriellen tRNA<sup>Lys</sup>-Sequenzen wurde generiert, das in *E. coli* effizient und selektiv die nichtnatürliche Aminosäure Homoglutamin auf das Quadruplett-Codon AGGA hin in Proteine einbaut.<sup>[304]</sup> Die Frameshift-Suppression mit Homoglutamin hat keinen signifikanten Einfluss auf Proteinausbeuten und Zellwachstum und ist wechselseitig orthogonal zur Amber-Suppression, was den simultanen Einbau von zwei nichtnatürlichen Aminosäuren an zwei festgelegten Positionen im Protein ermöglicht. Zum Beispiel wurden in Gegenwart eines Myoglobins mit den Mutationen Gly24→AGGA und Ala75→TAG zwei orthogonale AGGA- und TAG-spezifische tRNAs exprimiert (Abbildung 31). Die entsprechenden orthogonalen O-Methyl-L-tyrosin- und Homoglutamin-spezifischen Synthetasen wurden in einem zweiten Plasmid kombiniert. Zellen, die mit beiden Plasmiden cotransformiert und in Gegenwart von beiden Aminosäuren angezüchtet wurden, produzierten 1.7 mg L<sup>-1</sup> der Myoglobin-Mutante. Die Gesamtsuppressioneffizienz betrug etwa 25 %. Kein Protein wurde dagegen produziert, wenn eine der beiden nichtnatürlichen Aminosäuren fehlte. Durch Elektrospray-Massenspektrometrie des Vollängenproteins wurde bestätigt, dass beide nichtnatürliche Aminosäuren eingebaut wurden.<sup>[304]</sup> Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass weder die Zahl der vorhandenen Triplet-Codons noch die Translationsmaschinerie selbst eine signifikante Barriere für eine weitere Expansion des Codes darstellen.

#### 5.5. Weitere orthogonale tRNA/Synthetase-Paare in *E. coli*

Kürzlich wurde eine „Konsensus-Suppressor-Strategie“ für das rationale Design von orthogonalen tRNA/Synthetase-



**Abbildung 31.** Simultaner Einbau der beiden nichtnatürlichen Aminosäuren Homoglutamin (hGln) und O-Methyl-L-tyrosin (OMeTyr) in Myoglobin durch Suppression eines Vierbasen-Codons und eines Amber-Nonsense-Codons.

Paaren in *E. coli* entworfen.<sup>[305]</sup> Bei der ersten Anwendung dieser Strategie wurde ausgehend von der Leucyl-Synthetase aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* eine orthologe Synthetase generiert. Die dazugehörige Suppressor-tRNA basierte auf der Konsensus-Sequenz von multiplen archaebakteriellen Leucyl-tRNAs. Bei diesen Konsensus-tRNAs war die Anticodon-Schleife durch die Sequenz CUX-XXAA ausgetauscht, wobei XXX die inverse komplementäre Sequenz zu bestimmten Nonsense-Codons ist. Um die Suppressionseffizienz zu steigern und um die Erkennung dieser tRNA durch endogene *E. coli*-Synthetasen weiter zu reduzieren, wurden in den Stamm der Konsensus-tRNA Mutationen eingefügt, und die resultierende tRNA-Mutanten-Bibliothek wurde den oben beschriebenen negativen und positiven Selektionsschritten unterzogen.<sup>[260]</sup> Die beiden signifikantesten Merkmale, die für eine effiziente Amber-orthologale Suppressor-tRNA in diesen Studien aufgefunden wurden, sind eine Anticodon-Schleife der Sequenz CU(X)XXXAA und das Fehlen von nichtkanonischen Basenpaaren oder Basenfehlpaarungen in der Stammregion.<sup>[260,305]</sup> Mit dieser Strategie wurde auch ein von den archaebakteriellen tRNA<sup>Glu</sup>-Sequenzen und der Glutamyl-tRNA-Synthetase aus *Pyrococcus horikoshii* abgeleitetes orthologes tRNA-Synthetase-Paar generiert (Abbildung 32).<sup>[306]</sup> Beide orthologen Paare weisen vergleichbare Suppressionseffizienzen zum Tyrosyl-Paar aus *M. jannaschii* auf. In der Literatur wurden noch weitere orthologe Paare beschrieben, die in *E. coli* verwendet werden können. Aus dem tRNA<sup>Asp</sup>/AspRS-Paar aus Hefe wurde ein orthologes Paar tRNA<sup>Asp</sup><sub>CUA</sub>/AspRS abgeleitet,<sup>[307]</sup> wobei eine AspRS-E188K-Mutante aus Hefe verwendet wurde, um die Erkennung für die Amber-Suppressor-tRNA<sup>Asp</sup><sub>CUA</sub> zu verbessern.<sup>[307,308]</sup> Schließlich bilden auch eine Initiator-tRNA<sup>fMet</sup>-Amber-Mutante aus *E. coli* und eine TyrRS-Mutante aus Hefe ein orthologes Paar in *E. coli*.<sup>[309]</sup>

## 5.6. Genetische Codierung von nichtnatürlichen Aminosäuren in Hefe

Das Verfahren zur genetischen Codierung von nichtnatürlichen Aminosäuren in Bakterien sollte auch auf höhere Organismen übertragbar sein. Hierzu ist es erforderlich, orthologe tRNA/Synthetase-Paare für jeden interessierenden Organismus zu generieren. Die meisten eukaryotischen orthologen tRNA/Synthetase-Paare wurden aus bakteriellen Paaren abgeleitet. Der Grund ist, dass die Sequenzidentität und die Identitätselemente der tRNAs von Prokaryoten und Eukaryoten divergenter sind als die von Eukaryoten und Archaea oder von Eukaryoten untereinander. In den eukaryotischen Zellen basiert die Transkription von tRNA-Genen auf der RNA-Polymerase III und ihren assoziierten Faktoren, die die A- und B-Box-Sequenzen im tRNA-Strukturen erkennen.<sup>[310]</sup> Einige bakterielle tRNAs, die von den eukaryotischen A- und B-Box-Sequenzen divergieren, werden nur ineffizient biosynthetisiert oder prozessiert, sodass ihre Sequenzen entsprechend modifiziert werden müssen.<sup>[244,311]</sup> Während sämtliche tRNA-Gene von *E. coli* die volle tRNA-Sequenz codieren, fügt bei manchen bakteriellen und archaebakteriellen sowie nahezu bei allen eukaryotischen tRNAs eine tRNA-Nucleotidyltransferase die CCA-Sequenz enzymatisch an das 3'-Ende an. Daher könnte es auch notwendig sein, im von *E. coli* importierten tRNA-Gen die 3'-CCA-Sequenz zu entfernen.<sup>[312]</sup> Um eine funktionelle tRNA zu erhalten, sind in manchen Fällen spezifische 5'- und 3'-flankierende Sequenzen, die Herausnahme von Introns, posttranskriptionelle Nucleotidmodifizierungen<sup>[313,314]</sup> sowie der Export in das Cytoplasma durch einen exportab-hängigen Prozess erforderlich.<sup>[313–315]</sup>

Es wurden bereits einige orthologe tRNA/Synthetase-Paare zur Verwendung in eukaryotischen Organismen generiert. Unter anderem wurde gezeigt, dass die Tyrosyl-Amber-Suppressor-tRNA<sup>Tyr</sup><sub>CUA</sub> aus *E. coli* nicht durch eukaryotische Synthetasen aminoacyliert wird und in Hefe in Gegenwart der TyrRS aus *E. coli* als ein Amber-Suppressor agiert.<sup>[316,317]</sup> Zudem aminoacyliert die TyrRS aus *E. coli* keine Hefe-

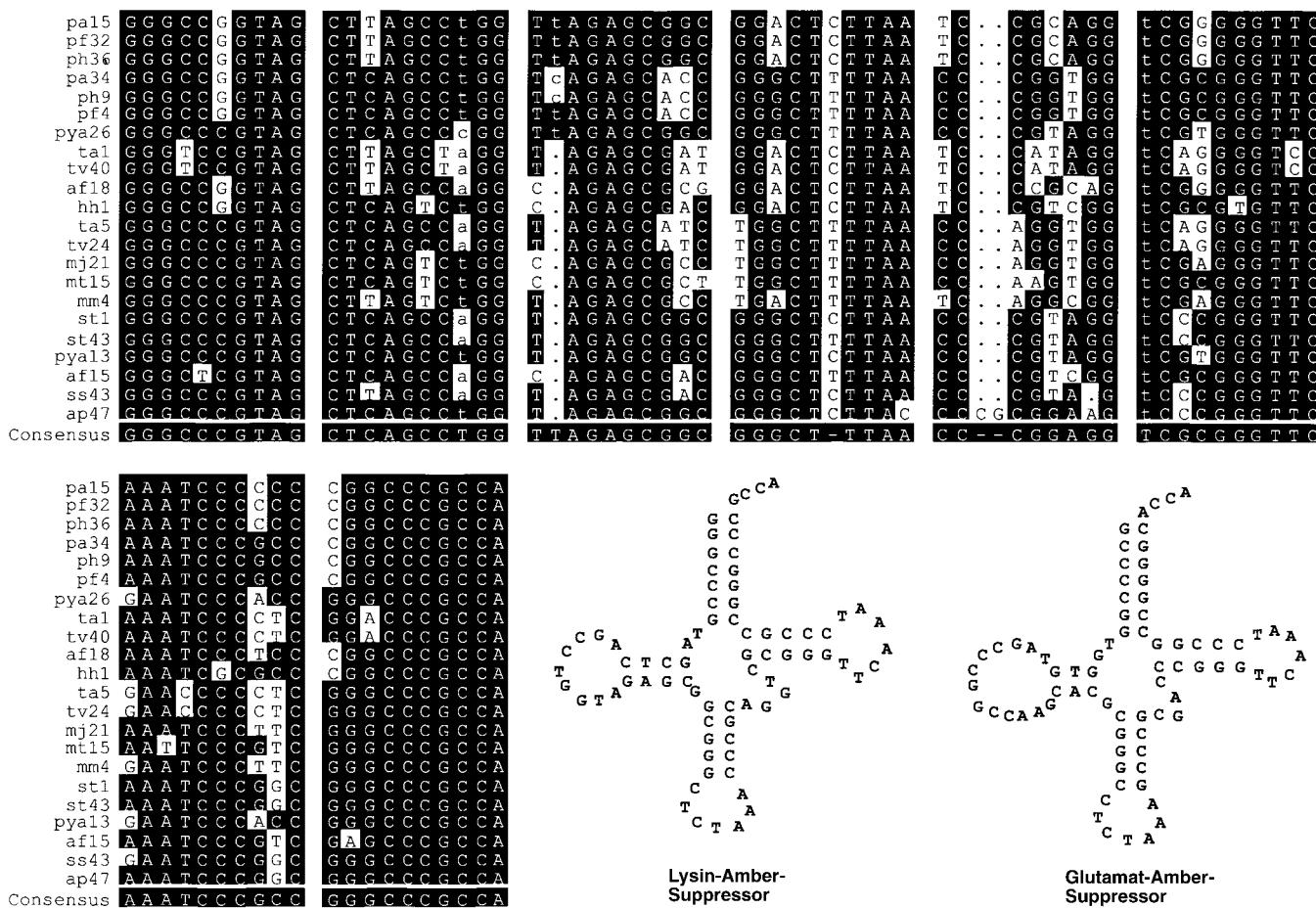


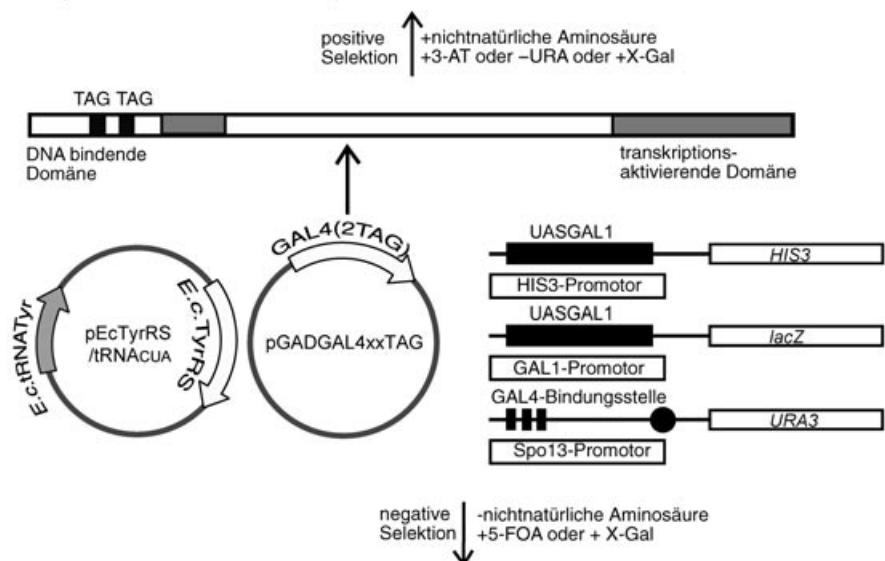
Abbildung 32. Archäobakterielle Lysyl- und Konsensus-tRNAs und davon abgeleitete Lysyl- und Glutamyl-Amber-Suppressoren.

tRNAs,<sup>[318]</sup> sodass das *E. coli*-Paar tRNA<sub>CUA</sub><sup>Tyr</sup>/TyrRS als ein orthogonales Paar in Hefe fungiert. Ein weiteres orthogonales Paar zur Verwendung in Hefe wird aus einem Amber-Suppressor, der sich von humaner Initiator-tRNA ableitet, und der GlnRS aus *E. coli* gebildet.<sup>[309]</sup> Das Paar tRNA<sub>CUA</sub><sup>Gln</sup>/GlnRS aus *E. coli* wurde auch in Säugerzellen für eine effiziente Amber-Suppression genutzt.<sup>[244]</sup>

In Versuchen, eine nichtnatürliche Aminosäure selektiv in Proteine in Eukaryoten einzuführen, durchsuchten Yokoyama und Mitarbeiter eine kleine Sammlung von eigens entworfenen Varianten des aktiven Zentrums der TyrRS aus *E. coli* mithilfe eines Weizenkeim-Translationssystems und entdeckten eine Synthetasemutante, die 3-Iodtyrosin effektiver prozessiert als Tyrosin.<sup>[319]</sup> Zusammen mit der tRNA<sub>CUA</sub><sup>Tyr</sup> aus *B. stearothermophilus* wurde diese Synthetasemutante zum Einbau von 3-Iodtyrosin in Säugerzellen verwendet.<sup>[311]</sup>

Um ein allgemeines Selektionsschema in Hefe zu entwickeln (analog zum *E. coli*-System zur Auffindung von Synthetaspezifität für nichtnatürliche Aminosäuren), erzeugten wir einen Selektionsstamm von *E. cerevisiae*

Zellen, die eine Aminosäure einbauen, sind auf X-Gal blau und überleben auf -URA oder 3-AT;  
Zellen, die keine Aminosäure einbauen, sind auf X-Gal weiß und sterben auf -URA oder +3-AT ab.



Zellen, die natürliche Aminosäuren einbauen, sterben auf 5-FOA ab und sind auf X-Gal blau;  
Zellen, die ausschließlich nichtnatürliche Aminosäuren prozessieren, überleben auf 5-FOA und sind auf X-Gal weiß.

Abbildung 33. Ein Selektionsschema für Synthetasemutanten, die für nichtnatürliche Aminosäuren in Hefe spezifisch sind.

*siae* [MaV203:pGADGAL4 (2 TAG)]. Dieser enthält das transkriptionelle Aktivatorprotein GAL4, dessen Codons an zwei permissiven Positionen zu Amber-Nonsense-Codons mutiert sind (Abbildung 33). Die Suppression dieser Amber-Codons produziert das Vollängenprotein GAL4, das wiederum die Transkription der auf genomisches GAL4 responsiven *HIS3*-, *URA3*- und *LACZ*-Reporter-Gene induziert. Die Expression von *HIS3* und *URA3* komplementiert die Auxotrophie für Histidin und Uracil dieses Stammes und bringt positiv selektierte Klone hervor, die aktive tRNA/Synthetase-Paare exprimieren. Hingegen verursacht ein Zusatz von 5-Fluororotsäure (5-FOA), die durch *URA3* in ein-toxisches Produkt umgewandelt wird, den Zelltod bei Zellen, die aktive tRNA/Synthetase-Paare exprimieren. In Abwesenheit einer nichtnatürlichen Aminosäure ist dies eine negative Selektion zur Entfernung von Synthetasen, die für endogene Aminosäuren spezifisch sind. Ähnlich wie GFP kann das *lacZ*-Reporter-Gen als zusätzlicher Marker dienen, um aktive Synthetasen kolorimetrisch von inaktiven zu unterscheiden.

Beim ersten Ansatz verwendeten wir das orthogonale Paar tRNA<sub>CUA</sub><sup>Tyr</sup>/TyrRS aus *E. coli*,<sup>[316,317]</sup> um nichtnatürliche Aminosäuren in Proteine in Hefe einzufügen. Eine Bibliothek von TyrRS-Mutanten von *E. coli* (Größe 10<sup>8</sup>) wurde durch Randomisierung von fünf Resten im aktiven Zentrum aufgebaut, wobei als Grundlage die Kristallstruktur der homologen TyrRS von *Bacillus stearothermophilus* herangezogen wurde (Abbildung 17).<sup>[262]</sup> Die oben beschriebene Selektionsmethode identifizierte Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, die eine Reihe nichtnatürlicher Aminosäuren einbauen, darunter *p*-Acetyl-L-phenylalanin, *p*-Azid-L-phenylalanin, *p*-Benzoyl-L-phenylalanin, *O*-Methyl-L-tyrosin, *p*-Iod-L-tyrosin und *O*-(2-Propinyl)-L-tyrosin.<sup>[280,320]</sup> Um die Genauigkeit und Effizienz des Einbaus zu charakterisieren, wurde in Gegenwart jedes tRNA/Synthetase-Paars und in An- oder Abwesenheit der kognaten nichtnatürlichen Aminosäure eine Amber-Mutante der humanen Superoxid-Dismutase überexprimiert. In Gegenwart der nichtnatürlichen Aminosäure konnte die Superoxid-Dismutase aufbereitet werden (die Ausbeuten betrugen ca. 0.05 mg L<sup>-1</sup>, entsprechend 20–40% bezogen auf das Wildtyp-Protein), ohne Aminosäure hingegen nicht.<sup>[320]</sup> Durch Massenspektrometrie wurde belegt, dass die aufbereitete Superoxid-Dismutase die gewünschte nichtnatürliche Aminosäure und keine andere Aminosäure an der spezifizierten Position enthält. Mit einem ähnlichen Ansatz wurde ein orthogonales Leucyl-tRNA/Synthetase-Paar von *E. coli* generiert. Dieses baut auf das Amber-Nonsense-Codon hin langketige photoaktivierbare und fluoreszierende Aminosäuren in Proteine in Hefe ein.<sup>[276]</sup>

## 5.7. Genetische Codierung von nichtnatürlichen Aminosäuren in Säugerzellen

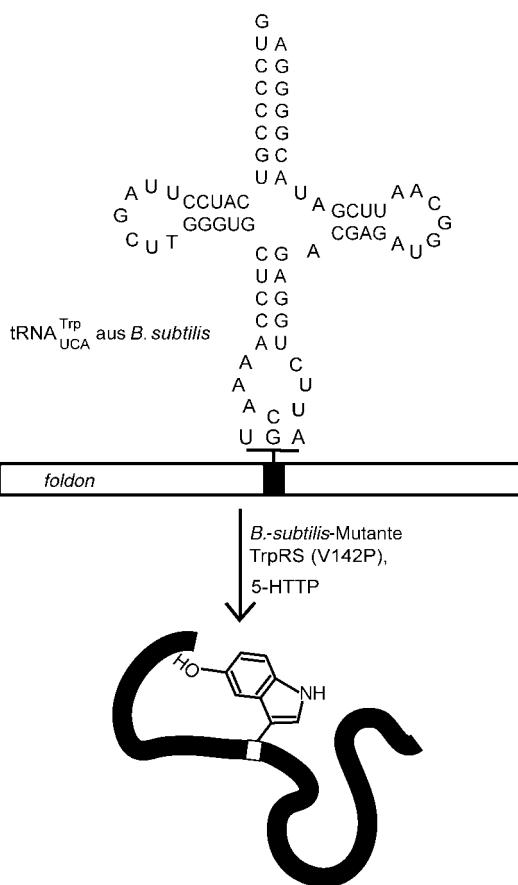
Der Einbau von nichtnatürlichen Aminosäuren in Proteine in Säugerzellen wurde bereits beschrieben,<sup>[321,322]</sup> allerdings basierten die Methoden meist auf der Transfektion von *in vitro* acylierten Amber-Suppressor-tRNAs. Bei diesem Ansatz sind die Mengen an produziertem Protein stark

limitiert, da die Suppressor-tRNA exogen eingeführt werden muss und nicht *in vivo* mit einer geeigneten Aminoacyl-tRNA-Synthetase wiedergewonnen werden kann. Ziel wäre es, tRNA/Synthetase-Paare zu identifizieren, die in Säugerzellen orthogonal sind, und die Substratspezifität der Synthetase so einzustellen, dass sie selektiv *in vivo* die gewünschte nichtnatürliche Aminosäure beladen kann.

Da das Paar tRNA<sub>CUA</sub><sup>Tyr</sup>/TyrRS aus *E. coli* außer in Hefe auch in Säugerzellen orthogonal ist und sich die Translationsmaschinerien von Hefe und höheren Eukaryoten ähneln, sollte es möglich sein, die Spezifität dieser Synthetase in Hefe einzustellen (Hefe eignet sich sehr gut für genetische Selektionen mit großen Bibliotheken) und dann die optimierten tRNA/Synthetase-Paare direkt auf Säugerzellen zu übertragen. Leider exprimiert die tRNA<sub>CUA</sub><sup>Tyr</sup> aus *E. coli* schlecht in Säugerzellen, wahrscheinlich weil intakte A- und B-Boxen fehlen.<sup>[311]</sup> Trotzdem konnten Yokoyama et al. nachweisen, dass die tRNA<sub>CUA</sub><sup>Tyr</sup> aus *B. stearothermophilus* zusammen mit der TyrRS aus *E. coli* das TAG-Codon *in vivo* mit Tyrosin supprimiert. Diese tRNA wird zudem durch keine endogene Synthetase in Säugerzellen aminoacyliert.<sup>[311]</sup> Tatsächlich führte eine Coexpression mit einer TyrRS-Mutante aus *E. coli* zum TAG-codierten Einbau von 3-Iod-L-Tyrosin in Proteine in CHO-Zellen (CHO = chinese hamster ovary) und in HEK-293-Zellen (HEK = human embryonic kidney) mit ungefähr 95% Genauigkeit.<sup>[311]</sup> Wir konnten nachweisen, dass einige der TyrRS-Mutanten aus *E. coli*, die in Hefe entwickelt wurden, in Verbindung mit einer tRNA<sub>CUA</sub><sup>Tyr</sup> aus *B. stearothermophilus* nichtnatürliche Aminosäuren in Proteine in Säugerzellen einbauen.<sup>[323]</sup> Allerdings sind die Suppressionseffizienzen gering, sodass die Herstellung von verwendbaren Proteinmengen verbesserte Synthetasen oder Suppressoren oder aber einen höheren Expressionsgrad erfordert.

Für die Verwendung in Säugerzellen wurde auch das orthogonale Paar tRNA<sub>UCA</sub><sup>Trp</sup> (*Bst*tRNA<sub>UCA</sub><sup>Trp</sup>) aus *B. subtilis*/Tryptophanyl-tRNA-Synthetase entwickelt. Wang und Mitarbeiter hatten zuvor gezeigt, dass die tRNA<sub>UCA</sub><sup>Trp</sup> aus *B. subtilis* (*Bst*tRNA<sub>UCA</sub><sup>Trp</sup>) kein Substrat für die TrpRS aus Hefe und Säugerzellen ist.<sup>[324]</sup> Um zu prüfen, ob die *Bst*tRNA<sub>UCA</sub><sup>Trp</sup> ebenfalls orthogonal ist und als Opal-Suppressor fungiert, wurde das Codon für Trp68 im modifizierten *foldon*-Gen eines T4-Bakteriophagenfibritins mithilfe eines CMV-Primotors<sup>[325]</sup> zu TGA mutiert. Suppressionsexperimente in humanen 293T-Zellen und *In-vitro*-Aminoacylierungssassays zeigten, dass die TrpRS aus *B. subtilis* (*Bs*TrpRS) nur die *Bst*tRNA<sub>UCA</sub><sup>Trp</sup> und keine andere endogene Säuger-tRNA aminoacyliert. Umgekehrt wurde die exprimierte *Bst*tRNA<sub>UCA</sub><sup>Trp</sup> nur durch ihre kognate *Bs*TrpRS und durch keine andere endogene Säugersynthetase beladen.<sup>[326]</sup>

Anhand der Kristallstruktur der homologen TrpRS aus *B. stearothermophilus* wurde nun eine Synthetasemutante (V144PBsTrpRS) entworfen, die selektiv 5-substituierte Trp-Analoga belädt. In der TrpRS zeigt Val144 direkt auf das C5 von Tryptophan, was zu sterisch ungünstigen Wechselwirkungen mit Tryptophan-Analoga führt, die an der C5-Position einen Substituenten tragen. Die Überlegung war, durch Mutation von Val144 zu einer kleineren Aminosäure eine für 5-substituierte Tryptophan-Analoga passende Umgebung zu erzeugen. Eine solche Mutante wurde generiert



**Abbildung 34.** Einbau von 5-HTPP in das Foldon-Protein in Säugerzellen durch Suppression des Opal-Nonsense-Codons.

und auf ihre Fähigkeit untersucht, das Opal-Nonsense-Codon im *foldon*-Gen in Gegenwart von 5-Hydroxytryptophan (5-HTPP) zu supprimieren. Tatsächlich wurde das Volllängenprotein nur dann exprimiert, wenn 5-HTPP vorhanden war (Abbildung 34).<sup>[326]</sup> Unter sonst gleichen Bedingungen wurde ohne 5-HTPP kein Volllängenprotein exprimiert, was anzeigt, dass diese Synthetasemutante keine endogene Aminosäure als Substrat verwendet. Mithilfe von Elektrospray-Massenpektrometrie an der Foldonproteinmutante wurde verifiziert, dass der ortsspezifische Einbau von 5-HTPP an der Position 68 mit einer Genauigkeit von >97% stattfand. Die Ausbeute an 5-HTPP-Proteinmutante betrug etwa 100 µg pro Liter Kultur (zum Vergleich: 1 mg Wildtyp-Protein pro Liter). Um *Bs*TrpRS so weiterzuentwickeln, dass komplexere Tryptophan-Analoga beladen werden, kann das Paar *Bs*tRNA<sup>Trp</sup><sub>UCA</sub>/*Bs*TrpRS zurück in das Hefesystem transferiert werden. Das oben beschriebene Selektionsschema kann dann verwendet werden, um aus einer großen Bibliothek von Mutanten des aktiven Zentrums die gewünschten Synthetasemutanten zu identifizieren.

## 6. Ausblick

Mit dem oben beschriebenen Verfahren kann eine große Zahl von neuartigen Aminosäuren bemerkenswert effektiv in

die genetischen Codes von prokaryotischen und eukaryotischen Organismen eingeführt werden. Übereinstimmend damit hat einem jüngsten Bericht zufolge die Natur eine ähnliche Strategie entwickelt (ein orthogonales Amber-Suppressor-tRNA/Synthetase-Paar), um die nichtnatürliche Aminosäure Pyrrolysin in *Methanosarcina barkeri* genetisch zu codieren.<sup>[5]</sup> Die weiteren Forschungen auf diesem Gebiet werden sich wohl darauf konzentrieren, andere Aminosäuren aufzufinden, die sowohl in prokaryotischen als auch eukaryotischen Organismen (einschließlich Mehrzellern) genetisch codiert werden können. Zusätzliche orthogonale Paare zur Suppression von Drei- und Vierbasen-Codons sind zurzeit ebenfalls in Entwicklung. Es könnte sogar möglich sein, seltene redundante Codons aus dem *E. coli*-Genom zu deaktivieren und stattdessen zur Codierung von nichtnatürlichen Aminosäuren zu verwenden. Durch die Fähigkeit, nichtnatürliche Aminosäuren genetisch zu codieren, stehen leistungsfähige Sonden für Untersuchungen von Proteinstrukturen und -funktionen in vitro und in vivo zur Verfügung. Auch das rationale Design von Proteinen mit neuartigen Eigenschaften könnte möglich werden. Naheliegende Beispiele wären homogen glycosyierte oder PEG-derivatisierte therapeutische Proteine mit verbesserten pharmakologischen Eigenschaften, Fluoreszenzproteine als Sensoren für niedermolekulare Verbindungen oder für Wechselwirkungen zwischen Proteinen in der Zelle sowie in vivo photoregulierbare Proteine. Denkbar wäre außerdem, Nichtaminosäurebausteine in Proteine einzufügen oder sogar Biopolymere mit gänzlich nichtnatürlichem Rückgrat zu erschaffen. Zuletzt erlaubt uns die Fähigkeit, den genetischen Codes von Organismen neuartige Aminosäuren hinzuzufügen, experimentell nachzuprüfen, ob Organismen mit mehr als zwanzig Aminosäurebausteinen einen evolutionären Vorteil haben.

Eingegangen am 11. Mai 2004  
Übersetzt von Dr. Roswitha Harrer, Frankfurt

- [1] J. T. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 1909.
- [2] M. Di Giulio, M. Medugno, *J. Mol. Evol.* **1999**, *49*, 1.
- [3] T. A. Ronneberg, L. F. Landweber, S. J. Freeland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13690.
- [4] A. Bock, K. Forchhammer, J. Heider, W. Leinfelder, G. Sawers, B. Veprek, F. Zinoni, *Mol. Microbiol.* **1991**, *5*, 515.
- [5] G. Srinivasan, C. M. James, J. A. Krzycki, *Science* **2002**, *296*, 1459.
- [6] A. R. Fersht, J. P. Shi, A. J. Wilkinson, D. M. Blow, P. Carter, M. M. Y. Waye, G. P. Winter, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 455; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 467.
- [7] M. Smith, *Annu. Rev. Genet.* **1985**, *19*, 423.
- [8] J. Pons, A. Rajpal, J. F. Kirsch, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 958.
- [9] K. E. Neet, D. E. Koshland, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1966**, *56*, 1606.
- [10] L. Polgar, M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3153.
- [11] Z. P. Wu, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4513.
- [12] Z. P. Wu, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5647.
- [13] J. Q. Liu, M. S. Jiang, G. M. Luo, G. L. Yan, J. C. Shen, *Biotechnol. Lett.* **1998**, *20*, 693.
- [14] H. L. Levine, Y. Nakagawa, E. T. Kaiser, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *76*, 64.
- [15] H. L. Levine, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 7670.

- [16] E. T. Kaiser, D. S. Lawrence, *Science* **1984**, 226, 505.
- [17] D. R. Corey, P. G. Schultz, *Science* **1987**, 238, 1401.
- [18] Y. Chen, Y. W. Ebright, R. H. Ebright, *Science* **1994**, 265, 90.
- [19] T. M. Rana, C. F. Meares, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 2457.
- [20] T. M. Rana, C. F. Meares, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 1859.
- [21] J. B. Ghaim, D. P. Greiner, C. F. Meares, R. B. Gennis, *Biochemistry* **1995**, 34, 11311.
- [22] J. T. Owens, A. Chmura, K. Murakami, N. Fujita, A. Ishihama, C. F. Meares, *Biochemistry* **1998**, 37, 7670.
- [23] G. M. Culver, H. F. Noller, *Methods Enzymol.* **2000**, 318, 461.
- [24] J. A. Silverman, P. B. Harbury, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 30968.
- [25] G. R. Jacobson, M. H. Schaffer, G. R. Stark, T. C. Vanaman, *J. Biol. Chem.* **1973**, 248, 6583.
- [26] M. H. Akabas, D. A. Stauffer, M. Xu, A. Karlin, *Science* **1992**, 258, 307.
- [27] A. Karlin, *J. Gen. Physiol.* **2001**, 117, 235.
- [28] A. P. Todd, J. Cong, F. Levinthal, C. Levinthal, W. L. Hubbell, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1989**, 6, 294.
- [29] W. L. Hubbell, C. Altenbach, C. M. Hubbell, H. G. Khorana, *Adv. Protein Chem.* **2003**, 63, 243.
- [30] L. M. Mannuzzu, M. M. Moronne, E. Y. Isacoff, *Science* **1996**, 271, 213.
- [31] B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, 281, 269.
- [32] S. R. Adams, R. E. Campbell, L. A. Gross, B. R. Martin, G. K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6063.
- [33] G. Simmons, P. R. Clapham, L. Picard, R. E. Offord, M. M. Rosenklide, T. W. Schwartz, R. Buser, T. N. C. Wells, A. E. I. Proudfoot, *Science* **1997**, 276, 276.
- [34] K. F. Geoghegan, J. G. Stroh, *Bioconjugate Chem.* **1992**, 3, 138.
- [35] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149.
- [36] S. B. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, 57, 957.
- [37] R. S. Roy, B. Imperiali, *Protein Eng.* **1997**, 10, 691.
- [38] I. Hamachi, R. Eboshi, J.-I. Watanabe, S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 4530.
- [39] J. J. Nestor, Jr., T. L. Ho, R. A. Simpson, B. L. Horner, G. H. Jones, G. I. McRae, B. H. Vickery, *J. Med. Chem.* **1982**, 25, 795.
- [40] J. J. Nestor, Jr., R. Tahilramani, T. L. Ho, G. I. McRae, B. H. Vickery, *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 65.
- [41] K. L. Liu, B. L. He, S. B. Xiao, Q. M. Xia, X. Fang, Z. Y. Wang, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 35, 157.
- [42] B. Bilgicer, A. Fichera, K. Kumar, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4393.
- [43] C. E. Schafmeister, J. Po, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5891.
- [44] V. Cerovsky, E. Welker, H. A. Scheraga, *J. Pept. Res.* **2003**, 61, 140.
- [45] E. T. Kaiser, *Acc. Chem. Res.* **1989**, 22, 47.
- [46] D. Y. Jackson, J. Burnier, C. Quan, M. Stanley, J. Tom, J. A. Wells, *Science* **1994**, 266, 243.
- [47] M. Schnolzer, S. B. Kent, *Science* **1992**, 256, 221.
- [48] K. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 30.
- [49] C.-F. Liu, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 4149.
- [50] C.-F. Liu, J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 6584.
- [51] D. R. Englebretsen, B. G. Garnham, D. A. Bergman, P. F. Alewood, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 8871.
- [52] M. Baca, T. W. Muir, M. Schnolzer, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 1881.
- [53] D. S. Kemp, R. I. Carey, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 2216.
- [54] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clarklewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, 266, 776.
- [55] P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 923.
- [56] L. E. Canne, S. J. Bark, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 5891.
- [57] M. Baca, S. B. Kent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 11638.
- [58] D. W. Low, M. G. Hill, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 11536.
- [59] G. G. Kochendoerfer, S. Y. Chen, F. Mao, S. Cressman, S. Traviglia, H. Shao, C. L. Hunter, D. W. Low, E. N. Cagle, M. Carnevali, V. Gueriguan, P. J. Keogh, H. Porter, S. M. Stratton, M. C. Wiedeke, J. Wilken, J. Tang, J. J. Levy, L. P. Miranda, M. M. Crnogorac, S. Kalbag, P. Botti, J. Schindler-Horvat, L. Savatski, J. W. Adamson, A. Kung, S. B. Kent, J. A. Bradburne, *Science* **2003**, 299, 884.
- [60] A. A. Deniz, T. A. Laurence, G. S. Beligere, M. Dahan, A. B. Martin, D. S. Chemla, P. E. Dawson, P. G. Schultz, S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 5179.
- [61] L. Zhang, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2363.
- [62] J. A. Camarero, J. Pavel, T. W. Muir, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 361; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 347.
- [63] H. Ishida, Z. Qi, M. Sokabe, K. Donowaki, Y. Inoue, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2978.
- [64] T. N. Schumacher, L. M. Mayr, D. L. Minor, Jr., M. A. Milholen, M. W. Burgess, P. S. Kim, *Science* **1996**, 271, 1854.
- [65] D. M. Eckert, V. N. Malashkevich, L. H. Hong, P. A. Carr, P. S. Kim, *Cell* **1999**, 99, 103.
- [66] R. E. Offord, *Protein Eng.* **1987**, 1, 151.
- [67] C. J. Wallace, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, 6, 403.
- [68] D. F. Dykes, T. Creighton, R. C. Sheppard, *Nature* **1974**, 247, 202.
- [69] C. J. Wallace, I. Clark-Lewis, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 3852.
- [70] C. J. Wallace, *FASEB J.* **1993**, 7, 505.
- [71] D. S. Wuttke, H. B. Gray, S. L. Fisher, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 8455.
- [72] C. H. Wong, K. T. Wang, *Experientia* **1991**, 47, 1123.
- [73] G. A. Homandberg, M. Laskowski, Jr., *Biochemistry* **1979**, 18, 586.
- [74] K. Inouye, K. Watanabe, K. Morihara, Y. Tochino, T. Kanaya, J. Emura, S. Sakakibara, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 751.
- [75] H. D. Jakubke, P. Kuhl, A. Koennecke, *Angew. Chem.* **1985**, 97, 79; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, 24, 85.
- [76] V. Schellenberger, H. D. Jakubke, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1440; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1437.
- [77] J. Bongers, T. Lambros, W. Liu, M. Ahmad, R. M. Campbell, A. M. Felix, E. P. Heimer, *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 3934.
- [78] J. Bongers, W. Liu, T. Lambros, K. Breddam, R. M. Campbell, A. M. Felix, E. P. Heimer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, 44, 123.
- [79] T. Nakatsuka, T. Sasaki, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 3808.
- [80] L. Abrahmsen, J. Tom, J. Burnier, K. A. Butcher, A. Kossiakoff, J. A. Wells, *Biochemistry* **1991**, 30, 4151.
- [81] T. K. Chang, D. Y. Jackson, J. P. Burnier, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 12544.
- [82] H. F. Gaertner, R. E. Offord, R. Cotton, D. Timms, R. Camble, K. Rose, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 7224.
- [83] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 6705.
- [84] K. Severinov, T. W. Muir, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 16205.
- [85] T. C. Evans, Jr., J. Benner, M. Q. Xu, *Protein Sci.* **1998**, 7, 2256.
- [86] T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, 72, 249.
- [87] F. B. Perler, M. Q. Xu, H. Paulus, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, 1, 292.
- [88] T. J. Tolbert, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2275; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2171.
- [89] C. J. Noren, J. Wang, F. B. Perler, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 458; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 450.
- [90] J. P. Tam, Q. Yu, *Biopolymers* **1998**, 46, 319.
- [91] R. S. Roy, O. Allen, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 789.
- [92] R. J. Hondal, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 5140.
- [93] M. D. Gieselman, L. Xie, W. A. van der Donk, *Org. Lett.* **2001**, 3, 1331.
- [94] R. Quaderer, A. Sewing, D. Hilvert, *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 1197.

- [95] J. R. Sydor, M. Mariano, S. Sideris, S. Nock, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 707.
- [96] A. Iakovenko, E. Rostkova, E. Merzlyak, A. M. Hillebrand, N. H. Thoma, R. S. Goody, K. Alexandrov, *FEBS Lett.* **2000**, *468*, 155.
- [97] G. J. Cotton, B. Ayers, R. Xu, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1100.
- [98] B. Ayers, U. K. Blaschke, J. A. Camarero, G. J. Cotton, M. Holford, T. W. Muir, *Biopolymers* **2000**, *51*, 343.
- [99] G. J. Cotton, T. W. Muir, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 253.
- [100] R. M. Hofmann, G. J. Cotton, E. J. Chang, E. Vidal, D. Veach, W. Bornmann, T. W. Muir, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 3091.
- [101] J. Mukhopadhyay, A. N. Kapanidis, V. Mekler, E. Kortkhonja, Y. W. Ebright, R. H. Ebright, *Cell* **2001**, *106*, 453.
- [102] V. Mekler, E. Kortkhonja, J. Mukhopadhyay, J. Knight, A. Revyakin, A. N. Kapanidis, W. Niu, Y. W. Ebright, R. Levy, R. H. Ebright, *Cell* **2002**, *108*, 599.
- [103] M. A. Dwyer, W. Lu, J. J. Dwyer, A. A. Kossiakoff, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 263.
- [104] D. Macmillan, C. R. Bertozzi, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9515.
- [105] T. J. Tolbert, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5421.
- [106] K. Alexandrov, I. Heinemann, T. Durek, V. Sidorovitch, R. S. Goody, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5648.
- [107] M. Huse, M. N. Holford, J. Kuriyan, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8337.
- [108] M. Huse, T. W. Muir, L. Xu, Y.-G. Chen, J. Kuriyan, J. Massague, *Mol. Cell* **2001**, *8*, 671.
- [109] W. Lu, D. Gong, D. Bar-Sagi, P. A. Cole, *Mol. Cell* **2001**, *8*, 759.
- [110] U. Arnold, M. P. Hinderaker, B. L. Nilsson, B. R. Huck, S. H. Gellman, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8522.
- [111] F. H. C. Crick, *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1958**, *12*, 138.
- [112] F. Chapeville, F. Lipmann, G. von Ehrenstein, B. Weisblum, W. J. Ray, Jr., S. Benzer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1962**, *48*, 1086.
- [113] A. E. Johnson, W. R. Woodward, E. Herbert, J. R. Menninger, *Biochemistry* **1976**, *15*, 569.
- [114] P. Schimmel, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 125.
- [115] M. Ibba, D. Soll, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 617.
- [116] T. G. Heckler, L. H. Chang, Y. Zama, T. Naka, M. S. Chorghade, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1984**, *23*, 1468.
- [117] T. G. Heckler, Y. Zama, T. Naka, S. M. Hecht, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 4492.
- [118] J. R. Roesser, M. S. Chorghade, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1986**, *25*, 6361.
- [119] T. G. Heckler, J. R. Roesser, C. Xu, P. I. Chang, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1988**, *27*, 7254.
- [120] G. Baldini, B. Martoglio, A. Schachenmann, C. Zuglian, J. Brunner, *Biochemistry* **1988**, *27*, 7951.
- [121] C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Science* **1989**, *244*, 182.
- [122] F. H. C. Crick, L. Barret, S. Brenner, R. Watts-Tobin, *Nature* **1961**, *192*, 1227.
- [123] S. Brenner, A. O. Stretton, S. Kaplan, *Nature* **1965**, *206*, 994.
- [124] J. H. Miller, D. Ganem, P. Lu, A. Schmitz, *J. Mol. Biol.* **1977**, *109*, 275.
- [125] L. Bossi, J. R. Roth, *Nature* **1980**, *286*, 123.
- [126] J. A. Ellman, D. Mendel, P. G. Schultz, *Science* **1992**, *255*, 197.
- [127] Y. Kwok, J. T. Wong, *Can. J. Biochem.* **1980**, *58*, 213.
- [128] A. G. Bruce, J. F. Atkins, N. Wills, O. Uhlenbeck, R. F. Gesteland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 7127.
- [129] A. Miller, A. Albertini, *J. Mol. Biol.* **1983**, *164*, 59.
- [130] D. Ayer, M. Yarus, *Science* **1986**, *231*, 393.
- [131] J. F. Milligan, D. R. Groebe, G. W. Witherell, O. C. Uhlenbeck, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 8783.
- [132] C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, D. J. Suich, K. A. Noren, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 83.
- [133] S. A. Robertson, J. A. Ellman, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2722.
- [134] S. R. Adams, J. P. Y. Kao, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7957.
- [135] A. Patchornik, B. Amit, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6333.
- [136] J. A. Ellman, D. Mendel, S. Anthony-Cahill, C. J. Noren, P. G. Schultz, *Methods Enzymol.* **1992**, *202*, 301.
- [137] J. D. Bain, C. G. Glabe, T. A. Dix, A. R. Chamberlin, E. S. Diala, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8013.
- [138] V. W. Cornish, D. Mendel, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 677; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 621.
- [139] J. S. Thorson, E. Chapman, E. C. Murphy, P. G. Schultz, J. K. Judge, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1157.
- [140] J. T. Koh, V. W. Cornish, P. G. Schultz, *Biochemistry* **1997**, *36*, 11314.
- [141] K. B. Wiberg, K. E. Laidig, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5935.
- [142] M. J. Kamlet, J. L. M. Abboud, M. H. Abraham, R. W. Taft, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2877.
- [143] E. Chapman, J. S. Thorson, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7151.
- [144] S. T. Cload, D. R. Liu, W. A. Froiland, P. G. Schultz, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 1033.
- [145] G. F. Short, S. Y. Golovine, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1999**, *38*, 8808.
- [146] D. M. Kim, T. Kigawa, C. Y. Choi, S. Yokoyama, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *239*, 881.
- [147] T. Hohsaka, K. Sato, M. Sisido, K. Takai, S. Yokoyama, *FEBS Lett.* **1994**, *344*, 171.
- [148] C. H. Ma, W. Kudlicki, O. W. Odom, G. Kramer, B. Hardesty, *Biochemistry* **1993**, *32*, 7939.
- [149] A. K. Kowal, J. S. Oliver, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4685.
- [150] A. C. Forster, Z. Tan, M. N. Nalam, H. Lin, H. Qu, V. W. Cornish, S. C. Blacklow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6353.
- [151] T. Hohsaka, Y. Ashizuka, H. Murakami, M. Sisido, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9778.
- [152] H. Murakami, T. Hohsaka, Y. Ashizuka, M. Sisido, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7520.
- [153] T. Hohsaka, D. Kajihara, Y. Ashizuka, H. Murakami, M. Sisido, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 34.
- [154] M. Taki, T. Hohsaka, H. Murakami, K. Taira, M. Sisido, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14586.
- [155] M. Taki, T. Hohsaka, H. Murakami, K. Taira, M. Sisido, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14586.
- [156] T. Hohsaka, M. Sisido, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 809.
- [157] T. Hohsaka, Y. Ashizuka, H. Sasaki, H. Murakami, M. Sisido, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 12194.
- [158] T. Hohsaka, Y. Ashizuka, H. Taira, H. Murakami, M. Sisido, *Biochemistry* **2001**, *40*, 11060.
- [159] T. Hohsaka, Y. Ashizuka, H. Murakami, M. Sisido, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 3646.
- [160] J. D. Bain, C. Switzer, A. R. Chamberlin, S. A. Benner, *Nature* **1992**, *356*, 537.
- [161] M. W. Nowak, P. C. Kearney, J. R. Sampson, M. E. Saks, C. G. Labarca, S. K. Silverman, W. G. Zhong, J. Thorson, J. N. Abelson, N. Davidson, P. G. Schultz, D. A. Dougherty, H. A. Lester, *Science* **1995**, *268*, 439.
- [162] M. E. Saks, J. R. Sampson, M. W. Nowak, P. C. Kearney, F. Y. Du, J. N. Abelson, H. A. Lester, D. A. Dougherty, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23169.
- [163] D. A. Dougherty, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 645.
- [164] D. L. Beene, D. A. Dougherty, H. A. Lester, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2003**, *13*, 264.
- [165] W. G. Zhong, J. P. Gallivan, Y. N. Zhang, L. T. Li, H. A. Lester, D. A. Dougherty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12088.

- [166] D. L. Beene, G. S. Brandt, W. Zhong, N. M. Zacharias, H. A. Lester, D. A. Dougherty, *Biochemistry* **2002**, *41*, 10262.
- [167] C. A. Hutchison III, S. Phillips, M. H. Edgell, S. Gillam, P. Jahnke, M. Smith, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 6551.
- [168] G. Dalbadie-McFarland, L. W. Cohen, A. D. Riggs, C. Morin, K. Itakura, J. H. Richards, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 6409.
- [169] I. S. Sigal, B. G. Harwood, R. Arentzen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 7157.
- [170] G. Winter, A. R. Fersht, A. J. Wilkinson, M. Zoller, M. Smith, *Nature* **1982**, *299*, 756.
- [171] J. E. Villafranca, E. E. Howell, D. H. Voet, M. S. Strobel, R. C. Ogden, J. N. Abelson, J. Kraut, *Science* **1983**, *222*, 782.
- [172] C. S. Craik, S. Rocznak, C. Largman, W. J. Rutter, *Science* **1987**, *237*, 909.
- [173] J. A. Wells, D. A. Estell, *Trends Biochem. Sci.* **1988**, *13*, 291.
- [174] A. R. Fersht, *Biochemistry* **1987**, *26*, 8031.
- [175] P. T. Jones, P. H. Dear, J. Foote, M. S. Neuberger, G. Winter, *Nature* **1986**, *321*, 522.
- [176] J. Nardelli, T. J. Gibson, C. Vesque, P. Charnay, *Nature* **1991**, *349*, 175.
- [177] J. R. Desjarlais, J. M. Berg, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1992**, *12*, 101.
- [178] J. Nardelli, T. Gibson, P. Charnay, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 4137.
- [179] Y. Choo, A. Klug, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 11163.
- [180] M. Isalan, Y. Choo, A. Klug, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 5617.
- [181] M. Isalan, A. Klug, Y. Choo, *Biochemistry* **1998**, *37*, 12026.
- [182] Y. Choo, M. Isalan, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 411.
- [183] S. A. Wolfe, L. Nekludova, C. O. Pabo, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 183.
- [184] J. A. Wells, M. Vasser, D. B. Powers, *Gene* **1985**, *34*, 315.
- [185] B. C. Cunningham, P. Jhurani, P. Ng, J. A. Wells, *Science* **1989**, *243*, 1330.
- [186] B. C. Cunningham, J. A. Wells, *Science* **1989**, *244*, 1081.
- [187] D. W. Leung, E. Chen, D. V. Goeddel, *Technique* **1989**, *1*, 11.
- [188] R. C. Cadwell, G. F. Joyce, *PCR Methods Appl.* **1992**, *2*, 28.
- [189] A. Greener, M. Callahan, B. Jerpseth, *Methods Mol. Biol.* **1996**, *57*, 375.
- [190] W. P. C. Stemmer, *Nature* **1994**, *370*, 389.
- [191] H. K. Mitchell, C. Niemann, *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *69*, 1232.
- [192] M. V. Simpson, E. Farber, H. Tarver, *J. Biol. Chem.* **1950**, *182*, 81.
- [193] M. H. Richmond, *Bacteriol. Rev.* **1962**, *26*, 398.
- [194] M. Levine, H. Tarver, *J. Biol. Chem.* **1951**, *192*, 835.
- [195] D. Gross, H. Tarver, *J. Biol. Chem.* **1955**, *217*, 169.
- [196] R. Munier, G. N. Cohen, *Biochim. Biophys. Acta* **1956**, *21*, 592.
- [197] G. N. Cohen, D. B. Cowie, *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.* **1957**, *244*, 680.
- [198] D. B. Cowie, G. N. Cohen, *Biochim. Biophys. Acta* **1957**, *26*, 252.
- [199] G. Hortin, I. Boime, *Methods Enzymol.* **1983**, *96*, 777.
- [200] G. Brawerman, M. Ycas, *Arch. Biochem. Biophys.* **1957**, *68*, 112.
- [201] M. H. Richmond, *Biochem. J.* **1959**, *73*, 261.
- [202] D. B. Cowie, G. N. Cohen, E. T. Bolton, H. de Robichon-Szulmajster, *Biochim. Biophys. Acta* **1959**, *34*, 39.
- [203] O. M. Rennert, H. S. Anker, *Biochemistry* **1961**, *13*, 471.
- [204] N. Budisa, C. Minks, F. J. Medrano, J. Lutz, R. Huber, L. Moroder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 455.
- [205] M. Ibba, P. Kast, H. Hennecke, *Biochemistry* **1994**, *33*, 7107.
- [206] M. Ibba, H. Hennecke, *FEBS Lett.* **1995**, *364*, 272.
- [207] N. Sharma, R. Furter, P. Kast, D. A. Tirrell, *FEBS Lett.* **2000**, *467*, 37.
- [208] K. Kirshenbaum, S. I. Carrico, A. D. Tirrell, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 235.
- [209] F. Hamano-Takaku, T. Iwama, S. Saito-Yano, K. Takaku, Y. Monden, M. Kitabatake, D. Soll, S. Nishimura, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 40324.
- [210] V. Doring, H. D. Mootz, L. A. Nangle, T. L. Hendrickson, V. de Crecy-Lagard, P. Schimmel, P. Marliere, *Science* **2001**, *292*, 501.
- [211] Y. Tang, D. A. Tirrell, *Biochemistry* **2002**, *41*, 10635.
- [212] W. Yang, W. A. Hendrickson, E. T. Kalman, R. J. Crouch, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 13553.
- [213] W. Yang, W. A. Hendrickson, R. J. Crouch, Y. Satow, *Science* **1990**, *249*, 1398.
- [214] J. O. Boles, K. Lewinski, M. Kunkle, J. D. Odom, B. Dunlap, L. Lebioda, M. Hatada, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 283.
- [215] N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskorn, J. Keller-mann, R. Huber, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 788.
- [216] N. Budisa, W. Karnbrock, S. Steinbacher, A. Humm, L. Prade, T. Neufeld, L. Moroder, R. Huber, *J. Mol. Biol.* **1997**, *270*, 616.
- [217] J. H. Bae, S. Alefelder, J. T. Kaiser, R. Friedrich, L. Moroder, R. Huber, N. Budisa, *J. Mol. Biol.* **2001**, *309*, 925.
- [218] N. Budisa, R. Huber, R. Golbik, C. Minks, E. Weyher, L. Moroder, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *253*, 1.
- [219] C. Minks, R. Huber, L. Moroder, N. Budisa, *Biochemistry* **1999**, *38*, 10649.
- [220] C. Renner, S. Alefelder, J. H. Bae, N. Budisa, R. Huber, L. Moroder, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 949; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 923.
- [221] P. Wang, Y. Tang, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6900.
- [222] Y. Tang, G. Ghirlanda, W. A. Petka, T. Nakajima, W. F. DeGrado, D. A. Tirrell, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1542; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1494.
- [223] Y. Tang, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11089.
- [224] N. Budisa, M. Rubini, J. H. Bae, E. Weyher, W. Wenger, R. Golbik, R. Huber, L. Moroder, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4238; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4066.
- [225] J. H. Bae, M. Rubini, G. Jung, G. Wiegand, M. H. J. Seifert, M. K. Azim, J.-S. Kim, A. Zumbusch, T. A. Holak, L. Moroder, R. Huber, N. Budisa, *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 1071.
- [226] H. Duewel, E. Daub, V. Robinson, J. F. Honek, *Biochemistry* **1997**, *36*, 3404.
- [227] M. D. Vaughan, P. Cleve, V. Robinson, H. S. Duewel, J. F. Honek, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8475.
- [228] H. S. Duewel, E. Daub, V. Robinson, J. F. Honek, *Biochemistry* **2001**, *40*, 13167.
- [229] M. H. J. Seifert, D. Ksiazek, M. K. Azim, P. Smialowski, N. Budisa, T. A. Holak, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7932.
- [230] J. G. Bann, J. Pinkner, S. J. Hultgren, C. Frieden, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 709.
- [231] S. Kothakota, T. L. Mason, D. A. Tirrell, M. J. Fournier, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 536.
- [232] T. J. Deming, M. J. Fournier, T. L. Mason, D. A. Tirrell, *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.* **1997**, *34*, 2143.
- [233] J. C. M. van Hest, D. A. Tirrell, *FEBS Lett.* **1998**, *428*, 68.
- [234] J. C. M. van Hest, K. L. Kiick, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1282.
- [235] K. L. Kiick, J. C. van Hest, D. A. Tirrell, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2232; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2148.
- [236] K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 19.
- [237] A. J. Link, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164.
- [238] D. Datta, P. Wang, I. S. Carrico, S. L. Mayo, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5652.
- [239] L. Wang, P. G. Schultz, *Chem. Commun.* **2002**, 1.
- [240] S. Benzer, S. P. Champe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1962**, *48*, 1114.
- [241] A. Garen, O. Siddiqi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1962**, *48*, 1121.

- [242] J. Normanly, L. G. Kleina, J. M. Masson, J. Abelson, J. H. Miller, *J. Mol. Biol.* **1990**, *213*, 719.
- [243] R. M. Hudziak, F. A. Laski, U. L. RajBhandary, P. A. Sharp, M. R. Capecchi, *Cell* **1982**, *31*, 137.
- [244] H. J. Drabkin, H. J. Park, U. L. Rajbhandary, *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 907.
- [245] F. Sherman in *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression* (Hrsg.: J. N. Strathern, E. W. Jones, J. R. Broach), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, **1982**, S. 463.
- [246] D. Kim, J. Johnson, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 7316.
- [247] J. Kimble, J. Hodgkin, T. Smith, J. Smith, *Nature* **1982**, *299*, 456.
- [248] S. L. Bolten, P. Powell-Abel, D. A. Fischhoff, R. H. Waterston, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 6784.
- [249] M. A. Rould, J. J. Perona, D. Soll, T. A. Steitz, *Science* **1989**, *246*, 1135.
- [250] D. R. Liu, T. J. Magliery, P. G. Schultz, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 685.
- [251] D. R. Liu, T. J. Magliery, M. Pasternak, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10092.
- [252] B. P. Doctor, J. A. Mudd, *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 3677.
- [253] E. F. Whelihan, P. Schimmel, *EMBO J.* **1997**, *16*, 2968.
- [254] D. R. Liu, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 4780.
- [255] L. Wang, P. G. Schultz, unveröffentlichte Ergebnisse, **1998**.
- [256] K. Wakasugi, C. L. Quinn, N. Tao, P. Schimmel, *EMBO J.* **1998**, *17*, 297.
- [257] T. A. Kleeman, D. Wei, K. L. Simpson, E. A. First, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 14420.
- [258] L. Wang, T. J. Magliery, D. R. Liu, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5010.
- [259] B. A. Steer, P. Schimmel, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 35601.
- [260] L. Wang, P. G. Schultz, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 883.
- [261] R. Furter, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 419.
- [262] L. Wang, A. Brock, B. Herberich, P. G. Schultz, *Science* **2001**, *292*, 498.
- [263] L. Wang, A. Brock, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1836.
- [264] L. Wang, P. G. Schultz, unveröffentlichte Ergebnisse, **2001**.
- [265] L. Wang, Dissertation, University of California at Berkeley, **2002**.
- [266] S. W. Santoro, L. Wang, B. Herberich, D. S. King, P. G. Schultz, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1044.
- [267] M. Pastrnak, P. G. Schultz, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2373.
- [268] Z. Zhang, L. Wang, A. Brock, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2964; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2840.
- [269] J. W. Chin, S. W. Santoro, A. B. Martin, D. S. King, L. Wang, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9026.
- [270] J. W. Chin, A. B. Martin, D. S. King, L. Wang, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11020.
- [271] L. Wang, Z. Zhang, A. Brock, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 56.
- [272] L. Wang, J. Xie, A. A. Deniz, P. G. Schultz, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 174.
- [273] Z. Zhang, A. C. Smith Brian, L. Wang, A. Brock, C. Cho, P. G. Schultz, *Biochemistry* **2003**, *42*, 6735.
- [274] L. Alfanta, Z. Zhang, S. Uryu, J. A. Loo, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14662.
- [275] Z. Zhang, J. Gildersleeve, Y.-Y. Yang, R. Xu, J. A. Loo, S. Uryu, C.-H. Wong, P. G. Schultz, *Science* **2004**, *303*, 371; R. Xu, S. R. Hanson, Z. Zhang, P. G. Schultz, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, im Druck.
- [276] J. Turner, P. G. Schultz, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [277] J. W. Chin, P. G. Schultz, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 1135.
- [278] R. E. Galardy, L. C. Craig, M. P. Printz, *Nature New Biol.* **1973**, *242*, 127.
- [279] H. Liu, L. Wang, A. Brock, C.-H. Wong, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1702.
- [280] A. Deiters, T. A. Cropp, M. Mukherji, J. W. Chin, J. C. Anderson, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11782; A. Deiters, T. A. Cropp, M. Mukherji, D. Summerer, P. G. Schultz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, im Druck.
- [281] H. Zeng, P. G. Schultz, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [282] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683.
- [283] P. Sears, C. H. Wong, *Science* **2001**, *291*, 2344.
- [284] B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579.
- [285] M. Wacker, D. Linton, P. G. Hitchen, M. Nita-Lazar, S. M. Haslam, S. J. North, M. Panico, H. R. Morris, A. Dell, B. W. Wren, M. Aeby, *Science* **2002**, *298*, 1790.
- [286] S. R. Hamilton, P. Bobrowicz, B. Bobrowicz, R. C. Davidson, H. Li, T. Mitchell, J. H. Nett, S. Rausch, T. A. Stadheim, H. Wischnewski, S. Wildt, T. U. Gerngross, *Science* **2003**, *301*, 1244.
- [287] J. Xie, L. Wang, N. Wu, A. Brock, G. Spraggon, P. G. Schultz, *Nature Biotechnol.* **2004**, *22*, 1297.
- [288] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509.
- [289] P. G. Schultz, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [290] N. Wu, P. G. Schultz, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [291] M. Bose, D. Groff, P. G. Schultz, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [292] N. Wu, A. Dieters, T. A. Cropp, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14306.
- [293] Y. Zhang, L. Wang, I. A. Wilson, P. G. Schultz, unveröffentlichte Ergebnisse, **2003**.
- [294] T. Kobayashi, O. Nureki, R. Ishitani, A. Yaremcuk, M. Tukalo, S. Cusack, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 425.
- [295] F. J. LaRiviere, A. D. Wolfson, O. C. Uhlenbeck, *Science* **2001**, *294*, 165.
- [296] F. Tian, M. Tsao, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, im Druck.
- [297] R. A. Mehl, J. C. Anderson, S. W. Santoro, L. Wang, A. B. Martin, D. S. King, D. M. Horn, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 935.
- [298] J. F. Curran, M. Yarus, *Science* **1987**, *238*, 1545.
- [299] L. Bossi, J. R. Roth, *Cell* **1981**, *25*, 489.
- [300] M. O'Connor, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1985.
- [301] T. J. Magliery, J. C. Anderson, P. G. Schultz, *J. Mol. Biol.* **2001**, *307*, 755.
- [302] J. C. Anderson, T. J. Magliery, P. G. Schultz, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 237.
- [303] J. F. Atkins, R. B. Weiss, S. Thompson, R. F. Gesteland, *Annu. Rev. Genet.* **1991**, *25*, 201.
- [304] J. C. Anderson, N. Wu, S. W. Santoro, V. Lakshman, G. Schultz Peter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 7566.
- [305] J. C. Anderson, P. G. Schultz, *Biochemistry* **2003**, *42*, 9598.
- [306] S. W. Santoro, J. C. Anderson, V. Lakshman, P. G. Schultz, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 6700.
- [307] M. Pastrnak, T. J. Magliery, P. G. Schultz, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2277.
- [308] F. Martin, Dissertation, Université Louis Pasteur, Strasbourg, **1995**.
- [309] A. K. Kowal, C. Kohrer, U. L. RajBhandary, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 2268.
- [310] G. Galli, H. Hofstetter, M. L. Birnstock, *Nature* **1981**, *294*, 626.
- [311] K. Sakamoto, A. Hayashi, A. Sakamoto, D. Kiga, H. Nakayama, A. Soma, T. Kobayashi, M. Kitabatake, K. Takio, K. Saito, M. Shirouzu, I. Hirao, S. Yokoyama, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4692.
- [312] F. Li, Y. Xiong, J. Wang, H. D. Cho, K. Tomita, A. M. Weiner, T. A. Steitz, *Cell* **2002**, *111*, 815.
- [313] M. P. Deutscher, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1990**, *30*, 209.
- [314] S. L. Wolin, A. G. Matera, *Genes Dev.* **1999**, *13*, 1.
- [315] G. J. Arts, S. Kuersten, P. Romby, B. Ehresmann, I. W. Mattaj, *EMBO J.* **1998**, *17*, 7430.
- [316] H. Edwards, P. Schimmel, *Mol. Cell. Biol.* **1990**, *10*, 1633.

- [317] H. Edwards, V. Trezeguet, P. Schimmel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 1153.
- [318] Y. Kwok, J. T. Wong, *Can. J. Biochem.* **1980**, 58, 213.
- [319] D. Kiga, K. Sakamoto, K. Kodama, T. Kigawa, T. Matsuda, T. Yabuki, M. Shirouzu, Y. Harada, H. Nakayama, K. Takio, Y. Hasegawa, Y. Endo, I. Hirao, S. Yokoyama, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 9715.
- [320] J. W. Chin, T. A. Cropp, J. C. Anderson, M. Mukherji, Z. Zhang, P. G. Schultz, *Science* **2003**, 301, 964.
- [321] C. Kohrer, J. H. Yoo, M. Bennett, J. Schaack, U. L. RajBhandary, *Chem. Biol.* **2003**, 10, 1095.
- [322] S. L. Monahan, H. A. Lester, D. A. Dougherty, *Chem. Biol.* **2003**, 10, 573.
- [323] T. A. Cropp, P. G. Schultz, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [324] F. Xu, X. Chen, L. Xin, L. Chen, Y. Jin, D. Wang, *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 4125.
- [325] X. Yang, J. Lee, E. M. Mahony, P. D. Kwong, R. Wyatt, J. Sodroski, *J. Virol.* **2002**, 76, 4634.
- [326] Z. Zhang, L. Alfonta, F. Tian, B. Bursulaya, S. Uryu, D. S. King, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 8882.
- [327] A. Deiters, P. G. Schultz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, im Druck.
- [328] H. Cho et al., unveröffentlichte Ergebnisse

**Quality**  
**counts...**

**The best of chemistry every week**

1218404\_gu

**Wiley-VCH**  
P.O. Box 10 11 61  
69451 Weinheim  
Germany  
Phone +49 (0) 6201-606-400  
Fax +49 (0) 6201-606-184  
e-mail: [angewandte@wiley-vch.de](mailto:angewandte@wiley-vch.de)

[www.angewandte.org](http://www.angewandte.org)

**Angewandte Chemie International Edition** is a journal of the GDCh,  
the German Chemical Society

**GDCh**

**WILEY-VCH**