

Paralleler In-vivo-Einbau von mehreren nichtkanonischen Aminosäuren in Proteine

Michael G. Hoesl und Nediljko Budisa*

Genetischer Code · Nichtkanonische Aminosäuren ·
Orthogonale Ribosomen · Protein-Engineering ·
Umprogrammierte Translation

Die Erweiterung des genetischen Standardcodes ermöglicht das Design von rekombinanten Proteinen mit neuen und ungewöhnlichen Eigenschaften. Üblicherweise enthalten solche Proteine nur eine Art nichtkanonischer Aminosäure in ihrer Sequenz, kürzlich konnte jedoch zum ersten Mal gezeigt werden, dass es mit suppressionsbasierten Methoden möglich ist, zwei chemisch unterschiedliche nichtkanonische Aminosäuren in ein und dasselbe Protein einzubauen, indem man die Suppression verschiedener Stoppcodons und Nicht-Triplett-Codons (z. B. Quadrupletts) miteinander kombiniert. Die Fähigkeit, den genetischen Code gleichzeitig mit mehreren nichtkanonischen Aminosäuren zu erweitern, wird die Möglichkeiten zur Herstellung multifunktionalisierter Proteine stark erweitern.

1. Einleitung

Schon in den 60er Jahren brachten chemische Methoden, bei denen durch externe Zugabe von Reagentien punktuell modifizierte Proteine erzeugt werden konnten, das Konzept der „chemischen Mutation“ auf.^[1] Darauf aufbauend ermöglichte die Etablierung des „Genetic Code Engineering“ (Engineering des genetischen Codes) und der „Genetic Code Expansion“ (Erweiterung des genetischen Codes) in den 90er Jahren genetisch codierte chemische Mutationen, indem sie den Fluss der genetischen Information um neue Komponenten erweiterten.^[2] Bei genauerer Betrachtung nutzt auch die Natur selbst diese Strategie.^[3] Auf Nukleinsäureebene wurde die Flexibilität der genetischen Codeinterpretation eindeutig nachgewiesen.^[4] Die bemerkenswertesten natürlichen Decodierungsbesonderheiten sind jedoch der Einbau von Selenocystein (Sec)^[5] und Pyrrolysine (Pyl)^[6] in Proteine. Dies wird durch Verwendung von sonst für die Translationstermination

vorgesehenen Codons erreicht. Derartige Recodierungsergebnisse findet man in Zellen, die natürliche tRNAs enthalten, welche Stoppcodons in einem bestimmten Sequenzkontext überlesen können.^[7] Daraus lässt sich ableiten, dass die „künstliche“ In-vivo-Translation von UGA- und UAG-Codons als Sense-Codons möglich ist und dass die Proteinsynthese-Maschinerie das Hinzufügen von neuen Aminosäuren zum Standardrepertoire toleriert.

Konzeptuell gesehen beschäftigen sich das Engineering und die Erweiterung des genetischen Codes mit der Vergrößerung des natürlichen Aminosäurerepertoires und/oder der Einführung neuer DNA/RNA-Basenpaare. Um dies zu erreichen, ist es nötig, die Proteintranslations-Maschinerie umzuprogrammieren, indem für die nichtkanonischen Aminosäuren (nkAS) neue Codons geschaffen oder existierende Codons neu zugeordnet werden. Das Engineering des genetischen Codes steht dabei für einen aminosäurerestspezifischen Einbau verschiedener nichtkanonischer Aminosäuren in Zielproteine über die Neuordnung von Sense-Codons mithilfe auxotropher Wirtzellen.^[8] Für den cotranslationalen Austausch von Aminosäuren gegen nkAS werden dabei auxotrophe Wirtzellen benötigt.^[9] Dagegen zeichnet sich die Erweiterung des genetischen Codes durch das Hinzufügen zusätzlicher nichtkanonischer Aminosäuren als Antwort auf Stopp- oder Nicht-Triplett-Codons aus.^[10] Mit dieser ortsspezifischen Methode ist also eine direkte Neuaufnahme nichtkanonischer Aminosäuren in die Gruppe der kanonischen Aminosäuren möglich. Beide Ansätze nutzen also die

[*] M. G. Hoesl, Prof. Dr. N. Budisa
Molekulare Biotechnologie, Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried (Deutschland)
Fax: (+49) 89-8578-3557
Prof. Dr. N. Budisa
Arbeitskreis Biokatalyse, Institut für Chemie
Technische Universität Berlin
Franklinstraße 29, 10587 Berlin (Deutschland)
E-Mail: budisa@biocat.tu-berlin.de
Homepage: <http://www.biocat.tu-berlin.de>

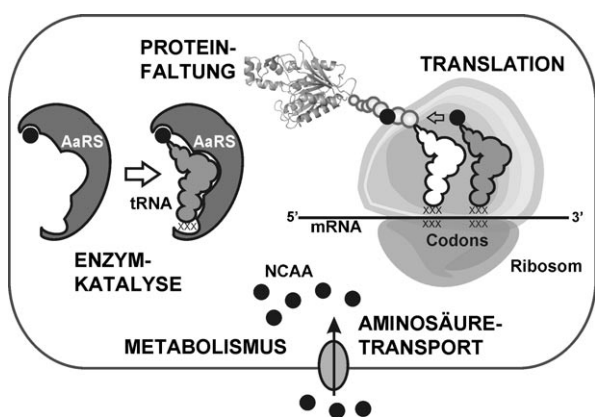


Abbildung 1. Ein Einbauexperiment für nichtkanonische Aminosäuren nutzt die Substrattoleranz mehrerer zellulärer Systeme (Aufnahme, Metabolismus und Komponenten des Translationsapparats). Details zu diesen Themen werden in Lit. [8] ausgeführt. Die Beziehung zwischen dem Engineering des genetischen Codes und der Proteinfaltung wird in Lit. [19,20] sowie in Lehrbüchern ausführlich diskutiert.^[2] Teile von Abbildung 1 wurden liebenswürdigerweise von Dr. Birgit Wiltzchi zur Verfügung gestellt.

Substrattoleranz mehrerer zellulärer Komponenten, wie in Abbildung 1 dargestellt ist.

Bis vor kurzem wurden durch Engineering des genetischen Codes nur einzelne nichtkanonische Aminosäuren in ein Zielprotein eingebaut. Dadurch konnten entweder die biophysikalischen Eigenschaften des Zielproteins verändert (z.B. Fluoreszenz^[11] oder Faltung^[12]) oder Konjugationsgruppen für spätere Proteinmodifikationen eingeführt werden.^[13] Die Kombination all dieser Möglichkeiten in einem einzelnen Protein wäre jedoch wünschenswert. Dies ist vor allem wichtig, wenn man bedenkt, dass viele biologische Phänomene wie bevorzugte Konformationen,^[14] enzymatische Aktivität^[15] oder molekulare Dynamik^[16] durch sich aufsummierende Effekte verschiedener Aminosäuren an unterschiedlichen Positionen in der Proteinsequenz zustande kommen.

In diesem Zusammenhang wurden kürzlich durch Engineering des genetischen Codes drei verschiedene nichtkanonische Aminosäuren an bis zu 24 Positionen in verschiedenen Modellproteinen parallel eingebaut.^[17–18] Ein solches Expe-

riment durch Erweiterung statt Engineering des genetischen Codes erfolgreich durchzuführen, wäre derzeit schwer zu erreichen. Ein effizientes Hinzufügen von neuen Aminosäuren zum Standardrepertoire *in vivo* ist nämlich sehr aufwendig, da vorher eine große Zahl von Translations- oder sogar anderen Zellkomponenten angepasst werden muss (siehe Abbildung 1). Die Aufgabe dieses Kurzaufsatzes ist es daher, einen kritischen Überblick über die neuesten Studien zum parallelen ortsspezifischen Einbau von mehreren nichtkanonischen Aminosäuren durch eine Erweiterung des genetischen Codes zu geben. Im Detail sollen kürzlich veröffentlichte Arbeiten zur parallelen Suppression von zwei Stoppcodons oder einem Stopp- und einem Quadruplett-Codon beleuchtet werden. Zuletzt soll versucht werden, mögliche zukünftige Entwicklungen in diesem Feld zu skizzieren.

2. Orthogonale Paare für einen erweiterten genetischen Code *in vivo*

Die Erweiterung des genetischen Codes als experimentelle Strategie zielt darauf ab, neue Codierungseinheiten für die Einbindung neuer nichtkanonischer Aminosäuren in das zelluläre Standardrepertoire zu erzeugen. Im einfachsten Szenario können ein oder zwei Stoppcodons als Leereinheit aufgefasst und für den Einbau von nichtkanonischen Aminosäuren genutzt werden. Dies ist nur möglich, da die Terminationsfunktion der Codons UAG (Amber), UAA (Ochre) oder UGA (Opal) durch eine spezielle Klasse von Adaptoren, den Suppressor-tRNAs unterdrückt werden kann. In der Natur können diese Suppressor-tRNAs verschiedene kanonische Aminosäuren als Antwort auf Nonsense- (eines der drei Stoppcodons wird in der mRNA überlesen), Missense- (Veränderung der Bedeutung eines Sense-Codons) oder Leseraster-Mutation im jeweiligen Gen einbauen.^[21] Bei der *In-vitro*-Translation werden oft chemisch oder enzymatisch fehlacylierte Suppressor-tRNAs als molekulare Hilfsmittel genutzt, um die Translation zu manipulieren. Die Gruppen um Sisido^[22] und Forster^[23] setzten zum Beispiel als erste fehlacylierte Suppressor-tRNAs für den ortsspezifischen Einbau von bis zu drei Aminosäuren an mehreren Positionen in einem einzelnen Protein ein. Dazu nutzten sie sowohl Sense- als auch Stopp- und Nicht-Triplett-Codons. Generell



Nediljko Budisa promovierte 1997 in der Gruppe von Robert Huber am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried. Von 1997 bis 2010 war er dort als Postdoktorand und später als Privatdozent und unabhängiger Gruppenleiter tätig. Seine Forschung wurde unter anderem vom BioFuture-Programm des BMBF gefördert. Seit Mai 2010 ist er Leiter des Arbeitskreises Biokatalyse an der Technischen Universität Berlin. Seine Forschung konzentriert sich auf den Kern der synthetischen Biologie und soll eine solide Basis für die Evolution synthetischer Lebensformen im Labor mit neuen chemischen Komponenten schaffen.



Michael Hösl studierte molekulare Biotechnologie an der Technischen Universität München, wo er 2007 seinen Masterabschluss erhielt. Derzeit ist er Doktorand in der Gruppe von Prof. Nediljko Budisa, wo er sich mit der Entwicklung von Methoden zum Einbau nichtkanonischer Aminosäuren in Proteine und mit Protein-Engineering beschäftigt.

sollte es also möglich sein, die Art und Länge einer grundlegenden Codierungseinheit in einem Gen auch in vivo zu manipulieren, da das Ribosom in vitro Codon/Anticodon-Basenpaarungen mit mehr als drei Nukleotiden in einem gewissen Maß toleriert.^[24] Zum Thema In-vitro-Neuzuordnung von Codons wird auf die exzellenten Studien in der Literatur verwiesen.^[25]

Zur Anwendung der genannten Strategien in lebenden Zellen reicht es aber nicht, bloß die chemisch fehlacylierten tRNAs einzusetzen. Vielmehr muss eine evolutive Erzeugung neuer Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (AARS) vorausgehen, die die jeweilige nichtkanonische Aminosäure spezifisch erkennen und auf eine zugehörige tRNA laden können. Solche AARS:tRNA-Paare sollten orthogonal sein, das heißt, sie sollten keinerlei Kreuzreaktivitäten zwischen eingebrachten heterologen und endogenen AARSen und tRNAs aufweisen. Die ersten systematischen Anstrengungen, ein wirklich orthogonales AARS:tRNA-Paar auf Basis der Glutaminyl-tRNA-Synthetase (GlnRS:tRNA^{Gln}) aus *Escherichia coli* zu erzeugen, waren nicht sehr erfolgreich.^[26] Daher entwickelte Furter eine alternative Strategie, die die Machbarkeit des ortsspezifischen Einbaus von nichtkanonischen Aminosäuren als Antwort auf ein UAG-Stoppocodon in vivo zeigte.^[27] Konkret wurde dies erreicht, indem das Phenylalanyl-tRNA-Synthetase-Paar (PheRS:tRNA^{Phe}_{CUA}) aus *Saccharomyces cerevisiae* (das Anticodon GAA wurde zu CUA mutiert) in *E. coli* überführt wurde. Die Verwendung eines AARS:tRNA-Paars aus einem evolutionär wenig verwandten Organismus wie *S. cerevisiae* führte dabei zu einer beachtlichen Reduktion der Kreuzreaktivität zwischen eingeführtem AARS:tRNA-Paar und endogenen *E.-coli*-Bestandteilen, da sich die tRNA-Identitätselemente in anderer Weise entwickelt haben. Darauf aufbauend identifizierten und evolvierten Schultz und Kollegen das orthogonale Tyrosyl-tRNA-Synthetase-Paar (TyrRS:tRNA^{Tyr}_{CUA}) aus *Methanocaldococcus jannaschii* für die Verwendung in *E. coli*.^[28] In den Folgejahren wurden weitere orthogonale Paare auf Basis von archaeeller Leucyl-tRNA-Synthetase (LeuRS:tRNA^{Leu}),^[29] Glutamyl-tRNA-Synthetase (GluRS:tRNA^{Glu}),^[30] Lysyl-tRNA-Synthetase (LysRS:tRNA^{Lys})^[31] und Tryptophanyl-tRNA-Synthetase aus *S. cerevisiae* (TrpRS:tRNA^{Trp})^[32] entwickelt. Bisher finden jedoch weiterhin hauptsächlich die TyrRS:tRNA^{Tyr}_{CUA}-Paare aus *M. jannaschii* Verwendung, und auch meist nur für den Einbau von Tyr- und Phe-analogen Aminosäuren oder Surrogaten mit ausgedehnten aromatischen Systemen.^[10,33]

2008 und 2009 konnten die Gruppen um Yokoyama, Chin und Carell ein orthogonales Paar auf Basis der Pyrrolysyl-tRNA-Synthetase (PylRS) etablieren.^[34–36] Sowohl in methanogenen, anaeroben Archaeen wie *Methanosarcina mazei* als auch in *E. coli* findet der Einbau von Pyl durch natürliche Nonsense-Suppression statt. Ein bestimmter Sequenzkontext des Stoppocodons ist hierzu nicht nötig.^[37,38] Die Struktur von Pyl ermöglicht die chemische Manipulation der aliphatischen Seitenkette und ist daher Ausgangspunkt für eine ganze Reihe von Aminosäureanaloga mit interessanten Eigenschaften und Funktionen, die durch Erweiterung des genetischen Codes auf Proteine übertragen werden können. Daher ist es nicht verwunderlich, dass PylRS:tRNA^{Pyl}-Paare für den Einbau von vielseitigen Lysinanaloga an einzelnen und

mehreren Positionen in rekombinanten Proteinen erzeugt wurden.^[34–36]

Es war zu erwarten, dass vor allem Pyrrolysyl- und Lysyl-tRNA-Synthetasen für die Manipulation ihrer Enzymspezifitäten geeignet sind, da sie intrinsisch bereits eine hohe Substrattoleranz aufweisen. Die Spezifität der Aminoacylierung (ausgedrückt als Diskriminierungs- oder D-Faktor) bezogen auf die 20 kanonischen Aminosäuren variiert in vitro beträchtlich unter den verschiedenen AARSen.^[39] Durch den höchsten D-Faktor (zwischen 28000 und > 500000) zeichnet sich die TyrRS aus, während die niedrigsten Werte mit 130 bis 1700 bei der LysRS beobachtet wurden.^[40] Die Existenz „intrinsisch entspannter“ AARSen wie LysRS dürfte daher einen sehr guten Ausgangspunkt für das Design einer neuen Generation von orthogonalen Paaren mit deutlich verbesserter Spezifität und katalytischer Effizienz darstellen.

Kürzlich konnten Chin und Kollegen zwei wechselseitig zueinander orthogonale TyrRS:tRNA^{Tyr}_{CUA}-Paare aus *M. jannaschii* herstellen, mit denen UAG einerseits und AGGA andererseits überlesen werden konnten.^[41] Diese Arbeit ist bemerkenswert, da sie zeigt, dass evolutionäre Distanz bei der Kombination mehrerer orthogonaler Paare in einer Zelle nicht zwingend für das Vermeiden von Kreuzreaktivitäten erforderlich ist. Basierend auf diesem Resultat sollte es möglich sein, die aus der *M.-jannaschii*-TyrRS entwickelten orthogonalen Paare kombinierbar und so für den Einbau mehrerer Aminosäuren verfügbar zu machen.

3. Erweiterung des genetischen Codes zum gleichzeitigen Einbau von zwei verschiedenen nichtkanonischen Aminosäuren

Der ortsspezifische Einbau nichtkanonischer Aminosäuren in einzelne rekombinante Proteine ist hochrelevant, da sich dadurch verschiedene biologische Problemstellungen angehen lassen. Wie bereits erwähnt, ist es aber auch höchst interessant, den Einbau von mehreren nichtkanonischen Aminosäuren in ein Zielprotein gleichzeitig zu erreichen. In diesem Zusammenhang entwickelten Schultz und Kollegen ein orthogonales archaeelles LysRS:tRNA^{Lys}-Paar für die Suppression des Quadruplett-Codons AGGA in vivo.^[31] Dieses wurde mit einem schon vorhandenen System auf der Basis von *M.-jannaschii*-TyrRS zum Überlesen von Stoppocodons kombiniert, was zum parallelen Einbau von Homoglutamin und O-Methyltyrosin an verschiedenen Positionen in Myoglobin führte. Dieses Experiment wies jedoch nur die prinzipielle Machbarkeit eines solchen Doppeleinbaus nach, da es durch seine extrem niedrige Proteinausbeute für praktische Anwendungen nicht geeignet war.

Kürzlich machte die Gruppe um Liu einen entscheidenden Schritt zur Verbesserung eines solchen Systems.^[42] Sie schafften es, zwei chemisch völlig unterschiedliche nichtkanonische Aminosäuren in das Grün fluoreszierende Protein (GFPuv) einzubauen, indem sie wie Schultz vorher zwei orthogonale Paare in einem einzelnen Expressionsexperiment miteinander kombinierten. Im Unterschied zur Arbeit von Schultz verwendeten sie jedoch zwei verschiedene Stoppocodons, Amber und Ochre. Um einen effizienten Doppelein-

bau zu erreichen, wurde eine mutierte *M.-jannaschii*-TyrRS für das Beladen der tRNA_{CUA}^{Tyr} mit *p*-Azidophenylalanin (*p*-AzPhe) mit einer modifizierten PylRS kombiniert, die N^ε-Propargyloxycarbonyllysine (PoxLys) auf eine tRNA_{UAA}^{Pyl} mit mutierter Anticodon-Schleife lädt (Abbildung 2). Das modifizierte TyrRS:tRNA_{CUA}^{Tyr}-Paar wurde dabei über ein erst kürzlich weiterentwickeltes Plasmidsystem zum Einbau nichtkanonischer Aminosäuren eingesetzt.^[43] Die Autoren beschreiben, dass sie auf diese Weise doppelt markiertes GFPuv mit „guten Ausbeuten“ erhielten. Dieses Produkt erwies sich weiterhin als stabil genug für eine darauffolgende Konjugation von Fluoreszenzfarbstoffen mithilfe von Klick-Chemie über die eingebrachten komplementären Azid- und Alkinfunktionen.

Bei diesen Experimenten sollte man jedoch immer im Hinterkopf behalten, dass die Veränderung des Anticodons in den meisten tRNAs gleichbedeutend mit der Modifizierung eines der drei Hauptidentitätsmerkmale (Anticodon, Diskriminatorkleotid 73 und N1:N72-Basenpaar) der tRNA ist. In *M. jannaschii* beispielsweise ist die Wechselwirkung zwischen dem Anticodon der tRNA^{Tyr} und der Anticodon-Bindedomäne der TyrRS eine kritische Identitätsdeterminante.^[44] Daher ist es sehr schwierig, die tRNA-Identität zu verändern und dabei gleichzeitig die hohe Akzeptoraktivität zu konservieren, wenn man im gleichen Schritt die komplexen Identitätsmerkmale modifizieren muss. Die ursprünglich genutzte tRNA^{Tyr}-Suppressor-tRNA hatte folglich eine ca. 300-fach geringere Akzeptoraktivität als Wildtyp-tRNA^{Tyr}.^[45–46] Dies führte dann auch zu einem drastischen Verlust an Translationseffizienz einer mRNA mit Amber-Stoppodon im Leseraster. Um die effiziente Beladung mit Aminosäure wieder teilweise zurückzugewinnen, sind eine weitreichende Manipulation der tRNA^[32,47] und eine Adaption der Anticodon-Bindetasche der AARS nötig.^[46]

Die *M.-mazei*-PylRS scheint jedoch wesentlich geringere Wechselwirkungen mit der Anticodon-Schleife der tRNA^{Pyl} aufzuweisen, was das System für Anticodon-Manipulationen sehr nützlich macht (Abbildung 2). Liu und Kollegen haben dieses Charakteristikum kürzlich ausgenutzt und herausgefunden, dass bereits nur am Anticodon modifizierte tRNA^{Pyl} sowohl Opal als auch Ochse und sogar UAGA in gutem Maße supprimiert.^[42] Daher scheinen aaRS:tRNA_{CUA}^{Pyl}-Paare wie die modifizierten PylRS:tRNA_{CUA}^{Pyl} eine gewisse Plastizität gegenüber Anticodons als Identitätselement aufzuweisen. Dies würde eine erhöhte Effizienz und Vielseitigkeit bei der Expression von rekombinanten Proteinen mit einem, zwei oder mehreren Stoppcodons in einem einzelnen Leseraster sowie für eine Kombination von Amber- und Ochse-Codons darin bedeuten.

Bei der Verwendung einer *M.-jannaschii*-TyrRS-Mutante für den Einbau von *O*-Sulfofytosin anstelle von *p*-AzPhe in Verbindung mit der *M.-mazei*-PylRS:tRNA_{UAA}^{Pyl} für den PoxLys-Einbau erhielten Liu und Kollegen im Unterschied zu dem oben beschriebenen Experiment allerdings nur sehr geringe Ausbeuten von doppelt markiertem GFPuv.^[42] Diese Ergebnisse spiegeln einen weiteren wichtigen Punkt wider, der in der bisherigen Literatur nicht kritisch genug evaluiert wurde. Es ist nämlich offensichtlich, dass manche von *M.-jannaschii*-TyrRS:tRNA_{CUA}^{Tyr} abgeleiteten orthogonalen

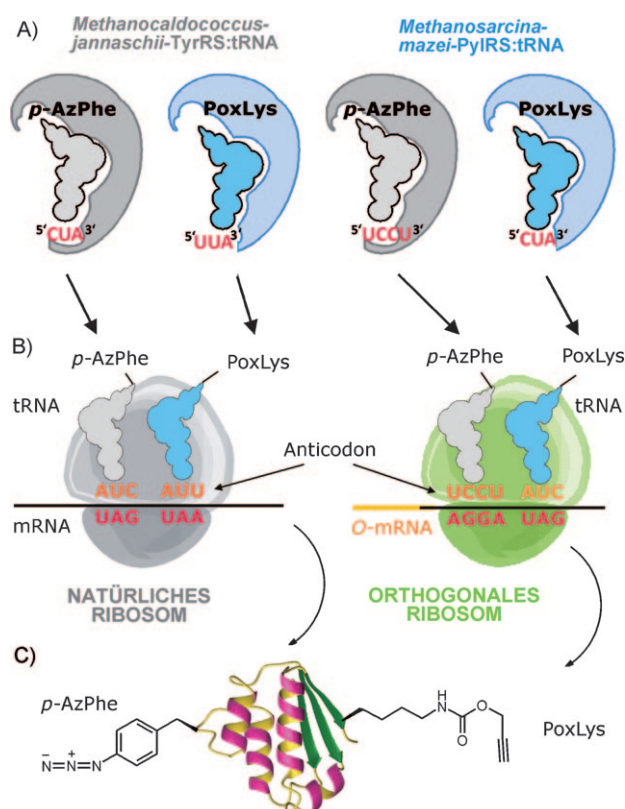


Abbildung 2. Zwei Methoden zum parallelen Einbau zweier nichtkanonischer Aminosäuren in rekombinante Proteine durch Überlesemethoden: A) Eine mutierte TyrRS und PylRS wurden genutzt, um *p*-AzPhe und PoxLys auf die jeweiligen Suppressor-tRNAs mit unterschiedlichen Anticodons zu laden. Beachtenswert ist die hohe Toleranz der PylRS gegenüber Anticodon-Manipulationen. (CUA, UUA, UCA und UCUA werden überlesen.) B) Liu und Mitarbeiter^[42] nutzten natürliche Ribosomen, um die GFPuv-mRNA mit den Stoppcodons Amber (UAG) und Ochse (UAA) im Leseraster zu translatieren. Chin und Mitarbeiter^[50] verwendeten orthogonale Ribosomen – die effizienter im Überlesen von Stopp- und Quadruplett-Codons sein sollen – um doppelt markiertes rekombinantes GST-Calmodulin herzustellen. C) Beide Gruppen konnten sowohl den Einbau der nichtkanonischen Aminosäuren als auch die chemische Reaktivität der eingeführten Funktionen (terminale Azide und Alkine) nachweisen. Die Effizienz beider Verfahren sollte in einem einheitlichen Experiment gezeigt werden, wie es im Haupttext beschrieben ist. Auf die graphische Darstellung der Machbarkeitsstudie für den ortsspezifischen In-vivo-Einbau zweier nichtkanonischer Aminosäuren durch Schultz und Mitarbeiter^[31] wurde verzichtet. Teile von Abbildung 2 wurden liebenswürdigerweise von Dr. Birgit Wilschi zur Verfügung gestellt.

Paare nur eine sehr geringe katalytische Aktivität aufweisen und dringend verbessert werden müssen, um für Anwendungen nützlich zu sein.^[43] Generell übersteigt die Suppression eines Stoppcodons selten 50 %, und sie hängt stark von der Position des Stoppcodons innerhalb der mRNA-Sequenz ab (Kontexteffekt).^[48,49] Es gibt aber auch Sequenzpositionen, an denen ein Überlesen eines Stoppcodons mit Suppressor-tRNAs überhaupt nicht möglich zu sein scheint.^[49] Dies bedeutet jedoch, dass man erst nach suppressiblen Sequenzpositionen suchen muss, bevor man ein erfolgreiches Einbauexperiment machen kann. Letztlich ist die Effektivität der Methode aber auch abhängig vom verwendeten Protein.

Modellproteine wie Dihydrofolat-Reduktase, Glutathion-S-Transferase, Myoglobin, Luciferase, β -Lactamase, Lysozyme oder GFP eignen sich ohne Zweifel für diese Markierungstechnik. Es bleibt jedoch abzuwarten, bis zu welchen Grad auch „schwierige Proteine“ wie Antikörper oder Proteine mit Wiederholungselementen wie Collagene dafür zugänglich sind.

Die diskutierten Probleme der Stoppcodon-Suppressionsysteme sollten auch im Licht von Dynamik und Kinetik der ribosomalen Translation mit fehlacylierten tRNAs betrachtet werden. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Cornish und Mitarbeitern^[51] zeigt, dass die Translationsmaschinerie nicht zwischen richtig beladenen und fehlacylierten tRNAs unterscheidet. Es konnten jedoch kleine, aber reproduzierbare Unterschiede in der Dynamik der Ribosomzyklen mit fehlbeladenen tRNAs beobachtet werden. Dies könnte bedeuten, dass jede Fehlacylierung den entsprechenden Translationszyklus leicht verlangsamt. Sollte das der Fall sein, müssten bei der Entwicklung von Methoden zum Dreifach- oder Mehrfacheinbau von nichtkanonischen Aminosäuren auch diese Aspekte mit einbezogen werden. Man kann also davon ausgehen, dass noch viel Optimierungsarbeit nötig ist. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass der suppressionsbasierte Einbau einzelner Aminosäuren durch mutierte ribosomale Proteine,^[52] Elongationsfaktoren^[53] oder auch ribosomale RNAs^[54] weiter verbessert werden kann. Weiterhin bietet die Optimierung der Wechselwirkung zwischen EF-Tu und nkAS-tRNA ein großes Potenzial zur Suppressionsverbesserung.^[55–57] Eine erschöpfende Diskussion dieser und anderer Aspekte (z. B. Aminosäureaufnahme,^[58] Proteinfaltung,^[19] tRNA-Modifikation,^[59] „Wobble“-freies tRNA-Design,^[60] Mutagenese der Anticodon-Bindedomäne^[61] und kinetisches Korrekturlesen am Ribosom^[51]) kann im Rahmen dieses Kurzaufsatzes nicht erfolgen.

4. Orthogonale Ribosomen – eine kritische Betrachtung

Die grundlegende Schwäche der Erweiterung des genetischen Codes ist, dass eine Suppressor-tRNA mit den Freisetzungsfaktoren (release factors, RF) an der ribosomalen A-Stelle konkurrieren muss (dort katalysieren RF die Terminationsreaktion). Dies verringert die Ausbeute an Vollständigkeitsprotein deutlich. Eine höhere Suppressioneffizienz wäre vor allem dann wünschenswert, wenn mehrere Stoppcodons in einem Leseraster supprimiert werden sollen. Eine Verringerung der RF-Aktivität führt jedoch zu erhöhter Zelltoxizität.^[62] Chin und Mitarbeiter konnten die Effizienz des Einbaus nichtkanonischer Aminosäuren erhöhen, indem sie orthogonale Ribosomen so mutierten, dass die Wechselwirkung des RF-1 mit den Ribosomen stark verringert ist und so eine erhöhte Durchleserate von Amber-Codons erreicht wird.^[54] Kurz gesagt, wurde eine 16S-rRNA-Bibliothek erzeugt, die Mutationen in der ribosomalen A-Stelle enthielt. Im nächsten Schritt wurde die Bibliothek nach den orthogonalen Ribosomen durchsucht, die ihre ursprüngliche Translationseffizienz erhielten, jedoch außerdem eine deutlich erhöhte Tendenz zum Überlesen von Amber-Codons im Leseraster zeigten. Wie bereits erwähnt, ist das verbesserte

Überlesen des UAG-Codons wahrscheinlich auf eine reduzierte Affinität des RF-1 zur ribosomalen A-Stelle zurückzuführen (wobei RF-2 und RF-3 die beiden anderen Stoppcodons UAG und UAA weiterhin erkennen). Zusätzlich sind diese Ribosomen spezialisiert, nur mRNAs zu translatieren, die Mutationen in der Shine-Dalgarno(SD)-Region tragen. Durch SD/Anti-SD-Wechselwirkungen wird daher ausschließlich die Ziel-mRNA abgelesen. Dadurch wird die Synthese des Proteoms weiterhin von natürlichen Ribosomen durchgeführt, während die mutierten Ribosomen für die Expression der rekombinanten Zielproteine zuständig sind (Abbildung 2).

In ihrer neuesten Arbeit^[50] kamen Chin und Mitarbeiter auf frühere Ideen und In-vivo-Experimente der Gruppe von Schultz zurück, die als erste eine Kombination aus Nonsense- und Quadruplett-Codon-Suppression zum parallelen Einbau zweier nichtkanonischer Aminosäuren nutzte.^[31] Mit dem bereits entwickelten Screeningsystem erzeugten sie mutierte Ribosomen (genannt „riboQ1“), die ein effizientes Überlesen von Quadruplett-Codons ermöglichten. Natürliche Ribosomen sind dazu nur eingeschränkt fähig. Gleichzeitig wurde auch die verbesserte Überlesekapazität für Amber-Codons im Leseraster erhalten. Um zu testen, ob riboQ1 den parallelen Doppeleinbau von nichtkanonischen Aminosäuren effizient durchführen kann, wurden zwei wechselseitig orthogonale AARS:tRNA-Paare entwickelt. Anders als in der Arbeit von Liu und Mitarbeitern^[42] nutzte die Gruppe um Chin eine *M.-jannaschii*-TyrRS-Mutante zum Einbau von *p*-AzPhe mit einer tRNA^{Tyr}_{UCCU} (anstatt tRNA^{Tyr}_{CUA}) in Kombination mit einer *M.-mazei*-PylRS, die PoxLys auf die entsprechende tRNA^{Pyl}_{CUA} lädt. Das Modellprotein GST-Calmodulin mit AGGA an Position 1 und UAG an Position 40 wurde als Vollständigkeitsprotein translatiert, die Autoren machten allerdings keine Angaben über spezifische Proteinausbeuten. Die markierten Proteine wurden einer intramolekularen Cu⁺-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition („Klick“-Chemie) unterworfen, um zu zeigen, dass eine solche Reaktion generell möglich ist.

Die Gruppe um Liu^[42] behauptete, dass Quadruplett-Anticodons relativ gut durch natürliche Ribosomen toleriert werden, wenn sie in *M.-mazei*-tRNA^{Pyl} auftreten. Chin und Mitarbeiter berichteten hingegen,^[50] dass Quadrupletts durch tRNA^{Tyr}_{UCCU} nur effizient überlesen werden konnten, wenn riboQ1 coexprimiert wurde (Abbildung 2). Die Effizienz von riboQ1 kann jedoch nur realistisch eingeschätzt werden, wenn beide Kombinationen aus orthogonalen Paaren in Gegenwart von normalen und mutierten Ribosomen getestet werden. Dies sollte vor allem im Hinblick darauf geschehen, dass tRNA^{Pyl}_{CUA} anscheinend für Anticodon-Manipulationen wesentlich zugänglicher ist. Ein zusätzlicher kritischer Punkt ist die generelle Effizienz von riboQ1 im Bezug auf die Suppression von Leserasterverschiebungen, wie kürzlich von Suga und Mitarbeitern hervorgehoben.^[63] Bei einer genauen Betrachtung der Hintergrundinformationen zum Originalmanuskript^[50] wird nämlich deutlich, dass ein signifikanter Anteil an verkürztem Protein als Nebenprodukt der umprogrammierten Translation entsteht.

Auf diesem Entwicklungsstand repräsentiert das Design von orthogonalen (mutierten) Ribosomen zweifellos einen

interessanten Ansatz für die Verbesserung des Überlesens von Nicht-Triplett-Codons. Sie könnten auch zu interessanten theoretischen Überlegungen Anlass geben, etwa über das Design „alternativer Protein-Universen“ mit Quadruplett-Codons oder über grundlegende Fragen zum Ursprung des Lebens.^[64] Die umprogrammierte Proteintranslation ohne orthogonale Ribosomen könnte jedoch als ebenso guter Ausgangspunkt für derartige theoretische Arbeiten dienen.^[2,65] In der Zwischenzeit muss evaluiert werden, ob die umprogrammierte Proteintranslation mit mutierten orthogonalen Ribosomen auf eukaryotische Systeme (Hefe oder Säugetiere) und vor allem auch auf industriell relevante mikrobielle Systeme für Anwendungen in der Biotechnologie ausgeweitet werden kann.

5. Kombination von Engineering und Erweiterung des genetischen Codes für den parallelen Einbau mehrerer Aminosäuren

Während Methoden mit einer Erweiterung des genetischen Codes Stopp- oder Quadruplett-Codons als Signal für den Einbau nichtkanonischer Aminosäuren nutzen, beruht das Engineering des genetischen Codes auf einer Neuordnung von Sense-Codons unter Ausnutzen der natürlichen Substrattoleranz endogener AaRSen. Mit dieser Methode konnte kürzlich der parallele In-vivo-Einbau von drei verschiedenen nichtkanonischen Aminosäuren in einem Expressionsexperiment mit polyauxotrophen *E.-coli*-Stämmen gezeigt werden. Einerseits wurde die Möglichkeit der Herstellung von fluoridierten Proteinen mit neuartigen Eigenschaften ausgelotet, indem an 24 Positionen in der thermophilen Lipase von *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* fluoridierte Aminosäuren eingebaut wurden.^[18] Andererseits wurde nachgewiesen, dass Barstar aus *Bacillus amyloliquefaciens* gleichzeitig mit einer reaktiven Gruppe für Klick-Reaktionen (Homopropargylglycin), einem nicht störenden Fluoreszenzmarker (4-Azatriptophan) und einer Stabilitätserhöhenden Aminosäure (*cis*-4-Fluorprolin) ausgestattet werden kann. Der effiziente parallele Einbau der drei verschiedenen nichtkanonischen Aminosäuren führte in einer einzigen Expressionsrunde zu einem stabilisierten Barstar-Derivat, das „Klick“-Reaktionen eingeht und anhand seiner Fluoreszenz detektierbar ist.^[17]

Um die Möglichkeiten beim Maßschneidern von Proteinen noch zu vergrößern, wurden Engineering und Erweiterung des genetischen Codes kombiniert.^[49] Dabei konnte mithilfe eines orthogonalen Paares ortsspezifisch eine nichtkanonische Aminosäure an einer überlesbaren Stoppcodon-Position eingebaut werden, während durch die auxotrophie-basierte aminosäurerestspezifische Methode der Einbau von mehreren isostrukturellen Aminosäureanaloge als Antwort auf Sense-Codons erreicht wurde. Es war wichtig, die Vorteile beider Ansätze zu verbinden, da es zum Beispiel mit den derzeit verfügbaren Methoden zur Selektion von AaRS-Mutanten für orthogonale Paare nicht möglich ist, Enzyme zu erzeugen, die geringfügige Strukturunterschiede (Austausch kleiner funktioneller Gruppen und Atome wie -H/-F, -H/-CH₃, -S/-CH₂-, -CH=/-N= oder H/-OH) effizient wahr-

nehmen können. Generell sollte die sorgfältige Kombination der Möglichkeiten beider Techniken in Verbindung mit dem Einsatz von orthogonalen Ribosomen und Zellen mit rekonstruiertem Genom (siehe Abschnitt 6) uns nicht nur das effiziente Hinzufügen/Austauschen von nichtkanonischen Aminosäuren in das Standard-Aminosäurerepertoire ermöglichen, sondern auch beispiellose Möglichkeiten im Bereich des Protein-Engineering an die Hand geben.

6. Organismus-Chemie (synthetische Zellen)

Die Erweiterung des genetischen Codes setzt die Erzeugung neuer Codierungseinheiten voraus, um das Aminosäurerepertoire von lebenden Zellen zu vergrößern. Eines Tages könnte dies zu teilsynthetischen Zellen mit vererbaren und spezifischen chemischen Veränderungen im Proteom führen, die Eigenschaften/Verhaltensweisen aufweisen, die bei Lebewesen bisher nicht auftreten.^[2] Durch die geringe zelluläre Toleranz gegenüber chemisch veränderten Proteomen ist das Einbringen von nichtkanonischen Aminosäuren bisher nur auf der Ebene von einzelnen rekombinanten Proteinen möglich. Daher sind alle Anstrengungen, Codierungskapazitäten zu verändern oder zu erweitern, nur nützliche Ergänzungen der rekombinanten DNA-Technologie. Der parallele Einbau von zwei oder drei nichtkanonischen Aminosäuren gehört hier sicherlich zu den fortschrittlichsten Methoden des Protein-Engineering auf der Ebene einzelner Zellen.

Mit den neuesten Arbeiten von Venter und Mitarbeitern ergibt sich jedoch eine realistische Aussicht auf einen proteomweiten Einsatz solcher Methoden. Venter berichtete über eine Reihe von Experimenten zur Synthese und Transplantation eines ganzen bakteriellen Genoms mit dem Ziel, eine Minimalzelle^[67] zu erzeugen.^[66] Die beschriebenen Techniken machen es absehbar, dass zukünftig bakterielle Stämme produziert werden können, bei denen Stoppcodons oder AaRS:tRNA-Paare aus dem kompletten Genom entfernt wurden (z. B. von *Mycoplasma*, das schon als unverändertes Bakterium einen alternativen genetischen Code nutzt^[4]). Danach können neue orthogonale Paare oder sogar Sense-Codons mit neuer Zuordnung (d. h. Codon-Einfang) in das rekonstruierte Genom eingeführt werden. Diese Ausweitung des Aminosäurerepertoires könnte eventuell sogar zu einem evolutionären Vorteil für die rekonstruierten Zellen werden. Auf dieser Grundlage ergäbe sich die Chance, durch einen systematischen proteomweiten Einbau nichtkanonischer Aminosäuren gänzlich neue Organismusfunktionen zu erzeugen. Dabei könnten sich Engineering und Erweiterung des genetischen Codes auf die chemische Zusammensetzung des ganzen Proteoms auswirken, nicht nur auf einzelne Proteine. Eine solche „Organismus-Chemie“ könnte beispiellose Vorteile und Möglichkeiten in der kommenden Ära der synthetischen Biologie erbringen.

Addendum

Zur Qualität orthogonaler Paare: Tippmann und Mitarbeiter konnten kürzlich solide genetische und strukturelle

Daten liefern, warum manche orthogonale Paare nur ineffizient nkASs erkennen und einbauen.^[68] Sie identifizierten zwei „regulatorische“ Aminosäurepositionen in den AaRSen, deren Identität für die Effizienz der Diskriminierung zwischen kanonischer und nichtkanonischer Aminosäure maßgeblich ist. Diese neuen Einblicke werden die Verbesserung derzeit bestehender und die Etablierung von neuen orthogonalen Paaren wesentlich erleichtern.

Zur Organismus-Chemie: Sakamoto und Mitarbeiter erzeugten kürzlich einen *E. coli*-Stamm, der das Amber(UAG)-Codon nicht mehr zur Translationsterminierung nutzt.^[69] Dies erreichten sie dadurch, dass sie den Freisetzungsfaktor 1 (RF1) entfernten. Diese im Normalfall letale Prozedur konnte durch eine erstaunlich geringe Zahl von genetischen Veränderungen und Komplementierungen kompensiert werden. Ein kompletter Austausch aller Amber-Codons im Genom war nicht nötig. Mit diesen genetisch modifizierten Zellen war es der Gruppe möglich, in einem Modellprotein an sechs mit UAG kodierten Positionen *p*-Iodphenylalanin einzubauen. Wenn die Ergebnisse von anderen Forschungsgruppen bestätigt werden können, ist diese Studie sicher eine der wichtigsten der letzten Jahre auf diesem Forschungsgebiet, da sie das „Konkurrenzproblem“ zwischen Amber-Suppressor-tRNA und RF1 lösen würde.

Eingegangen am 10. September 2010

Online veröffentlicht am 25. Februar 2011

- [1] K. E. Neet, D. E. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1966**, 56, 1606–1611.
- [2] N. Budisa, *Engineering the Genetic Code*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [3] A. Ambrogelly, S. Palioura, D. Soll, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 29–35.
- [4] S. Osawa, T. H. Jukes, K. Watanabe, A. Muto, *Microbiol. Rev.* **1992**, 56, 229–264.
- [5] F. Zinoni, A. Birkmann, W. Leinfelder, A. Bock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 3156–3160.
- [6] G. Srinivasan, C. M. James, J. A. Krzycki, *Science* **2002**, 296, 1459–1462.
- [7] R. F. Gesteland, J. F. Atkins, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 741–768.
- [8] N. Budisa, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 6586–6624; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6426–6463.
- [9] C. Minks, S. Alefelder, L. Moroder, R. Huber, N. Budisa, *Tetrahedron* **2000**, 56, 9431–9442.
- [10] L. Wang, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 34–68; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 34–66.
- [11] S. Lepthien, M. G. Hoesl, L. Merkel, N. Budisa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 16095–16100.
- [12] C. Renner, S. Alefelder, J. H. Bae, N. Budisa, R. Huber, L. Moroder, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 949–951; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 923–925.
- [13] K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 19–24.
- [14] C. Wolschner, A. Giese, H. A. Kretschmar, R. Huber, L. Moroder, N. Budisa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 7756–7761.
- [15] M. G. Hoesl, C. G. Acevedo-Rocha, S. Nehring, M. Royter, C. Wolschner, B. Wiltschi, N. Budisa, G. Antranikian, *ChemCatChem* **2011**, 3, 213–221.
- [16] T. Steiner, P. Hess, J. H. Bae, B. Wiltschi, L. Moroder, N. Budisa, *PLoS ONE* **2008**, 3, Nr. e1680.
- [17] S. Lepthien, L. Merkel, N. Budisa, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 5576–5581; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 5446–5450.
- [18] L. Merkel, M. Schauer, G. Antranikian, N. Budisa, *ChemBioChem* **2010**, 11, 1505–1507.
- [19] L. Moroder, N. Budisa, *ChemPhysChem* **2010**, 11, 1181–1187.
- [20] M. G. Hoesl, M. Larregola, H. Cui, N. Budisa, *J. Pept. Sci.* **2010**, 16, 589–595.
- [21] S. Brenner, A. O. Stretton, S. Kaplan, *Nature* **1965**, 206, 994–998.
- [22] T. Hoshaka, M. Sisido, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 809–815.
- [23] A. C. Forster, Z. P. Tan, M. N. L. Nalam, H. N. Lin, H. Qu, V. W. Cornish, S. C. Blacklow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 6353–6357.
- [24] J. C. Anderson, T. J. Magliery, P. G. Schultz, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 237–244.
- [25] Z. P. Tan, S. C. Blacklow, V. W. Cornish, A. C. Forster, *Methods* **2005**, 36, 279–290.
- [26] D. R. Liu, T. J. Magliery, M. Pasternak, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 10092–10097.
- [27] R. Furter, *Protein Sci.* **1998**, 7, 419–426.
- [28] L. Wang, A. Brock, B. Herberich, P. G. Schultz, *Science* **2001**, 292, 498–500.
- [29] J. C. Anderson, P. G. Schultz, *Biochemistry* **2003**, 42, 9598–9608.
- [30] S. W. Santoro, J. C. Anderson, V. Lakshman, P. G. Schultz, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 6700–6709.
- [31] J. C. Anderson, N. Wu, S. W. Santoro, V. Lakshman, D. S. King, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 7566–7571.
- [32] R. A. Hughes, A. D. Ellington, *Nucl. Acids Res.* **2010**, 38, 6813–6830.
- [33] C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, 79, 413–444.
- [34] E. Kaya, K. Gutmiedl, M. Vrabel, M. Müller, P. Thumbs, T. Carell, *ChemBioChem* **2009**, 10, 2858–2861.
- [35] T. Mukai, T. Kobayashi, N. Hino, T. Yanagisawa, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 371, 818–822.
- [36] H. Neumann, S. Y. Peak-Chew, J. W. Chin, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, 4, 232–234.
- [37] O. Namy, Y. Zhou, S. Gundllapalli, C. R. Polycarpo, A. Denise, J. P. Rousset, D. Soll, A. Ambrogelly, *FEBS Lett.* **2007**, 581, 5282–5288.
- [38] J. Yuan, P. O'Donoghue, A. Ambrogelly, S. Gundllapalli, R. L. Sherrer, S. Palioura, M. Simonovic, D. Soell, *FEBS Lett.* **2010**, 584, 342–349.
- [39] H. Jakubowski, E. Goldman, *Microbiol. Rev.* **1992**, 56, 412–429.
- [40] W. Freist, D. H. Gauss, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **1995**, 376, 451–472.
- [41] H. Neumann, A. L. Slusarczyk, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 2142–2144.
- [42] W. Wan, Y. Huang, Z. Y. Wang, W. K. Russell, P. J. Pai, D. H. Russell, W. R. Liu, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 3279–3282; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 3211–3214.
- [43] T. S. Young, I. Ahmad, J. A. Yin, P. G. Schultz, *J. Mol. Biol.* **2010**, 395, 361–374.
- [44] P. Fechter, J. Rudinger-Thirion, M. Tukalo, R. Giege, *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 761–767.
- [45] R. Giege, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, 10, 414–416.
- [46] T. Kobayashi, O. Nureki, R. Ishitani, A. Yaremchuk, M. Tukalo, S. Cusack, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, 10, 425–432.
- [47] L. Wang, P. G. Schultz, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 883–890.
- [48] A. K. Kowal, C. Kohrer, U. L. RajBhandary, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 2268–2273.
- [49] M. G. Hoesl, N. Budisa, *ChemBioChem* **2010**, DOI: 10.1002/cbic.201000586.
- [50] H. Neumann, K. Wang, L. Davis, M. Garcia-Alai, J. W. Chin, *Nature* **2010**, 464, 441–444.

- [51] P. R. Effraim, J. Wang, M. T. Englander, J. Avins, T. S. Leyh, R. L. Gonzalez, Jr., V. W. Cornish, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 947–953.
- [52] Y. Huang, W. K. Russell, W. Wan, P.-J. Pai, D. H. Russell, W. Liu, *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 683–686.
- [53] Y. Doi, T. Ohtsuki, Y. Shimizu, T. Ueda, M. Sisido, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14458–14462.
- [54] K. H. Wang, H. Neumann, S. Y. Peak-Chew, J. W. Chin, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 770–777.
- [55] F. J. LaRiviere, A. D. Wolfson, O. C. Uhlenbeck, *Science* **2001**, *294*, 165–168.
- [56] A. C. Forster, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 3747–3755.
- [57] J. Guo, E. M. Charles III, H. S. Lee, D. Groff, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9312–9315; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9148–9151.
- [58] C. Giese, S. Lepthien, L. Metzner, M. Brandsch, N. Budisa, H. Lilie, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1449–1456.
- [59] A. Weixlbaumer, F. V. Murphy, A. Dziergowska, A. Malkiewicz, F. A. P. Vendeix, P. F. Agris, V. Ramakrishnan, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 498–502.
- [60] I. Kwon, K. Kirshenbaum, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7512–7513.
- [61] J. K. Takimoto, K. L. Adams, Z. Xiang, L. Wang, *Mol. Biosyst.* **2009**, *5*, 931–934.
- [62] R. E. Doerig, B. Suter, M. Gray, E. Kubli, *EMBO J.* **1988**, *7*, 2579–2584.
- [63] G. Hayashi, Y. Goto, H. Suga, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 320–321.
- [64] I. A. Chen, M. Schindlinger, *Bioessays* **2010**, *32*, 650–654.
- [65] N. Budisa, L. Moroder, R. Huber, *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, *55*, 1626–1635.
- [66] D. G. Gibson, J. I. Glass, C. Lartigue, V. N. Noskov, R.-Y. Chuang, M. A. Algire, G. A. Benders, M. G. Montague, L. Ma, M. M. Moodie, C. Merryman, S. Vashee, R. Krishnakumar, N. Assad-Garcia, C. Andrews-Pfannkoch, E. A. Denisova, L. Young, Z.-Q. Qi, T. H. Segall-Shapiro, C. H. Calvey, P. P. Parmar, C. A. Hutchison, H. O. Smith, J. C. Venter, *Science* **2010**, *329*, 52–56.
- [67] A. C. Forster, G. M. Church, *Mol. Syst. Biol.* **2006**, *2*, 45.
- [68] A. K. Antonczak, Z. Simova, I. T. Yonemoto, M. Bochtler, A. Piasecka, H. Czapinska, A. Brancale, E. M. Tippmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, DOI: 10.1073/pnas.1012276108.
- [69] T. Mukai, A. Hayashi, F. Iwaha, A. Sato, K. Ohtake, S. Yokoyama, K. Sakamoto, *Nucl. Acids Res.* **2010**, *38*, 8188–8195.