

# Mehrfache Markierung von Proteinen mit nichtnatürlichen Aminosäuren\*\*

Karin V. Loscha, Anthony J. Herlt, Ruhu Qi, Thomas Huber, Kiyoshi Ozawa und  
Gottfried Otting\*

Durch die Etablierung effizienter Systeme zur genetischen Codierung des positionsspezifischen Einbaus nichtnatürlicher Aminosäuren (nAS) in Proteine haben sich zahllose neue Möglichkeiten für Studien der Struktur, Dynamik und Wechselwirkungen von Proteinen aufgetan.<sup>[1]</sup> Insbesondere wurden orthogonale Paare von Amber-Suppressor-tRNA (*Mjt*tRNA) und Tyrosyl-tRNA-Synthetase (*Mj*TyrRS) von *Methanocaldococcus jannaschii* evolviert, die spezifisch das Amber-Stopcodon als Signal für den Einbau einer von über 40 verschiedenen nAS erkennen.<sup>[1]</sup> Obwohl diese Systeme zum Teil Proteinmutanten mit Ausbeuten produzieren, die sich mit der des Wildtyps messen,<sup>[2,3]</sup> hängen die Ausbeuten dennoch stark vom Kontext ab. So kann ein einziges Amber-Stopcodon im Gen des Zielproteins zu unakzeptablen Ausbeuten führen.<sup>[3–6]</sup>

Viele Versuche befassten sich deshalb mit Methoden, die im Wettkampf zwischen dem *Escherichia coli*-Release-Faktor RF1, der das Amber-Stopcodon erkennt, und der Suppressor-tRNA zur Produktion vollständigen Proteins führen. So lässt sich der Einbau von nAS fördern, indem man ein zellfreies System aus seinen individuell gereinigten Enzymkomponenten zusammensetzt und RF1 fortlässt.<sup>[7]</sup> Zellfreie Systeme wurden auch verwendet, um RF1 mithilfe von RF1-Antikörpern<sup>[8,9]</sup> oder eines RNA-Aptamers gegen RF1<sup>[10]</sup> zu beseitigen. Leider sind alle diese Methoden nur in kleinem Maßstab bezahlbar, Antikörper können die Proteinausbeuten negativ beeinflussen<sup>[9]</sup> und Aptamere können nicht verhindern, dass verkürzte Proteinketten als Hauptprodukt erhalten werden.<sup>[10]</sup> Hitze-Inaktivierung einer wärmeempfindlichen RF1-Mutante in einem ineffektiven zellfreien *E. coli*-System erhöhte die nAS-Einbaurate auf nicht mehr als 75 % (in den

meisten Fällen < 50 %),<sup>[11]</sup> während längere Hitze-Inaktivierung die Genauigkeit der Translation beeinträchtigte. Über Eliminierung von markiertem RF1 aus einem zellfreien S30-Extrakt durch Affinitätschromatographie wurde berichtet, aber die Natur der Markierung wurde nicht beschrieben und vollständige Beseitigung von RF1 benötigte weiterhin RF1-Antikörper.<sup>[9]</sup> Eine andere Methode benutzte eine verkürzte Version des ribosomalen Proteins L11, um die Bindung von RF1 zu schwächen, was aber die Proteinausbeuten mit nAS nur wenig erhöhte.<sup>[12]</sup> Erste Versuche, RF1-freie *E. coli*-Stämme zu produzieren, führten zu beeinträchtigten Stämmen, deren Wachstum von nAS abhing (was die Proteinexpression verteuert),<sup>[13]</sup> oder zu Stämmen, die nicht völlig frei von RF1 waren.<sup>[14]</sup> Eine verbesserte Version des Release-Faktors RF2 erlaubte vor kurzem die Herstellung eines RF1-freien *E. coli*-DH10 $\beta$ -Stammes und den nAS-Einbau an mehreren Stellen in vivo, aber im Vergleich zur natürlichen Aminosäure (Tyrosin) waren die Proteinausbeuten mit nAS deutlich verringert.<sup>[6]</sup>

Die Kosten der attraktivsten nAS und die Schwierigkeit, in vivo die Konzentrationen an Aminoacyl-tRNA-Synthetase (RS) und Suppressor-tRNA den verschiedenen nAS und Einbaustellen anzupassen, führten uns dazu, ein kontinuierliches zellfreies Austauschsystem zu entwickeln, das die einfache, kostengünstige und vollständige Beseitigung von RF1 aus einem S30-Extrakt erlaubt, der von dem weitverbreiteten und Protease-reduzierten *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) (Invitrogen) stammt. Das System beruht darauf, dass der RF1-Wildtyp durch eine Mutante mit einem C-terminalen Affinitätsmarker bestehend aus drei aufeinanderfolgenden Chitinbindenden Domänen (RF1-CBD<sub>3</sub>) ersetzt wurde, um den Release-Faktor mittels einfacher Filtration durch eine Chitin-Säule nach Herstellung des S30-Extraktes aus dem zuvor auf gewöhnliche Weise hergestellten S30-Extrakt selektiv zu eliminieren. Der Affinitätsmarker ermöglicht die Beseitigung von RF1 unter Bedingungen, die die volle Aktivität des S30-Extraktes bewahren, liefert drastisch erhöhte Einbauraten von schwierigen nAS an schwierigen Stellen, unterdrückt die Produktion von verkürztem Protein und ermöglicht den nAS-Einbau an mehreren Positionen einer Proteinkette. Praktischerweise ist der modifizierte *E. coli*-Stamm voll kompatibel zur Proteinexpression von pET-Vektoren,<sup>[15]</sup> die in der Strukturbiochemie die häufigst verwendeten Vektoren zur Proteinherstellung sind.

Die Ausbeuten an Wildtyp-Protein, die mit Chitin-behandelten (S30<sup>RF1-</sup>) und unbehandelten (S30<sup>RF1-CBD</sup>) Extrakten erhalten wurden, waren ununterscheidbar von denen, die mit S30-Extrakten des ursprünglichen BL21-Star-(DE3)-Stammes erhalten wurden (Abbildung S3 in den Hinter-

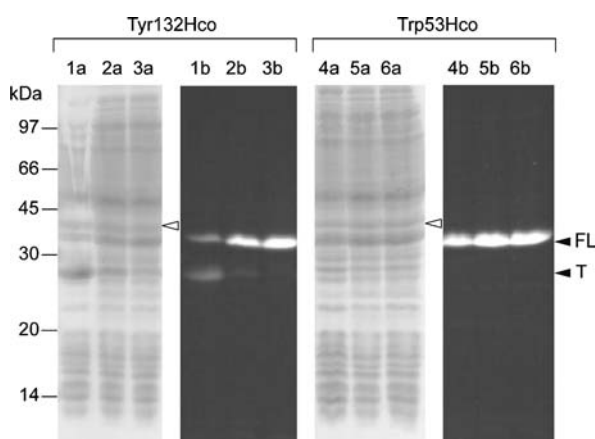
[\*] Dr. K. V. Loscha, A. J. Herlt, Dr. R. Qi, Dr. T. Huber, Dr. K. Ozawa, Prof. G. Otting  
Research School of Chemistry, The Australian National University  
Canberra ACT 0200 (Australien)  
E-Mail: gottfried.otting@anu.edu.au  
Homepage: <http://rsc.anu.edu.au/~go/>

[\*\*] Wir danken Prof. P. G. Schultz für den pEVOL-Vektor zur In-vivo-Expression von Suppressor-tRNA und CouRS-D8, Dr. Siew Pheng Lim für das Expressionssystem für WNVpro, Dr. Takeshi Watanabe für das Plasmid pChBD, Kekini Kuppan für pCNF-RS-Protein, Dr. Hiromasa Yagi und Dr. Isaac Ugwumba für Plasmid-DNA von Amber-Stop-Mutanten von ERp29 und WNVpro, Choy Theng Loh für eines der WNVpro-Konstrukte und ein Expressionssystem der D286R-Mutante von pCNF-RS und Andrew Shafik und Dr. Chris Blake jeweils für Unterstützung mit S30-Präparationen und NMR-Spektroskopie. Diese Arbeit wurde vom Australian Research Council unterstützt, einschließlich einer Future Fellowship für T.H.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201108275> zu finden.

grundinformationen). Zur Bestimmung und Optimierung der Expressionsausbeuten mit nAS ohne Proteinreinigung verwendeten wir das *Mj*tRNA/*Mj*TyrRS-Paar, das zum Einbau der fluoreszierenden nAS L-(7-Hydroxycumarin-4-yl)ethylglycine (Hco) evolviert worden war.<sup>[16]</sup> Die Optimierung wurde mit der West-Nil-Virusprotease NS2B-NS3 (WNVpro) durchgeführt, einem 27-kDa-Protein, das ein etabliertes Zielmolekül zur Medikamentenentwicklung ist.<sup>[17]</sup> Optimierung der Konzentration an Aminoacyl-tRNA-Synthetase (CouRS-D8;<sup>[16]</sup> Abbildung S2) reichte aus, um Expressionsausbeuten von Hco-Mutanten vergleichbar mit Wildtyp-WNVpro zu erhalten (Abbildung S3). Interessanterweise nahmen die Ausbeuten bei zu hohen CouRS-D8-Konzentrationen ab.

Abbildung 1 zeigt einen Vergleich zwischen den Expressionsausbeuten von WNVpro mit Amber-Stopcodons an den



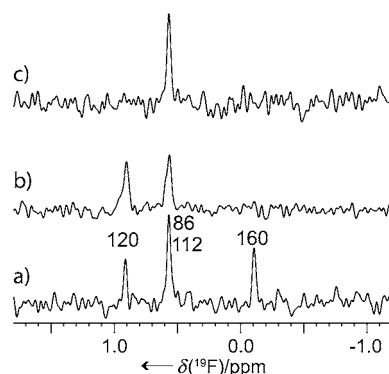
**Abbildung 1.** Zellfreie Expression von Hco-Mutanten von WNVpro. a) und b) zeigen dasselbe SDS-PAGE (15%) -Gel, sichtbar gemacht durch Coomassie-Färbung bzw. als Fluoreszenzbild (UV-Einstrahlung bei 312 nm). Streifen 1–3 (Tyr132Hco) und 4–6 (Trp53Hco): Anwendung von herkömmlichem S30-Extrakt (1 und 4), S30-Extrakt ohne Chitin-Behandlung ( $S30^{RF1-CBD3}$ ; 2 und 5), und S30-Extrakt nach Entfernung von RF1-CBD<sub>3</sub> ( $S30^{RF1-}$ ; 3 und 6). Die Positionen der Banden von WNVpro (1–131) (T), vollständigem WNVpro (FL) und CouRS-D8 (ungefülltes Dreieck) sind markiert.

Positionen 53 und 132 in der Aminosäuresequenz unter Benutzung von herkömmlichen und RF1-reduzierten S30-Extrakten. Während die Mutante WNVpro(Trp53Hco) mit allen S30-Extrakten in hoher Ausbeute exprimiert wurde, produzierte der herkömmliche S30-Extrakt nur wenig von der Mutante WNVpro(Tyr132Hco) und im Wesentlichen gekürztes WNVpro(1–131). Demgegenüber produzierte der  $S30^{RF1-}$ -Extrakt ungefähr 1 mg des vollständigen Proteins pro mL Reaktionsmischung (Abbildung 1, Streifen 3a und 3b). Der Versuch hingegen, WNVpro(Tyr132Hco) *in vivo* unter Verwendung des publizierten pEVOL-Systems<sup>[3]</sup> zu produzieren, ergab nur ungefähr 30 µg Protein pro mL Zellkultur (Abbildung S4). Ähnliche Erhöhungen der Proteinausbeute wurden auch mit anderen Proteinen und Mutanten erhalten (Abbildung S5).

Interessanterweise verbesserte die Verwendung von  $S30^{RF1-CBD}$ -Extrakt allein schon, ohne Behandlung mit Chitin, die Produktion von vollständigem Protein (Abbildung 1).

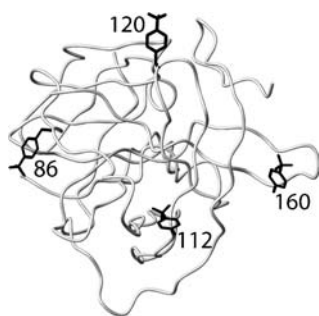
Dieser Effekt scheint von einer Ausfällung von RF1-CBD<sub>3</sub> während der S30-Extraktherstellung her zu rühren, denn Western-Blots des herkömmlichen S30-Extraktes und des  $S30^{RF1-CBD}$ -Extraktes wiesen einen deutlich höheren Gehalt an Release-Faktor im konventionellen S30-Extrakt auf (Abbildung S6).

Die erhöhten Ausbeuten im Einbau von nAS, die mit dem  $S30^{RF1-}$ -Extrakt erhalten werden, erleichtern die Herstellung von Proteinen mit nAS an mehrfachen Positionen in ein und demselben Protein. Diese Eigenschaft ließ sich durch den gleichzeitigen Einbau von 4-Trifluormethylphenylalanin (tfmF) an den Positionen 86, 112, 120 und 160 von WNVpro zeigen. Die Seitenketten aller vier Reste sind in den Kristallstrukturen des Proteins dem Lösungsmittel ausgesetzt.<sup>[18–20]</sup> tfmF wurde mithilfe des Enzyms *p*CNF-RS<sup>[21,22]</sup> eingebaut. Eindimensionale <sup>19</sup>F-NMR-Spektren wiesen drei Signale für die 86/112/120/160-Vierfachmutante auf, wobei das mittlere Signal zweimal stärker war als die äußeren Signale. Die Zuordnung der Resonanzen zu den individuellen tfmF-Resten wurde mit den beiden zusätzlichen Doppelmutanten 86/112 und 86/120 erzielt. Zusammen erlaubten diese drei Proben die Zuordnung der vier tfmF-Signale zu den entsprechenden Resten (Abbildung 2 und 3).



**Abbildung 2.** 1D <sup>19</sup>F-NMR-Spektren von WNVpro mit kombinatorischer tfmF-Markierung. Die Spektren wurden bei 25 °C in einem Puffer von 90 % H<sub>2</sub>O/10 % D<sub>2</sub>O mit 20 mM MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure), pH 6.9, und 1 mM TCEP (Tris(2-Carboxyethyl)phosphon) auf einem Agilent-400-MHz-NMR-Spektrometer mit einem <sup>19</sup>F-Raumtemperaturprobenkopf auf einer äußeren Spule aufgenommen. Das Enzym wurde durch einen 5-fachen Überschuss an *p*-Nitrophenyl-*p*-guanidinbenzoat inhibiert.<sup>[23]</sup> Die Spektren sind relativ zu einer externen Referenz mit freiem tfmF kalibriert. a) Vierfachmutante mit tfmF in den Positionen 86/112/120/160. Die Zuordnungen sind angezeigt. 8 µM Protein, gesamte Aufnahmezeit 4 h. b) Doppelmutante 86/120, 30 µM, 0.5 h. c) Doppelmutante 86/112, 20 µM, 0.5 h.

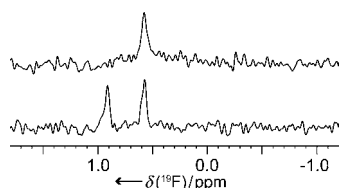
Die Proben der Spektren von Abbildung 2 wurden durch zellfreie Proteinsynthese von linearer mit PCR vervielfältigter DNA erzeugt.<sup>[25]</sup> Die Leichtigkeit, mit der mehrere Amber-Stopcodons in einem Gen an verschiedenen Positionen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) eingefügt werden können, erlaubt kombinatorische Markierungen, indem *N* Proben die Zuordnung von bis zu 2<sup>*N*–1</sup> NMR-Signalen ermöglichen,<sup>[26]</sup> vorausgesetzt dass die Proteinstruktur die gleichzeitige Anwesenheit von 2<sup>(*N*–1)</sup> nAS tole-



**Abbildung 3.** Positionen für den Einbau von tfmF in WNVpro. Die tfmF-Reste wurden auf die Kristallstruktur von WNVpro (PDB ID: 2FP7)<sup>[18]</sup> modelliert. Alle tfmF-Reste liegen mindestens 15 Å vom aktiven Zentrum entfernt. Abbildung erzeugt mit Molmol.<sup>[24]</sup>

riert. Im Fall von WNVpro begann die Probe, die vier tfmF-Reste enthielt, während der Probenvorbereitung und der NMR-Messung auszufallen, wohingegen die Doppelmutanten völlig stabil waren.

tfmF ist eine besonders vielversprechende nAS für Protein-NMR-Spektroskopie, dank der hohen Empfindlichkeit von  $^{19}\text{F}$ -NMR-Messungen, der Abwesenheit von Fluor in Biomakromolekülen und der spezifischen Eigenschaften der Trifluormethylgruppe, die die Beobachtung von  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren für große Proteine in vitro und von Proteinen in lebenden Zellen erlaubt.<sup>[27,28,33]</sup> Im Fall von WNVpro eignet sich das  $^{19}\text{F}$ -Signal von tfmF in der Position 120 zum Nachweis von Ligandenbindung. Abbildung 4 belegt, dass nur das



**Abbildung 4.** 1D  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren der WNVpro(86/120)-Doppelmutante mit (unten) und ohne Inhibitor (oben). Die Spektren wurden bei 25 °C mit 30 µM Proteinlösungen unter denselben Bedingungen wie in Abbildung 2 aufgenommen. Jede Spektrenaufnahme dauerte 0.5 h auf einem 400-MHz-NMR-Spektrometer.

Signal von tfmF86 in der Abwesenheit eines Inhibitors beobachtbar ist, während das Signal von tfmF120 bis zur Unsichtbarkeit verbreitert ist. WNVpro ist bekannt für starke Linienverbreiterungen in großen Teilen des Proteins aufgrund eines Konformationsaustauschs, der sich durch an der Substratbindungsstelle gebundene Inhibitoren unterdrücken lässt.<sup>[17]</sup> Rest 86 liegt in der stabilsten Region des Proteins, was die Unempfindlichkeit der tfmF86-Resonanz gegenüber dem Konformationsaustausch erklärt, während das Erscheinen der tfmF120-Resonanz Inhibitorbindung anzeigt. Das tfmF86-Signal kann somit als Qualitätskontrolle von Protein und Experiment dienen.

Insgesamt offeriert die RF1-Beseitigung von einem *E. coli*-Zellextrakt eine allgemeingültige Lösung für das Problem schlechter Expressionsausbeuten mit nAS. Dies er-

möglicht 1) den Einbau von nAS an Stellen, an denen sich mit gängigen oder In-vivo-Methoden keine nAS einbauen ließen, 2) den nAS-Einbau an mehreren Stellen des Zielproteins ohne irgendwelche Notwendigkeit für orthogonale Ribosomen<sup>[29]</sup> oder stark Gen-modifizierte *E. coli*-Stämme,<sup>[6,13,14]</sup> 3) die Verwendung von Konstrukten ohne C-terminale Marker zur Proteinreinigung dank der Unterdrückung von verkürzten Produkten und 4) die Produktion von Proteinen mit nAS, die sich nur schwierig einbauen lassen. Hco z.B. zählt zu den nAS, die sich am wenigsten leicht einbauen lassen.<sup>[3]</sup> Dies erklärt zum Teil die Seltenheit experimenteller Arbeiten (< 10), die den erfolgreichen Einbau von Hco in Proteine beschreiben, trotz des enormen Potentials dieser nAS und ihrer Veröffentlichung vor über fünf Jahren.<sup>[16]</sup>

Aus vielen Gründen eignet sich zellfreie Proteinsynthese besonders zum Einbau von nAS. Die Vorteile umfassen den einfachen Einbau von Amber-Stopcodons, da die Proteine von linearer mit PCR vervielfältigter DNA hergestellt werden können, sparsame Verwendung von nAS<sup>[30,31]</sup> und einfache Optimierung der Konzentrationen der verschiedenen Reagentien im Hinblick auf maximale Ausbeuten. Kontinuierliche zellfreie Austauschsysteme sind besonders gut geeignet zur Herstellung der kleinen Mengen an doppelmarkiertem Protein, die für Abstandsmessungen mit EPR-Spektroskopie benötigt werden.<sup>[32]</sup> Die einfache Herstellung von Amber-Mutanten mithilfe von PCR ermöglicht ebenfalls kombinatorische Proteinmarkierungen mit mehreren tfmF-Resten für  $^{19}\text{F}$ -NMR-Resonanzzuordnungen mit der kleinstmöglichen Zahl an Proben (siehe oben). Derartige Proben sind äußerst attraktiv zur Suche von spezifisch bindenden Liganden in Verbindungsbibliotheken. Ein hoher Durchsatz ließe sich mit einem speziellen  $^{19}\text{F}$ -Probenkopf<sup>[33]</sup> erzielen.

## Experimenteller Abschnitt

**Materialien:** Der *E. coli*-Stamm BL21-Star-(DE3) (Invitrogen) wurde genetisch zu BL21-Star-(DE3)::RF1-CBD<sub>3</sub> modifiziert zur Herstellung der S30-Extrakte S30<sup>RF1-CBD</sup> und S30<sup>RF1-</sup> (siehe Hintergrundinformationen). Der herkömmliche S30-Extrakt wurde mit BL21-Star-(DE3) hergestellt.<sup>[34]</sup> CouRS-D8 und pCNF-RS wurden in den pETMCSIII-Vektor mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Marker<sup>[35]</sup> kloniert und hergestellt wie in den Hintergrundinformationen beschrieben. Gesamt-tRNA, die optimierte Suppressor-tRNA enthielt, wurde auf anderweitig beschriebenem Weg hergestellt.<sup>[36]</sup> Hco wurde wie beschrieben synthetisiert.<sup>[37]</sup> tfmF und 4-Nitrophenyl-4-guanidinbenzoat wurden jeweils bei PepTech und Sigma Aldrich gekauft.

**Zellfreie Proteinsynthese:** die zellfreien Reaktionen wurden in 14 h bei 30 °C mit kontinuierlichem Austausch durchgeführt wie beschrieben.<sup>[25,34,38]</sup> Die Endkonzentrationen waren 0.263 mg mL<sup>-1</sup> Gesamt-tRNA mit optimierter Suppressor-tRNA<sup>[3]</sup> im inneren Puffer, 1 mM nAS (innerer und äußerer Puffer) und entweder 0.14 mg mL<sup>-1</sup> CouRS-D8 oder 0.84 mg mL<sup>-1</sup> pCNF-RS im inneren Puffer für die Experimente mit Hco bzw. tfmF. Die Reaktionsvolumina waren 0.2 mL (innerer Puffer) und 2 mL (äußerer Puffer) für den Einbau von Hco in verschiedene Amber-Mutanten. Alle NMR-Proben mit mehrfach tfmF-markiertem WNVpro wurden mit 1.2 mL innerem Puffer und 12 mL äußerem Puffer hergestellt. Wildtyp-WNVpro<sup>[39]</sup> und Amber-Mutanten von WNVpro und Sortase A wurden von linearen mit PCR vervielfältigten DNA-Templaten hergestellt.<sup>[25]</sup> WNVpro(Trp53Hco),<sup>[36]</sup> WNVpro(Tyr132Hco),<sup>[36]</sup> WNVpro(His87Hco) und ERp29(Gly147Hco) wurden von Plasmid-DNA exprimiert. Alle Gene waren unter Kontrolle des T7-Promoters. Die

Identitäten von WNVpro(Tyr132Hco), der tfmF-Doppelmutanten von WNVpro und von WNVpro(1–131) wurden durch Massenspektrometrie bestätigt (Abbildungen S7 und S8). Die Ausbeuten an aufgereinigten Proteinen mit Hco wurden durch Quantifizierung der Bandenintensitäten mit dem Programm ImageJ<sup>[40]</sup> bestimmt, sowohl in den Fluoreszenzaufnahmen als auch in den Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gelen, und mit der bekannten Konzentration an Carbonischer Anhydrase (30 kDa) im Streifen der niedermolekularen Markerproteine verglichen (Tabelle S3).

Herstellung der NMR-Proben: die drei WNVpro-Mutanten mit tfmF an mehrfachen Positionen wurden mit C-terminalen His<sub>6</sub>-Markern zur Reinigung über Ni-NTA-Spinsäulen (Nalge Nunc International, USA) hergestellt. Die eluierten Proteine wurden mit NMR-Puffer (20 mM MES, pH 6.9, 1 mM TCEP in 90 % H<sub>2</sub>O/10 % D<sub>2</sub>O) gewaschen und auf ein Endvolumen von 0.5 mL mittels Ultrafiltration mit Amicon-Zentrifugalfiltern (10000 MWCO) eingeengt. Die Proteinkonzentrationen der NMR-Proben wurden durch UV-Absorption bestimmt ( $\epsilon_{280} = 55.920 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Eingegangen am 24. November 2011

Online veröffentlicht am 1. Februar 2012

**Stichwörter:** Nichtnatürliche Aminosäuren · NMR-Spektroskopie · Proteinmodifikationen · Terminationsfaktor RF1 · Zellfreie Proteinsynthese

- [1] C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 413–444.
- [2] S. E. Cellitti, D. H. Jones, L. Lagapacan, X. Hao, Q. Zhang, H. Hu, S. M. Brittain, A. Brinker, J. Caldwell, B. Bursulaya, G. Spraggon, A. Brock, Y. Ryu, T. Uno, P. G. Schultz, B. H. Geierstanger, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9268–9281.
- [3] T. S. Young, I. Ahmad, J. A. Yin, P. G. Schultz, *J. Mol. Biol.* **2010**, *395*, 361–374.
- [4] J. H. Mills, H. S. Lee, C. C. Liu, J. Wang, P. G. Schultz, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2162–2164.
- [5] H.-S. Park, M. J. Hohn, T. Umehara, L.-T. Guo, E. M. Osborne, J. Benner, C. J. Noren, J. Rinehart, D. Söll, *Science* **2011**, *333*, 1151–1154.
- [6] D. B. F. Johnson, J. Xu, Z. Shen, J. K. Takimoto, M. D. Schultz, R. J. Schmitz, Z. Xiang, J. R. Ecker, S. P. Briggs, L. Wang, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 779–786.
- [7] Y. Shimizu, A. Inoue, Y. Tomari, T. Suzuki, T. Yokagawa, K. Nishikawa, T. Ueda, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 751–755.
- [8] D. E. Agafonov, Y. Huang, M. Grote, M. Sprinzl, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 2156–2160.
- [9] M. Gerrits, J. Strey, I. Claußnitzer, U. von Groll, F. Schäfer, M. Rimmele, W. Stiege in *Cell-Free Protein Expression* (Hrsg.: W. A. Kudlicki, F. Katzen, R. P. Bennett), Landes Bioscience, Austin, **2007**, S. 166–180.
- [10] S. Sando, A. Ogawa, T. Nishi, M. Hayami, Y. Aoyama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1216–1220.
- [11] G. F. Short III, S. Y. Golovine, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1999**, *38*, 8808–8819.
- [12] Y. Huang, W. K. Russell, W. Wan, P.-J. Pai, D. H. Russell, W. Liu, *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 683–686.
- [13] T. Mukai, A. Hayashi, F. Iraha, A. Sato, K. Ohtake, S. Yokoyama, K. Sakamoto, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 8188–8195.
- [14] F. J. Isaacs, P. A. Carr, H. H. Wang, M. J. Lajoie, B. Sterling, L. Kraal, A. Tolonen, T. Gianoulis, D. Goodman, N. B. Reppas, C. J. Emig, D. Bang, S. J. Hwang, M. C. Jewett, J. M. Jacobson, G. M. Church, *Science* **2011**, *333*, 348–353.
- [15] F. W. Studier, B. A. Moffat, *J. Mol. Biol.* **1986**, *189*, 113–130.
- [16] J. Wang, J. Xie, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8738–8739.
- [17] X. C. Su, K. Ozawa, R. Qi, S. G. Vasudevan, S. P. Lim, G. Otting, *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2009**, *3*, e561.
- [18] P. Erbel, N. Schiering, A. D'Arcy, M. Renatus, M. Kroemer, S. P. Lim, Z. Yin, T. H. Keller, S. G. Vasudevan, U. Hommel, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 372–373.
- [19] A. E. Aleshin, S. A. Shiryayev, A. Y. Strongin, R. C. Liddington, *Protein Sci.* **2007**, *16*, 795–806.
- [20] G. Robin, K. Chappell, M. J. Stoermer, S. Hu, P. R. Young, D. P. Fairlie, J. L. Martin, *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 1568–1577.
- [21] D. D. Young, T. S. Young, M. Jahnz, I. Ahmad, G. Spraggon, P. G. Schultz, *Biochemistry* **2011**, *50*, 1894–1900.
- [22] K. C. Schultz, L. Supekova, Y. Ryu, J. Xie, R. Perera, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13984–13985.
- [23] D. Ekonomiuk, X.-C. Su, K. Ozawa, C. Bodenreider, S. P. Lim, G. Otting, D. Huang, A. Caflisch, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4860–4868.
- [24] R. Koradi, M. Billeter, K. Wüthrich, *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 51–55.
- [25] P. S. C. Wu, K. Ozawa, S. P. Lim, S. Vasudevan, N. E. Dixon, G. Otting, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3420–3422; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3356–3358.
- [26] P. S. C. Wu, K. Ozawa, S. Jergic, X.-C. Su, N. E. Dixon, G. Otting, *J. Biomol. NMR* **2006**, *34*, 13–21.
- [27] J. C. Jackson, J. T. Hammill, R. A. Mehl, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1160–1166.
- [28] P. Shi, H. Wang, Z. Xi, C. Shi, Y. Xiong, C. Tian, *Protein Sci.* **2011**, *20*, 224–228.
- [29] K. Wang, H. Neumann, S. Y. Peak-Chew, J. W. Chin, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 770–777.
- [30] R. Goerke, J. R. Swartz, *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102*, 400–416.
- [31] M. Kainosho, P. Güntert, *Q. Rev. Biophys.* **2009**, *42*, 247–300.
- [32] M. R. Fleissner, E. M. Brustad, T. Kalai, C. Altenbach, D. Cascio, F. B. Peters, K. Hideg, S. Peuker, P. G. Schultz, W. L. Hubbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 21637–21642.
- [33] C. Li, G.-F. Wang, Y. Wang, R. Creager-Allen, E. A. Lutz, H. Scronce, K. M. Slade, R. A. S. Ruf, R. A. Mehl, G. J. Pielak, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 321–327.
- [34] M. A. Apponyi, K. Ozawa, N. E. Dixon, G. Otting, *Methods Mol. Biol.* **2008**, *426*, 257–268.
- [35] C. Neylon, S. E. Brown, A. V. Kralicek, C. S. Miles, C. A. Love, N. E. Dixon, *Biochemistry* **2000**, *39*, 11989–11999.
- [36] I. N. Ugwumba, K. Ozawa, L. de La Cruz, Z.-Q. Xu, A. J. Herlt, K. S. Hadler, C. Coppin, S. E. Brown, G. Schenk, J. G. Oakeshott, G. Otting, *Assay Drug Dev. Technol.* **2011**, *9*, 50–57.
- [37] I. N. Ugwumba, K. Ozawa, Z.-Q. Xu, F. Ely, J.-L. Foo, A. J. Herlt, C. Coppin, S. Brown, M. C. Taylor, D. L. Ollis, L. N. Mander, G. Schenk, N. E. Dixon, G. Otting, J. G. Oakeshott, C. J. Jackson, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 326–333.
- [38] K. Ozawa, M. J. Headlam, P. M. Schaeffer, B. R. Henderson, N. E. Dixon, G. Otting, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 4084–4093.
- [39] T. H. D. Nguyen, K. Ozawa, M. Stanton-Cook, R. Barrow, T. Huber, G. Otting, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 718–720; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 692–694.
- [40] M. D. Abràmoff, P. J. Magalhães, S. J. Ram, *Biophotonics Int.* **2004**, *11*, 36–42.