

Proteinmodifikation

Regioselektive Cysteinbiokonjugation durch Anhängen eines modifizierten Cystein-tags an ein Protein mithilfe von *trans*-Proteinspleißen**

Thomas Kurpiers und Henning D. Mootz*

Methoden zur chemischen Modifikation von Proteinen spielen eine zentrale Rolle für zahlreiche Aspekte der Grundlagenforschung und anwendungsbezogener Technologien. Die Einführung biophysikalischer Sonden dient beispielsweise dem Studium von Proteinstrukturen und -funktionen; die Stabilität und Biokompatibilität pharmazeutisch relevanter Proteine kann durch angehängte Polymere erhöht werden, und die Immobilisierung an einer Festphase wird beim Design von Proteinchips oder Enzymkatalysatoren genutzt.^[1,2]

Biokonjugationstechniken bedienen sich der Reaktivität funktioneller Gruppen in Proteinen und werden vermutlich am häufigsten zur Herstellung chemisch modifizierter Proteine verwendet.^[3] Cysteinreste sind wegen der einzigartigen chemischen Reaktivität der Sulfhydrylgruppe und weil sie in natürlichen Proteinen relativ selten vorkommen das wahrscheinlich wichtigste Ziel für die Biokonjugation. Die Cysteinseitenkette ist durch Reagentien mit verschiedenen funktionellen Gruppen chemoselektiv modifizierbar, z.B. durch Maleimide, Halogenacetamide oder Thiole. Zahlreiche solcher synthetischen Reagentien sind überdies kommerziell erhältlich. Die Cysteinmodifikation verläuft jedoch nur in Proteinen mit einem einzigen Cysteinrest streng regioselektiv. Deshalb kann die Methode für Proteine mit essenziellen oder mit mehreren Cysteinresten nur eingeschränkt oder gar nicht anwendbar sein. Wir stellten die Hypothese auf, dass das Problem der Regioselektivität umgangen werden könnte, wenn das Peptidrückgrat des Proteins aus zwei Teilen durch *trans*-Proteinspleißen unter Verwendung eines gespaltenen Inteins zusammengesetzt wird.^[4,5] Dabei würde nur ein Teil des Proteins zuvor mit dem Cystein modifizierenden Reagens inkubiert, sodass Cysteinreste im anderen Teil des Proteins unbeeinflusst bleiben (Abbildung 1). Ein weiterer Vorteil dieses allgemeinen Konzepts resultiert aus der spezifischen

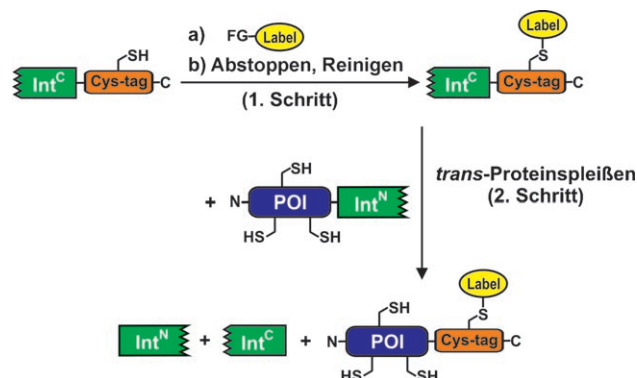


Abbildung 1. Prinzip des Ansatzes. Eine Peptidsequenz mit einem einzigen Cysteinrest (Cys-tag) wird als Fusion mit einem C-terminalen Fragment eines gespaltenen Inteins exprimiert und chemisch modifiziert. In einem zweiten Schritt wird dieser modifizierte Cys-tag durch *trans*-Proteinspleißen an ein Zielprotein gebunden. FG = funktionelle Gruppe (z. B. Maleimido, Halogenacetamido); POI = Protein.

Wechselwirkung der beiden gespaltenen Inteinhälften miteinander. Dies sollte das Proteinspleißen auch in einem komplexeren Proteingemisch, wie in einem Zell-Lysat oder in einer lebenden Zelle, ermöglichen.

In unserem experimentellen Ansatz zur regioselektiven Cysteinmodifikation sollte eine kurze Peptidsequenz mit einem einzigen modifizierten Cystein (Cys-tag) an ein Protein gespleißt werden (Abbildung 1). Dadurch sollte es möglich sein, verschiedene Modifikationsreagentien an den C-Terminus eines Proteins zu hängen. Eine Vorbedingung für diese Strategie ist das Fehlen eines Cysteinrests im jeweiligen Inteinfragment. Allerdings enthalten die meisten Inteine, wie das gut charakterisierte natürlich gesplattene *Ssp*-DnaE-Intein,^[6] sowie die künstlich gesplattene *Sce*-VMA-^[7] und *Mtu*-RecA-Inteine^[8] einen katalytisch wirkenden Cysteinrest an beiden Spleißstellen. Da die Cysteinreste für die Spaltung und Bildung der Peptidbindung unentbehrlich sind, können diese Inteine für den hier vorgestellten Ansatz nicht verwendet werden. Erst kürzlich haben wir das künstlich gesplattene *Ssp*-DnaB-Intein und dessen biochemische Anwendungsmöglichkeiten unter Verwendung von gereinigten Proteinen beschrieben.^[9] Dieses Intein trägt einen Serinrest an der C-terminalen Spleißstelle, und auch der übrige Teil des C-terminalen Fragments (DnaB^C) ist frei von Cysteinresten, was es zu einem idealen Kandidaten für unseren Ansatz macht.^[10] Außerdem ist das DnaB-Intein das einzige bekannte gesplattene Intein, dessen N- und C-terminalen Fragmente spontan zur aktiven Form assoziieren. Diese Assoziation findet unter nativen Bedingungen statt, d.h. sie erfordert keinen Renaturierungsschritt.^[9]

[*] T. Kurpiers, Prof. Dr. H. D. Mootz
Universität Dortmund, Fachbereich Chemie – Chemische Biologie
Otto-Hahn-Straße 6, 44229 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-755-5159
E-Mail: Henning.Mootz@uni-dortmund.de

[**] Wir danken S. Brenzel für die Konstruktion von Plasmid pSB34 und C. Ludwig für Plasmid pCL39 sowie U. Linne für Hilfe bei massenspektrometrischen Messungen und M. Marahiel für Unterstützung. Plasmid pAT37 wurde freundlicherweise von F. Bernhard zur Verfügung gestellt. Unsere Arbeiten wurden durch das Emmy-Noether-Programm der DFG und den Fonds der Chemischen Industrie finanziell gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Das Cystein des Cys-tag-Peptids wurde durch ortsgerichtete Mutagenese in die Exteinsequenz des vorher beschriebenen Konstrukts MBP-DnaB^C-His₆ (**4**)^[9] eingebracht, wodurch MBP-DnaB^C-Cys-His₆ (**2**; 50 kDa, Sequenz des C-Exteins: SIRSCGHHHHHH; Abbildung 2) erhalten wurde. Das Maltose bindende Protein (MBP) am N-Terminus dieser Konstrukte diente zur Steigerung der Expressionsrate, während der His-tag eine einfache Reinigung durch Affinitätschromatographie ermöglichte. Das Konstrukt **2** wurde in *E. coli* exprimiert und nach Zellaufschluss aus dem löslichen Überstand isoliert. Die Modifikation des einzelnen Cysteinrests erfolgte gemäß Standardprotokollen mit 5-(Iodacetamido)-Fluorescein (5-IAF; siehe die Hintergrundinformationen). Überschüssiges Reagens wurde mit Dithiothreitol (DTT) abgefangen und optional durch Gelfiltration abgetrennt. Die Reaktion von **2** zum modifizierten Protein MBP-DnaB^C-Cys(5-IAF)-His₆ (**3**) wurde anhand einer Bandenverschiebung hin zu höheren Molekulargewichten auf einem mit Coomassie-Brillantblau angefärbten SDS-PAGE-Gel sowie durch Beobachtung der Produktbande unter UV-Licht verfolgt. Das stöchiometrische Anbringen eines einzigen 5-IAF-Fluorophors konnte auch durch ESI-TOF-Massenspektrometrie bestätigt werden (Abbildung 2). Diesen Daten zufolge wurde das modifizierte Produkt mit $\geq 90\%$ Ausbeute gebildet, was gut mit den Erwartungen für diesen Reaktionstyp übereinstimmt und zeigt, dass der Cysteinrest im Konstrukt **2** frei zugänglich ist.

Das *trans*-Proteinspleißen des modifizierten Proteins **3** wurde durch Inkubation mit MBP-DnaB^N-His₆ (Konstrukt **1**, 56.4 kDa) untersucht, welches das komplementäre Inteinfragment (DnaB^N) sowie MBP als N-Extein enthielt. **1** wurde nach Expression in *E. coli* aus der löslichen Fraktion erhalten.^[9] In Abbildung 2b ist das SDS-PAGE-Gel der *trans*-Proteinspleißreaktion bei 25°C mit einer Konzentration von 2 μM je Protein gezeigt, wobei der zeitliche Verlauf der Spleißproduktbildung für MBP-Cys(5-IAF)-His₆ (**6**) zu sehen

ist. Die Beiprodukte **7** und **8** konnte ebenfalls identifiziert werden. (**7** ist wegen der geringen Größe von 13 kDa auf dem Gel in Abbildung 2b nicht sichtbar.) Eine Analyse des Reaktionsgemischs durch ESI-TOF-MS bestätigte die Identität aller erwarteten Spleißprodukte (Abbildung 2c). Die *trans*-Proteinspleißreaktion schritt, ähnlich zur Kontrollreaktion mit dem Ausgangskonstrukt **4** (Abbildung 2d), bis zu einer Ausbeute von 40–50 % nach 2 h voran. Dieser Wert ist typisch für viele gesplante Inteine, die *in vitro* rekonstituiert wurden.^[6,9] Auch die Kontrollreaktion von **1** mit dem nicht-modifizierten Cys-tag-Konstrukt **2** verlief analog, was die Interpretation stützt, dass weder der fluorophormarkierte noch der freie Cysteinrest nahe dem aktiven Nucleophil des Inteins einen negativen Effekt auf dessen Aktivität hat. In Übereinstimmung mit dem Modell, dass die Inteinfragmente schnell assoziieren und die Inteinfaltung und/oder die *trans*-Proteinspleißreaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellen,^[11] konnten die Reaktionskinetiken mit Funktionen erster Ordnung angenähert werden. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten von $(5.5 \pm 0.4) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (**1** + **2**) und $(4.7 \pm 0.4) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (**1** + **3**) stimmen gut mit der zuvor beschriebenen Geschwindigkeitskonstanten von $(9.9 \pm 0.8) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ für (**1** + **4**) überein.^[9]

Um die generelle Anwendbarkeit unseres Ansatzes hinsichtlich der chemischen Modifikation nachzuweisen, wurden verschiedene Reagentien getestet. Dabei wurden nach Modifikation von **2** mit maleimidgekoppeltem Fluorescein, Alexa Fluor 546, Texas Red und mit Biotin entsprechende Resultate wie oben beschrieben erzielt (siehe die Hintergrundinformationen). Die Aktivität des Inteins scheint also unabhängig von der Art der Modifikation zu sein, sodass die meisten, wenn nicht alle dieser Gruppen regioselektiv an den C-Terminus eines Proteins gebunden werden können.

Als nächstes untersuchten wir das Potenzial der Methode in Bezug auf das zu modifizierende Protein. Eine Stärke dieses Ansatzes ist die regioselektive Modifikation von Pro-

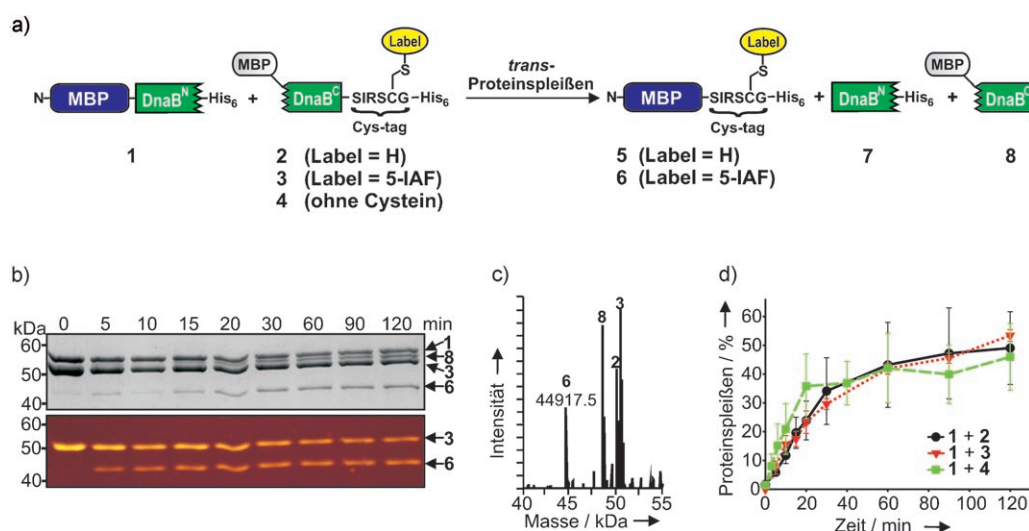


Abbildung 2. Proteinspleißreaktionen nach dem in Abbildung 1 beschriebenen Ansatz. a) Reaktionsschema. b) Mit Coomassie-Brillantblau angefärbtes (oben) und unter UV-Licht betrachtetes (unten) SDS-PAGE-Gel der Reaktion von **1** und **3**. (Das Beiprodukt **7** ist wegen seiner Größe von 13.1 kDa auf diesem Gel nicht zu erkennen.) c) ESI-TOF-MS-Analyse des Reaktionsgemischs nach 2 h. Beobachtete Molekulargewichte [Da] (berechnete Werte in Klammern): Spleißprodukt **6** 44917.5 (44917.8); **8** 48613.4 (48613.7), **3** 50428.5 (50428.6), **2** 50040.5 (50040.5). d) Zeitlicher Verlauf der *trans*-Proteinspleißreaktionen. Die kinetischen Daten der Reaktion von **1** mit **4** wurden aus Lit. [9] übernommen.

teinen, die mehrere Cysteinreste enthalten, mit üblichen Cystein modifizierenden Reagentien. Daher wurden die Proteine β -Lactamase (Bla) und Thioredoxin (Trx) ausgewählt. β -Lactamase verfügt über zwei Cysteinreste, die eine Disulfidbrücke bilden^[12] und die unter den reduktiven Bedingungen der Biokonjugationsprozedur unmittelbar mit Chemikalien reagieren würden, die Sulfhydrylgruppen angreifen. Beim Thioredoxin sind zwei Cysteinreste am Katalysezyklus beteiligt.^[13] Beide Proteine wurden als Fusionsproteine mit dem N-terminalen Inteinfragment hergestellt, was die Konstrukte Bla-DnaB^N-His₆ (**9**, 43.5 kDa; Abbildung 3) und StreptagII-Trx-DnaB^N-His₆ (26.8 kDa; siehe die Hintergrundinformationen) ergab. Für die folgenden Experimente wurde zusätzlich eine vereinfachte Reinigungsstrategie zur Isolierung des Spleißprodukts aus dem Reaktionsgemisch entwickelt. Zu diesem Zweck wurde das neue C-terminale Inteinfragment His₁₀-gpD-DnaB^C-Cys (**10**, 19.3 kDa) hergestellt, wofür der C-terminale His-tag an den N-Terminus des Proteins gesetzt wurde. Als Konsequenz war das Spleißprodukt das einzige Protein im Reaktionsgemisch ohne His-tag und konnte somit im Durchfluss einer Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographiesäule angereichert werden. Zusätzlich wurde MBP durch das kleinere gpD-Kopfprotein^[14] des λ -Bakteriophagen ersetzt. Das resultierende Konstrukt **10** enthielt Cystein als vorletzte Aminosäure in der Cys-tag-Sequenz SIRSCG. **10** konnte als gut lösliches Protein durch Expression in *E. coli* gewonnen und mit verschiedenen Reagentien effizient am einzigen Cysteinrest modifiziert werden.

Für die Herstellung von C-terminal modifizierter β -Lactamase wurden **9** (8 μ M) und das fluoresceinmarkierte Konstrukt His₁₀-gpD-DnaB^C-Cys(5-IAF) (**11**) im Verhältnis ca. 1:2 zwei Stunden bei 25°C inkubiert. Abbildung 3b zeigt, dass das Spleißprodukt Bla-Cys(5-IAF) (**13**, 31.2 kDa) in ca. 40% Ausbeute (bezogen auf **9**) gebildet wurde. Das gereinigte Spleißprodukt **13** wurde in größerem Maßstab (1 mL Volumen) hergestellt und aus dem Durchfluss einer Ni²⁺-NTA-

Säule gewonnen (jeweils rechte Spur in Abbildung 3b). Das nichtmarkierte Spleißprodukt Bla-Cys (**12**) wurde unter Verwendung von Konstrukt **10** als Kontrolle auf dieselbe Weise erhalten. Die gereinigten Spleißprodukte **12** und **13** wurden ebenso wie die zusätzlichen Kontrollen, DnaB^N-Fusionsprotein **9** und rekombinant hergestelltes Bla-His₆,^[15] mittels Nitrocefin-Hydrolyse photometrisch auf β -Lactamase-Aktivität getestet.^[12] Aus den Messdaten in Abbildung 3c ergaben sich für diese Proteine sehr ähnliche k_{cat}/K_M -Werte: 1.6 s⁻¹ μ M⁻¹ (**13**), 2.3 s⁻¹ μ M⁻¹ (**12**), 1.4 s⁻¹ μ M⁻¹ (**9**) und 1.3 s⁻¹ μ M⁻¹ (Bla-His).

Auch die Herstellung von regioselektiv am C-Terminus mit Fluorescein modifiziertem Thioredoxin durch die gleiche Prozedur führte zu katalytisch aktivem Protein (siehe die Hintergrundinformationen). Diese Ergebnisse sind konsistent mit der Annahme, dass die Integrität des Proteins durch Expression als Intein^N-Fusionsprotein und anschließendes Proteinspleißen nicht beeinflusst wird, und unterstreichen damit die Anwendbarkeit dieser Methode.

Ein weiterer Vorteil unseres Ansatzes resultiert aus der Selektivität der Proteinspleißreaktion, die auf den komplementären Inteinfragmenten beruht. Nur Proteine oder Polypeptide, die als Fusion mit den Fragmenten exprimiert werden, können miteinander reagieren. Dies konnte unter anderem bereits durch Coexpression^[10] sowie durch Proteintransduktion eines Konstrukts in Zellen, die das entsprechende Partnerprotein exprimierten,^[16] gezeigt werden. Um zu untersuchen, ob die beschriebenen gespaltenen DnaB-Inteinstrukturen eine ausreichende Stabilität und Selektivität aufweisen, um eine effiziente Modifikation eines Proteins in einem Zellextrakt zu ermöglichen, wurde das fluoresceinmarkierte Protein **3** (10 μ M) in einem geschätzten äquimolaren Verhältnis zu lysierten *E. coli*-Zellen gegeben, die das komplementäre Inteininfusionsprotein **1** entweder exprimiert oder nicht exprimiert hatten. Die Reaktionen wurden sofort nach der Zugabe sowie nach 1 h durch Zugabe von SDS-PAGE-Probenpuffer gestoppt und analysiert (Abbildung 4).

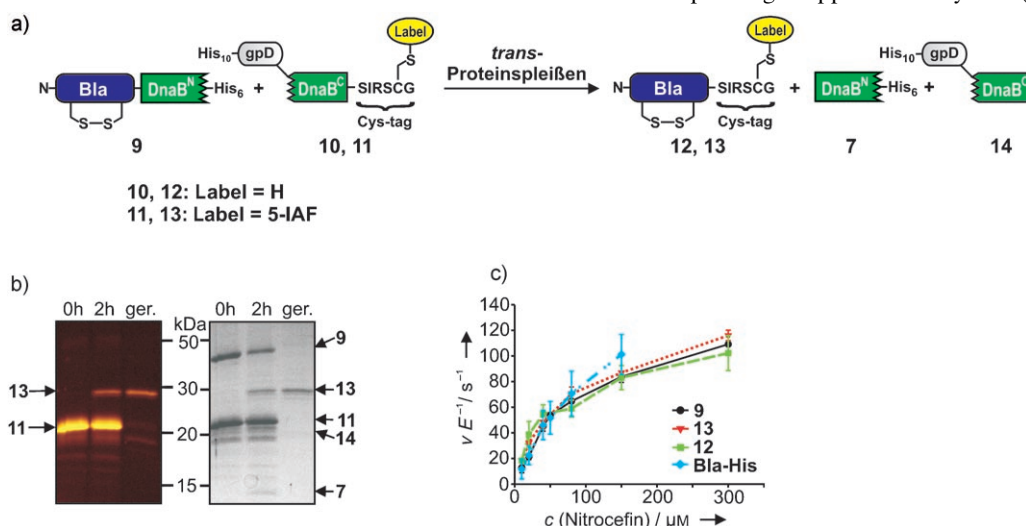


Abbildung 3. Präparation von regioselektiv mit Fluorescein modifizierter und katalytisch aktiver β -Lactamase (Bla). a) Reaktionsschema. b) Analyse der Proteinspleißreaktion von **9** und **11** und das gereinigte Spleißprodukt **13** auf einem mit Coomassie-Brillantblau angefärbten (rechts) sowie einem mit UV-Licht bestrahlten SDS-PAGE-Gel (links). Reines **13** wurde aus dem Durchfluss einer Ni²⁺-NTA-Chromatographiesäule erhalten. c) Enzymatische Aktivität des modifizierten Proteins **13**: Nitrocefin-Hydrolyse und Kontrollexperimente für das unmarkierte Protein **12**, das Fusionsprotein **9** und das rekombinante Kontrollprotein Bla-His₆. Gezeigt sind jeweils die Michaelis-Menten-Auftragungen.

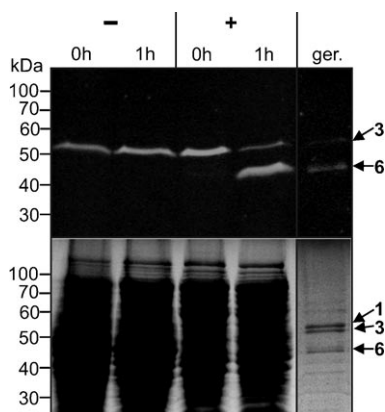


Abbildung 4. Proteinmodifikation in einem Zell-Lysat. Fluoresceinmarkiertes Cys-tag-Protein **3** wurde zu *E. coli*-Zell-Lysaten mit (+) oder ohne (–) exprimiertes Konstrukt **1** gegeben. Gezeigt sind ein mit Coomassie-Brillantblau gefärbtes SDS-PAGE-Gel (unten) und ein SDS-PAGE-Gel unter UV-Licht (oben). Das modifizierte Spleißprodukt **6** konnte durch analytische Ni^{2+} -NTA-Chromatographie gereinigt werden (rechte Spur). Unter diesen Bedingungen wurden weitere His₆-markierte Proteine ebenfalls gereinigt.

Auch in Gegenwart sehr großer Mengen an *E. coli*-Proteinen als unspezifische Wechselwirkungspartner wurde **3** weder abgebaut, noch reagierte es bei Abwesenheit von **1** mit irgendeinem anderen Protein. Nur wenn exprimiertes Protein **1** im Zell-Lysat vorhanden war, wurde das erwartete fluoresceinmarkierte Spleißprodukt **6** spezifisch und in Ausbeuten über 80 % gebildet. Die Integrität des Spleißprodukts **6** konnte des Weiteren durch analytische Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie nachgewiesen werden, wobei die anderen His-tag tragenden Proteine **1** und **3** ebenfalls gereinigt wurden (Abbildung 4). Die selektive Markierung von Proteinen in Zell-Lysaten könnte zum einen dazu verwendet werden, einen Reinigungsschritt des Zielproteins zu umgehen, zum anderen könnten modifizierte Proteine direkt im Zell-Lysat oder in anderen komplexen Gemischen untersucht werden.

Wir haben gezeigt, dass ein kurzer, chemisch modifizierter Cys-tag an ein Zielprotein gespleißt werden kann. Alternativ könnte das Zielprotein auch an einer anderen geeigneten Stelle gespalten werden, wenn ein Cysteinrest modifiziert werden soll, der sich weiter im Inneren der Aminosäuresequenz befindet. Unsere Methode umgeht eine entscheidende Beschränkung der herkömmlichen Cysteinbiokonjugation. Sie ist nützlich für biochemische Untersuchungen und Manipulationen, wenn eine chemische Reportergruppe regioselektiv an ein Protein mit mehreren Cysteinresten angebracht werden soll. Eine spezifische Anwendung wäre etwa das Einbringen einer zweiten, chemisch verschiedenen Gruppe an einen weiteren Cysteinrest nach dem Proteinspleißschritt, um ein an zwei Stellen selektiv modifiziertes Protein für intramolekulare FRET-Messungen herzustellen. Während wir die Durchführbarkeit dieser Methode für die C-terminale Modifikation von Proteinen demonstriert haben, könnte das Verfahren so verändert werden, dass am N-Terminus modifizierte Proteine zugänglich werden. Dafür geeignete Inteine benötigen eine andere Aminosäure als Cys-

tein an der ersten Position und idealerweise keinen weiteren Cysteinrest im N-terminalen Fragment. (Das hier verwendete *Ssp*-DnaB-Intein enthält einen Cysteinrest an Position 1.) Das künstlich gesplante *Psp*-Pol 1-Intein^[17] und das natürlich gesplante *Neq*-Pol-Intein^[18] wären für diese Aufgabe geeignet, da sie Serin- und Threoninreste an den Spleißstellen enthalten.

Wir sind überzeugt, dass unser Ansatz für zahlreiche Anwendungen eine wertvolle Alternative zur nativen chemischen Ligation (NCL) und zur Ligation exprimierter Proteine (expressed protein ligation, EPL) darstellt.^[19,20] Dabei ist vorteilhaft, dass weder ein Thioester noch eine Cysteingruppe an den Termini der zu verknüpfenden Fragmente vorhanden sein muss; außerdem kann die Reaktion effizient bei niedrigen mikromolaren Proteinkonzentrationen durchgeführt werden. Zusätzlich wird die Fülle an bewährten und kommerziell erhältlichen Reagentien für die Cysteinbiokonjugation das chemische Modifizieren von Proteinen schneller und einfacher gestalten. Die Möglichkeit zur Modifikation auch in komplexen Proteingemischen könnte auch zu Anwendungen in der Proteinreinigung oder bei chemischen Vernetzungsexperimenten in Zellextrakten führen.

Eingegangen am 15. Februar 2007

Online veröffentlicht am 30. Mai 2007

Stichwörter: Biokonjugation · Fluorophore · Inteine · Proteinmodifikationen · Proteinspleißen

- [1] L. Wang, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 34; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 34.
- [2] M. E. Hahn, T. W. Muir, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 26.
- [3] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, London, **1996**.
- [4] C. J. Noren, J. Wang, F. B. Perler, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 458; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 450.
- [5] H. Paulus, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 447.
- [6] D. D. Martin, M. Q. Xu, T. C. Evans, Jr., *Biochemistry* **2001**, *40*, 1393.
- [7] H. D. Mootz, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9044.
- [8] K. V. Mills, B. M. Lew, S. Jiang, H. Paulus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 3543.
- [9] S. Brenzel, T. Kurpiers, H. D. Mootz, *Biochemistry* **2006**, *45*, 1571.
- [10] H. Wu, M. Q. Xu, X. Q. Liu, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1998**, *1387*, 422.
- [11] T. J. T. Evans, M. Q. Xu, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4869.
- [12] C. H. O'Callaghan, A. Morris, S. M. Kirby, A. H. Shingler, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1972**, *1*, 283.
- [13] A. Holmgren, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 9627.
- [14] P. Forrer, R. Jaussi, *Gene* **1998**, *224*, 45.
- [15] C. Ludwig, M. Pfeiff, U. Linne, H. D. Mootz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5343; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5218.
- [16] I. Gariat, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7180.
- [17] M. W. Southworth, E. Adam, D. Panne, R. Byer, R. Kautz, F. B. Perler, *EMBO J.* **1998**, *17*, 918.
- [18] J. J. Choi, K. H. Nam, B. Min, S. J. Kim, D. Soll, S. T. Kwon, *J. Mol. Biol.* **2006**, *356*, 1093.
- [19] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776.
- [20] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6705.