

Die Umprogrammierung des genetischen Codes: vom Triplet- zum Quadrupletcode

Kaihang Wang, Wolfgang H. Schmied und Jason W. Chin*

Aminosäuren · Codons · Genexpression ·
Protein-Design · Ribosom

Der genetische Code lebender Zellen ist nahezu universell ein Tripletcode. Zelluläre Ribosomen so zu verändern, dass sie auch andere als Tripletcodes ablesen können, stellt eine große Herausforderung dar, da viele ribosomale Mutationen letal sind. In diesem Kurzaufsatz diskutieren wir den Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren in Proteine durch Ablesen von Quadrupletcodons sowie die Entwicklung eines orthogonalen Translationssystems in der Zelle, das sich eines evolvierten orthogonalen Ribosoms bedient, um durch Ablesen von Quadrupletcodons in effizienter Weise den Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren in Proteine zu dirigieren. Durch Verwendung dieses Systems gelang der Einbau von multiplen nichtnatürlichen Aminosäuren, um rekombinante Proteine auf genetischem Wege mit emergenten Eigenschaften auszustatten. Die Ausweitung dieses Ansatzes könnte die kombinatorische Biosynthese von Materialien und Therapeutika möglich machen und darüber hinaus die Erforschung der Frage ansprechen, ob sich Lebensformen mit zusätzlichen genetisch codierten Polymeren entwickeln könnten, die Aufgaben erfüllen, die natürliche biologische Systeme nicht ausführen.

1. Einführung

Der genetische Code beschreibt die Regeln, nach denen Dreierfolgen der vier Nucleobasen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T) (Tripletcodons) in die 20 natürlichen proteinogenen Aminosäuren übersetzt werden.^[1–6] Der Code wird durch die zelluläre Translationsmaschinerie umgesetzt, die die Abfolge nichtüberlappender Codons in eine Boten-RNA (mRNA) decodiert, um Proteine definierter Länge, Aminosäurezusammensetzung und Sequenz zu erzeugen.

Der Translationsapparat ist so modifiziert worden, dass nichtnatürliche Aminosäuren in vitro,^[7–10] in Bakterien- und Eukaryotenzellen^[11,12] und in einem Tier^[13] ortsspezifisch in Proteine eingebaut werden konnten. Es war ebenfalls möglich – mithilfe aminoacylierter tRNAs –, mehrere nichtna-

türliche Aminosäuren durch In-vitro-Translationsreaktionen einzubauen.^[14–16]

In diesem Kurzaufsatz beschreiben wir Änderungen am Translationsapparat, die es erlauben, Quadrupletcodons zu decodieren und als definierte Insertionssignale zur Codierung des Einbaus nichtnatürlicher Aminosäuren in Proteine zu nutzen.

Wir beschreiben den Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren in Reaktion auf Quadrupletcodons mithilfe von tRNAs mit erweiterten Anticodons. Wir beschreiben die Entwicklung eines orthogonalen Translationsweges, der die Evolution eines orthogonalen Ribosoms im Labor ermöglicht, sowie die Evolution eines orthogonalen Ribosoms für die effiziente Decodierung von Quadrupletcodons mithilfe von tRNAs mit erweiterten Anticodons. Wir beschreiben den Einbau multipler nichtnatürlicher Aminosäuren in rekombinante Proteine über einen orthogonalen Translationsweg, der sich aus der modularen Kombination evolvierter orthogonaler Ribosomen, orthogonaler mRNA, orthogonaler Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und tRNAs zusammensetzt, und die Verwendung dieses Translationsweges zur gezielten Programmierung emergenter Eigenschaften in rekombinanten Proteinen. Schließlich beschreiben wir Experimente, die auf ein Überwinden der natürlichen evolutionären Beschränkung orthogonaler Synthetase/tRNA-Paare abzielen und geben Anregungen für zukünftige Richtungen.

[*] Dr. K. Wang, Mag. W. H. Schmied, Dr. J. W. Chin
Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology
Hills Rd, Cambridge, CB20QH (Großbritannien)
E-Mail: chin@mrc-lmb.cam.ac.uk

2. Proteintranslation

Die Proteinsynthese durch Translation („Proteintranslation“) vollzieht sich am Ribosom, einer 2.5 MDa großen molekularen Maschine, die aus drei großen ribosomalen RNAs (rRNAs) und mehr als 50 Proteinen besteht, die sich auf eine große und eine kleine Untereinheit verteilen. Die Translation erfolgt in vier Schritten: Initiation, Elongation, Termination und Rückführung.^[17,18]

In *E. coli* wird die Translation initiiert, wenn sich ein Komplex der Initiationsfaktoren IF1 und IF3 (IF1/3) und der kleinen Untereinheit des Ribosoms an zelluläre mRNAs anlagert.^[19–21] Diese Interaktion ist für die Proteinsynthese geschwindigkeitsbestimmend. Sie wird vermittelt durch die Basenpaarung zwischen der 16S-rRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit und der Shine-Dalgarno-Sequenz (AGGAGG), die 7 bis 12 Basen strangaufwärts eines AUG-Startcodons auf der mRNA liegt.^[22,23] Durch diese Wechselwirkung wird das AUG-Codon an die P-Stelle des Ribosoms positioniert. Der Komplex aus IF1/3, der kleinen Untereinheit und der mRNA rekrutiert dann nacheinander die aminoacylierte Initiator-tRNA und die große Untereinheit des Ribosoms, was zu einem vollständigen Ribosom führt, das nun für die translatorische Elongation bereit ist.

Die Genauigkeit der Proteintranslation in der Elongationsphase der Proteinsynthese wird hauptsächlich durch zwei Prozesse festgelegt: 1) die Aminoacylierung einer tRNA mit der richtigen Aminosäure durch eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase^[24,25] und die Anlieferung der aminoacylierten tRNA (AA-tRNA) an das Ribosom;^[26] 2) die Decodierung der mRNA durch das Ribosom und die nachfolgende Translokation von tRNA/mRNA-Komplexen mittels kognater Codon-Anticodon-Wechselwirkungen,^[27–30] um die richtige Aminosäure in Reaktion auf ein spezifisches Codon der mRNA in die naszierende Polypeptidkette einzubauen (Abbildung 1).

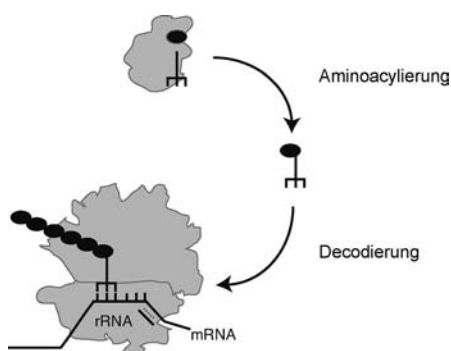


Abbildung 1. Aminoacylierung und Decodierung sind für die Genauigkeit der Translation entscheidend. Aminosäuren (schwarze Ovale), tRNAs (schwarze Dreizacke). mRNA = Boten-RNA, rRNA = ribosomale RNA.

In der Elongationsphase der Translation wird eine aminoacylierte tRNA vom Elongationsfaktor EF-Tu/GTP zum Decodierungszentrum des Ribosoms, der A-Stelle, gebracht. Die sich an der A-Stelle bildende Helix aus tRNA



Kaihang Wang studierte an der Peking University und am University College London und promovierte bei Jason Chin am Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology (MRC-LMB) der Cambridge University. Er war Junior Research Fellow am Trinity College in Cambridge und ist gegenwärtig Career Development Fellow am MRC-LMB.



Wolfgang Schmied studierte Molekularbiologie an der Universität Wien und diplomierte dort 2010 bei Dr. Thomas Marlovits am Institut für molekulare Biotechnologie (IMBA) mit einer Arbeit zum Typ-III-Sekretionssystem. Zurzeit ist der Doktorand in der Arbeitsgruppe von Jason Chin, wo er über die molekulare Biotechnologie des Translationsapparates forscht.



Jason Chin studierte in Oxford und promovierte bei Alanna Scheparts in Yale. Anschließend absolvierte er ein Postdoktorat bei Peter Schultz am Scripps. Gegenwärtig ist er Direktor und Abteilungsleiter am Centre for Chemical and Synthetic Biology am Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology an der University of Cambridge und hält einen Lehrstuhl an der University of Cambridge sowie am Trinity College.

(Anticodon) und mRNA (Codon) wird vom Ribosom aktiv überwacht, um nichtkognate Wechselwirkungen auszuschließen und die Genauigkeit des genetischen Codes aufrechtzuerhalten.^[27] Mehrere Nucleotide (1492, 1493, 530) der 16S-rRNA gehen Wechselwirkungen mit den ersten beiden Nucleotiden des Codon-Anticodon-Paares ein und gewährleisten so durch Ausschluss nichtkognater und Wobble-Paare eine strikte Watson-Crick-Basenpaarung. An die dritte Base des Codon-Anticodon-Paares schmiegt sich das Ribosom weniger eng an, was eine molekulare Erklärung für die Tatsache liefert, dass Wobble-Paarung an den beiden ersten Positionen des Codons ausgeschlossen ist, an der dritten Base aber erlaubt.^[27] Kognate tRNA:mRNA-Interaktionen vermitteln die Hydrolyse des GTP durch EF-Tu und die Entlassung des aminoacylierten tRNA-Akzeptorstamms an die A-Stelle im Peptidyltransferasezentrum der großen Untereinheit des Ribosoms zur Bildung der Peptidbindung. Nach Bildung der Peptidbindung wird der Peptidyl-tRNA:mRNA-Komplex durch EF-G/GTP um drei Basen transloziert, sodass ein neues Codon in der A-Stelle für die nächste Elongationsrunde positioniert wird.^[17,18,31]

Die Proteintranslation bricht am Ende der Elongationsphase ab, wenn eines der drei Stoppcodons erreicht wird. Die Termination der Proteinsynthese wird durch Freisetzungsfaktoren vermittelt, die an das Ribosom binden, sobald das

Stoppcodon (UAA, UAG, UGA) des translatierten codierenden Bereichs der mRNA in der A-Stelle des Ribosoms angekommen ist. Der gebundene Freisetzungsfaktor löst die hydrolytische Abspaltung der naszierenden Polypeptidkette von der in der P-Stelle gebundenen tRNA aus, und das Ribosom wird von der Zelle für weitere Translationsvorgänge rezykliert. Detaillierte Beschreibungen der Proteintranslation finden sich in der Literatur.^[17,18,28]

3. Umprogrammierung der Proteintranslation: Herausforderungen und Möglichkeiten

Bei der zellulären Translation am Ribosom entstehen normalerweise Proteine, die sich aus den 20 natürlichen proteinogenen Aminosäuren zusammensetzen. Dieser Vorgang stellt zugleich die ultimative Blaupause für die codierte und evolvierbare Synthese von Proteinen mit zusätzlichen Aminosäuren und letztendlich auch von vollständig nicht-natürlichen Polymeren dar. Das Ribosom benutzt tRNA-Adaptermoleküle, und deshalb sind die Polymere, die es produziert, chemisch unabhängig von der Matrize. Dieser Umstand sollte die Herstellung individuell ausgeprägter Polymere ermöglichen, ohne dass es zu einer wechselseitigen Beeinträchtigung des Codierungsvorgangs kommt. Das Ribosom benutzt einen einzelnen Satz an aktiven Zentren für die Bindungsbildung und koppelt diese an eine translozierende Aktivität, wodurch es sehr lange Polymere mit sehr hoher Genauigkeit erzeugen kann.

Eine genetische Codierung nichtnatürlicher Aminosäuren für den Einbau in Proteine ist mit mehreren Herausforderungen verbunden. Erstens benötigt man neuartige Codons, die den Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren an spezifischen Stellen eines Proteins vermitteln. Da die 64 Tripletcodons im Genom der meisten Lebewesen bereits zur Codierung der natürlicher Proteine genutzt werden, muss man zur Codierung nichtnatürlicher Aminosäuren offenbar auf zusätzliche Codons (z.B. Quadruplettcodons) zurückgreifen. Zweitens benötigt man neue Aminoacyl-tRNA-Synthetase/tRNA-Paare, die orthogonal zu den Aminoacyl-tRNA-Synthetase/tRNA-Paaren des Wirtorganismus sind und spezifisch den Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren in Reaktion auf ein spezifisches Codon auslösen. Drittens ist die zelluläre Proteintranslation auf α -L-Aminosäuren und deren eng verwandte Analoga beschränkt, sodass Änderungen am Ribosom und möglicherweise anderen Komponenten des Translationsapparates notwendig sind, um die chemische Bandbreite der Translation zu erweitern.

4. Nichtkanonische Decodierung zellulärer mRNAs

4.1. Leserasterverschiebung und Hopping

Obwohl der genetische Code praktisch universell konserviert ist, gibt es immer mehr Studien zu Polypeptiden, die nicht unmittelbar mit demjenigen Produkt korrelieren, das man aus der reiterativen Decodierung nichtüberlappender Triplets zwischen dem Start- und dem Stoppcodon in einer

mRNA erwarten würde.^[32–34] Solche mRNAs können zusätzliche Basen oder Deletionen im Vergleich zu einem hypothetischen „kanonischen Gen“ aufweisen, von dem man erwarten würde, dass es für das von ihm erzeugte Protein codiert. Man sagt, dass Sequenzen, die eine zusätzliche Base im kanonischen Gen enthalten, eine Leserasterverschiebung um +1 aufweisen und ein „Quadruplettcodon“ im Leseraster anlegen. Sequenzen, die im Vergleich zum kanonischen Gen eine Deletion aufweisen, enthalten entsprechend eine Leserasterverschiebung um –1. Längere Insertionen von bis zu 50 Basen oder mehr im Vergleich zum kanonischen Gen können bei der Translation durch einen als Hopping bezeichneten Vorgang übersprungen werden.^[35–38]

Leserasterverschiebung (der Vorgang der Decodierung eines Quadruplettcodons zur Wiederherstellung des im kanonischen Gen vorliegenden Leserasters) und Hopping erreichen mit dem normalen Satz von tRNAs nur dann ein nennenswertes Niveau, wenn die mRNA Strukturelemente enthält, die ein Anhalten der Translation verursachen.^[33] Zu den Strukturelementen, von denen man weiß, dass sie die Translation anhalten und eine nichtkanonische Decodierung vermitteln, gehören ungewöhnliche mRNA-Strukturen,^[39–41] strangaufwärts gelegene Shine-Dalgarno-artige Sequenzen^[35,42] sowie wenig genutzte Codons, deren kognate tRNAs nur in geringen Mengen vorkommen.^[43] Leserasterverschiebung und Hopping können genutzt werden, um die Aminosäuresequenz eines gebildeten Proteins zu regulieren,^[44] um das Verhältnis zweier in alternierenden Leserastern gebildeten Proteinen zu steuern und um die Menge eines Proteins durch Rückkopplungsmechanismen zu steuern.^[45,46]

4.2. Decodierung von Quadruplettcodons durch tRNAs mit erweitertem Anticodon

Zu den bekannten Suppressoren von Quadruplettcodons gehören natürliche tRNAs mit erweiterten Anticodonschlaufen. Prolyl- und glycylspezifische tRNAs mit erweiterten Anticodons wurden als Suppressoren von +1-Leserasterverschiebungen in *Salmonella typhimurium* identifiziert.^[47–49] In der Folge konnten Quadruplettcodons suppressierende tRNAs mit erweiterten Anticodons auch in *E. coli* und *S. cerevisiae* nachgewiesen werden.^[50–52] Moore und Mitarbeiter untersuchten tRNAs mit erweiterten Anticodons, die sich von der tRNA^{Leu}_{CAA} aus *E. coli* ableiteten, und entdeckten, dass die tRNA^{Leu}_{UCUA} aus *E. coli* in effizienter Weise UAGA-Codons decodiert.^[50] Magliery et al. untersuchten die Herstellung eines Satzes von funktionell erweiterten Anticodon/Quadruplettcodon-Paaren in *E. coli*.^[51,52] Die Autoren gingen von einer tRNA_{2^{Ser}} aus und mutierten die Anticodonschleife, die normalerweise sieben Nucleotide umfasst, um eine Bibliothek aller möglichen tRNAs mit acht oder neun Nucleotide enthaltenden Anticodonschlaufen aufzubauen. Anschließend wurden die erweiterten Anticodon-tRNA-Bibliotheken mit einer Bibliothek aller möglichen Quadruplettcodons an einer einzelnen Stelle eines Antibiotikaresistenzgens von *E. coli* kombiniert. Aus dieser Bibliothek wurden diejenigen tRNAs mit erweiterten Anticodons selektiert, die die Suppression der Leserasterverschiebung

vermittelten und die Antibiotikumresistenz wiederherstellen. Mithilfe dieses Ansatz wurden Varianten der tRNA_{2^{Ser}} mit erweiterten Anticodons entdeckt, die die Codons AGGA, UAGA, CCCU und CUAG decodieren. Diese Codons entsprechen den am wenigsten verwendeten Codons mit zusätzlicher Base in *E. coli*. In Säugerzellen wurden Varianten der menschlichen tRNA^{Tyr} mit erweiterten NCUA-Anticodons gefunden, die erweiterte UAGN-Codons im Gen des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) decodieren, was zu einer Fluoreszenz führte, die fluoreszenzmikroskopisch charakterisiert wurde.^[53] In ähnlicher Weise wurde eine tRNA^{Tyr}-Variante mit einem AUAG-Anticodon beschrieben, die ein CUAU-Codon decodiert.

4.3. Codierung nichtnatürlicher Aminosäuren an Quadruplettcodons

Es hat zahlreiche Bemühungen gegeben, Quadruplettcodons zur Codierung nichtnatürlicher Aminosäuren einzusetzen. Bei diesen Versuchen, die sich auf vorhergehende Arbeiten mit Amber-Suppressoren stützten,^[8,54] wurden in erster Linie aminoacylierte tRNAs mit erweiterten Anticodons in In-vitro-Translationssystemen eingesetzt.^[55–57] Weiterführende Ansätze beruhten auf der Mikroinjektion von aminoacylierten tRNAs mit erweiterten Anticodons in *Xenopus*-Oozyten.^[58–60] Bei dieser Vorgehensweise wird die tRNA vor der Zugabe zum Translationsgemisch aminoacyliert. Um außerdem zu verhindern, dass desacylierte tRNA (die sich im Verlauf der Translation akkumuliert) durch im Extrakt oder der Oozyte enthaltene Aminoacyl-tRNA-Synthetasen mit natürlichen Aminosäuren reacyliert werden, muss die tRNA orthogonal sein.

Hohsaka, Sisido und Mitarbeiter verwendeten Varianten der Hefe-tRNA^{Phe} mit veränderten Anticodons (tRNAs_{NCCU} (tRNA_{ACCU}, tRNA_{UCCU}, tRNA_{CCCU} und tRNA_{GCCU}), um nichtnatürliche Aminosäuren in Proteine eines *E.-coli*-S30-Extrakts einzubauen. Sie ersetzen das Tyr83-UAU-Codon der Streptavidin-mRNA durch AGGN und konnten in vitro den Einbau einer nichtnatürlichen Aminosäure in Reaktion auf Quadruplettcodons nachweisen.^[57] In der Folge gelang der Einbau mehrerer nichtnatürlicher Aminosäuren durch verschiedene Quadruplettcodons, darunter AGGU, CGGU, CGCU, CGAU, CCCU, CUCU, CUAU, GGGU und deren Varianten in der vierten Base.^[61–63] Die In-vitro-Translation mit Quadruplettcodons wurde von *E.-coli*-Extrakten auf Insektenzellextrakte^[64,65] und Kaninchen-Retikulozytenextrakte^[66] ausgedehnt. Des Weiteren wurden In-vitro-Selektionsexperimente mit Vierbasencodons als Teil einer auf mRNA-Display basierenden Strategie durchgeführt.^[67] Zwei^[68] oder drei^[69] spezifische nichtnatürliche Aminosäuren wurden mithilfe spezifischer Quadruplettcodons und ihrer kognaten aminoacylierten tRNAs eingebaut, und dieser Ansatz wurde verwendet, um zwei BODIPY-Fluorophore ortsspezifisch in Calmodulin einzubauen, um Abstandsmessungen mittels resonantem Förster-Energietransfer (FRET) durchführen zu können.^[70]

Aufbauend auf Arbeiten zur Mikroinjektion aminoacylierter Amber-Suppressor-tRNAs^[58] wurde der Einsatz von

Quadruplettcodons und tRNAs mit erweiterten Anticodons in *Xenopus*-Oozyten untersucht.^[71] Dougherty und Mitarbeiter injizierten aminoacylierte tRNA_{CCCG} und tRNA_{ACCC} (abgeleitet von Hefe-tRNA^{Phe}) zusammen mit mRNA des nicotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR) mit den Quadruplettcodons CGGG und GGGU in *Xenopus*-Oozyten und konnten (durch elektrophysiologische Messungen am Rezeptor) den ortsspezifischen Einbau zweier nichtnatürlicher Aminosäuren nachweisen.^[72] Schultz und Mitarbeiter demonstrierten die Verwendung eines für Homoglutamin codierenden Quadruplettcodons anhand einer Variante des Lysyl-tRNA-Synthetase/tRNA-Paares in *E. coli*.^[73] Dieses System wurde in Verbindung mit einer Variante des *Mj*TyrRS/tRNA_{CUA}-Paares (*Mj*TyrRS = Tyrosyl-tRNA-Synthetase aus *Methanococcus jannaschii*) eingesetzt, die in Reaktion auf das Amber-Codon den Einbau von *O*-Methyl-L-tyrosin dirigiert.^[74]

4.4. Mechanismen der Quadruplettdecodierung

Die Decodierung von Quadruplettcodons durch tRNAs mit erweiterten Anticodons ist experimentell gut etabliert. Der molekulare Mechanismus dieses Vorgangs ist allerdings nicht gut verstanden, obwohl offenbar in den meisten Fällen ein Watson-Crick- oder ein Wobble-Basenpaar an der vierten Base des Codons und Anticodons erforderlich ist. Tatsächlich scheint es so zu sein, dass je nach mRNA und tRNA unterschiedliche Mechanismen auftreten.

Der konzeptionell einfachste Mechanismus besteht wohl in der Bindung aller vier Basen des Quadruplettcodons an das Anticodon in der A-Stelle des Ribosoms mit anschließender Translokation des Quadrupletts. Allerdings könnte der Gesamtvorgang der Quadruplettdecodierung auch durch andere Kombinationen von nichtkanonischen Codon-Anticodon-Wechselwirkungen, nichtkanonische Translokationsschrittweiten und tRNA-Slipping erklärt werden.^[34] Die eintretende Aminoacyl-tRNA könnte an ein Codon binden, das größer oder kleiner als das normale Triplet ist, oder sie könnte rasterschoben binden. Die Schrittweite der Translokation könnte vom normalen Dreibasenschritt abweichen, und die translozierte Peptidyl-tRNA könnte auf der mRNA verrutschen oder außerhalb des Leserasters eine neue Basenpaarung eingehen.^[75] Zwei Grenzmodelle wurden beschrieben, die im Einklang mit den experimentellen Befunden für bestimmte tRNA-Codonpaare sind: das Zollstock-Modell, demzufolge Triplet- oder Quadruplett-Wechselwirkungen zwischen dem Codon und dem Anticodon in der A-Stelle des Ribosoms mit anschließender Translokation des Quadrupletts auftreten,^[76–78] und das Slippery-Modell, demzufolge eine Triplet-Wechselwirkung in der A-Stelle und eine Triplet-Translokation auftreten, gefolgt von einem Verrutschen der mRNA um eine Base.^[79]

5. Einbau multipler nichtnatürlicher Aminosäuren in Proteine durch orthogonale Translation

5.1. Orthogonale Translation

Obschon eine große Zahl von Quadruplettcodons durch tRNAs mit erweitertem Anticodon auf dem natürlichen Ribosom abgelesen werden können, ist die Decodierung dieser tRNAs ineffizient. Erweiterte Anticodons passen womöglich nur schlecht in das Ribosom, und Versuche, die Effizienz der Quadruplettdecodierung durch tRNAs mit erweiterten Anticodons zu verbessern, können zur Fehlsynthese des Proteoms, Toxizität und Zelltod führen. Eine Lösung hin zu einer effizienten Decodierung von Quadruplettcodons stammt aus unseren Arbeiten zur Entwicklung eines orthogonalen Translationsmechanismus in Zellen.^[80–86]

Mit Blick darauf, dass der genetische Code mithilfe des Translationsapparates Codons in Aminosäuren „übersetzt“, fanden wir zu der Überlegung, dass wir einen parallelen genetischen Code erschaffen können (Abbildung 2). In der

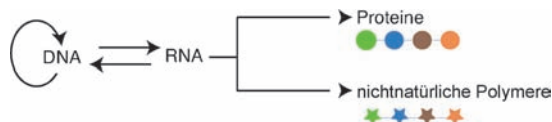


Abbildung 2. Orthogonale Translation. Die natürliche Translation erzeugt Proteine, die aus natürlichen Aminosäuren zusammengesetzt sind (Kreise). Eine orthogonale Translation kann Proteine erzeugen, die nichtnatürliche Aminosäuren enthalten (Sterne), und könnte letztendlich dazu verwendet werden, vollständig nichtnatürliche Polymere zu erzeugen.

ersten Stufe erzeugten wir ein orthogonales Ribosom, das selektiv eine neue, orthogonale mRNA abliest, die durch endogene Ribosomen nicht abgelesen wird.^[80] Dies führt zu einem Ribosom, das, anders als das natürliche Ribosom (das benötigt wird, um das Proteom zu synthetisieren und die Zelle am Leben zu halten und sich deshalb gegen Änderungen seiner Sequenz und Struktur sperrt), durch synthetische Evolution im Labor veränderbar ist. Das neue, orthogonale Ribosom bietet eine Plattform für gezielte Modifikationen an den funktionellen Zentren des Ribosoms, dessen Struktur in jahrzehntelangen Forschungen aufgeklärt wurde, das man aber nicht so verändern konnte, dass es neue Funktionen auszuführen vermochte. In einer zweiten Stufe veränderten wir das orthogonale Ribosom in der Weise, dass es tRNAs, die an zellulären mRNAs nicht effizient decodiert werden, an der orthogonalen mRNA effizient decodierte.^[84,86] Dies wird durch die Erzeugung einer „Ausbeulung“ an der tRNA (unter Verwendung einer tRNA mit erweitertem Anticodon) und einer entsprechenden „Einbuchtung“ im orthogonalen Ribosom erreicht, um die erweiterte tRNA aufzunehmen. Der Ansatz ermöglicht eine selektive Erhöhung der Effizienz der Quadruplettdecodierung der orthogonalen mRNA, ohne die Decodierung der zellulären mRNA durch das natürliche Ribosom zu beeinträchtigen, sodass die Effizienz der Quadruplettdecodierung ohne die Bildung toxischer Fehlableitungen des Proteoms erhöht wird.

5.2. Erzeugung orthogonaler Ribosom/mRNA-Paare

Um ein orthogonales Ribosom/mRNA-Paar in *E. coli* zu erzeugen, das parallel, aber unabhängig zum natürlichen Ribosom operiert, machten wir uns die Tatsache zunutze, dass das Ribosom von *E. coli* seine kognate mRNA im (geschwindigkeitsbestimmenden) Initiationsschritt der Translation mithilfe einer Shine-Dalgarno-Sequenz selektiert, die 7 bis 12 Basen strangaufwärts vom Startcodon AUG liegt.^[80,81] Genomische Shine-Dalgarno-Sequenzen zeigen eine erhebliche Sequenzvariabilität, die Konsensussequenz (AG-GAGG) ist aber komplementär zum 3'-Ende der 16S-rRNA (CCUCCU) der kleinen Untereinheit des Ribosoms. Wir erzeugten eine große Bibliothek von alternativen Shine-Dalgarno-Sequenzen, die sämtliche Kombinationen von Nucleotiden in den Positionen 7 bis 12 strangaufwärts vom AUG-Startcodon der mRNA enthielt. Damit konnten die alternativen Shine-Dalgarno-Sequenzen bezüglich Sequenz und Abstand zum Startcodon variieren. Wir platzierten diese Sequenzen strangaufwärts eines Gens, das für eine Fusion zwischen *cat* (Chloramphenicolacetyltransferase-Gen) und *upp* (Uracilphosphoribosyltransferase-Gen) codierte, wodurch eine entweder positive oder negative Selektion bezüglich der Expression der Genfusion bei Zugabe spezifischer niedermolekularer Verbindungen möglich wurde. In Gegenwart von Chloramphenicol ermöglicht das *cat*-Gen die Selektion funktioneller Sequenzen, und in Gegenwart von 5-Fluoruracil (5FU) ermöglicht das *upp*-Gen die Selektion nichtfunktioneller Sequenzen.^[87]

Zuerst selektierten wir mit 5FU strangaufwärts gelegene Sequenzen der *cat-upp*-Fusion, die verhindern, dass das Gen durch das endogene Ribosom der Zelle translatiert wird, und erhielten damit einen Pool von potentiell orthogonalen ribosomalen Bindungsstellen. Als nächstes erzeugten wir eine Bibliothek, die auf dem Gen des ribosomalen RNA-Operons *rrnB* basiert. Diese Bibliothek ermöglicht den Zellen die Bildung von Ribosomen, die alle möglichen Kombinationen von Nucleotiden am 3'-Ende der 16S-rRNA enthalten. Ein Zellwachstum in Gegenwart von Chloramphenicol ermöglicht die Selektion von orthogonalen Ribosomen, die spezifisch die orthogonale mRNA translatieren. Unter den 10^9 Kombinationen potentieller Ribosom/mRNA-Paarungen, die in dieser zweistufigen Selektion abgefragt wurden, fanden wir drei Klassen orthogonaler Ribosom/mRNA-Paare. Diese Paarungen unterscheiden sich in der Basenpaarsequenz, durch die das Ribosom an seine kognate mRNA bindet (Abbildung 3).

5.3. Evolution eines orthogonalen Ribosoms für die Quadruplettdecodierung

Mit den nun zur Verfügung stehenden orthogonalen Ribosom/mRNA-Paarungen gingen wir daran, ein orthogonales Ribosom zu evolvieren, das in effizienter Weise Quadruplettcodons decodiert, die von natürlichen Ribosomen ineffizient decodiert werden.^[86] Um ein Ribosom zu erzeugen, das Quadruplettcodons decodiert, entwarfen wir zunächst 13 strukturgelenkte Bibliotheken^[31,88–90] im Decodierungszen-

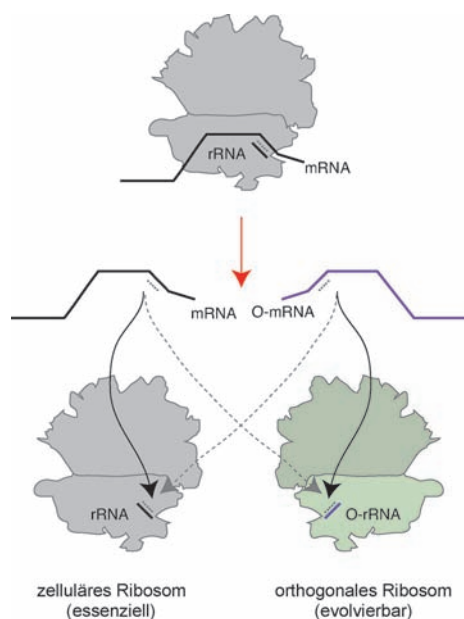


Abbildung 3. Erzeugung orthogonaler Ribosom/mRNA-Paare durch Genduplikation und Spezialisierung. Das zelluläre Ribosom (grau) translatiert natürliche mRNA (wt-mRNA, schwarz). Das orthogonale Ribosom (grün) translatiert eine orthogonale mRNA (O-mRNA, blau).

trum der A-Stelle des Ribosoms, das für die Genauigkeit der Tripletdecodierung zuständig ist. Jede der Bibliotheken enthält ungefähr 10^8 Mitglieder, und zusammengenommen nehmen die Bibliotheken eine molekulare Oberfläche ein, die 127 Nucleotiden der 16S-rRNA entspricht. Zur Selektion orthogonaler Ribosomen, die mit hoher Effizienz tRNAs mit erweitertem Anticodon decodieren, kombinierten wir die Bibliothek orthogonaler Ribosomen mit einer tRNA mit erweitertem Anticodon, die durch die Seryl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* aminoacyliert wird und in Reaktion auf das AAGA-Quadruplettcodon Serin in die Peptidkette einbaut. Die Zellen enthielten außerdem eine orthogonale mRNA, die ein *cat*-Gen mit einem dem Leseraster folgenden AAGA-Codon trägt. Das Ablesen des AAGA-Codons durch mutierte orthogonale Ribosomen mithilfe der tRNA mit erweitertem Anticodon führte zur Synthese des vollständigen Chloramphenicolacetyltransferaseproteins. Damit gelang mittels Chloramphenicol die Selektion von Zellen mit orthogonalen Ribosomen, die die tRNA mit erweitertem Anticodon zu decodieren vermögen (Abbildung 4).

Wir selektierten ein neues orthogonales Ribosom, Ribo-Q1, das in der Lage war, mithilfe von tRNAs mit erweitertem Anticodon eine Reihe von Quadruplettcodons effizient zu decodieren.^[86] Tatsächlich zeigten Zellen, die Ribo-Q1, ein *cat*-Gen mit AAGA-Codon und die entsprechende tRNA mit erweitertem Anticodon enthielten (die durch die Seryl-tRNA-Synthetase von *E. coli* aminoacyliert wird), einen vergleichbaren Grad an Chloramphenicol-Resistenz wie Zellen mit einem Wildtyp-*cat*-Gen. Dies lässt den Schluss zu, dass das Niveau der Quadruplettdecodierung am evolvierten Ribosom – in Gegenwart einer effizient aminoacylierten tRNA – dem Niveau der Tripletdecodierung am natürlichen Ribosom nahekommen kann. Ribo-Q1 wurde von Ribo-X

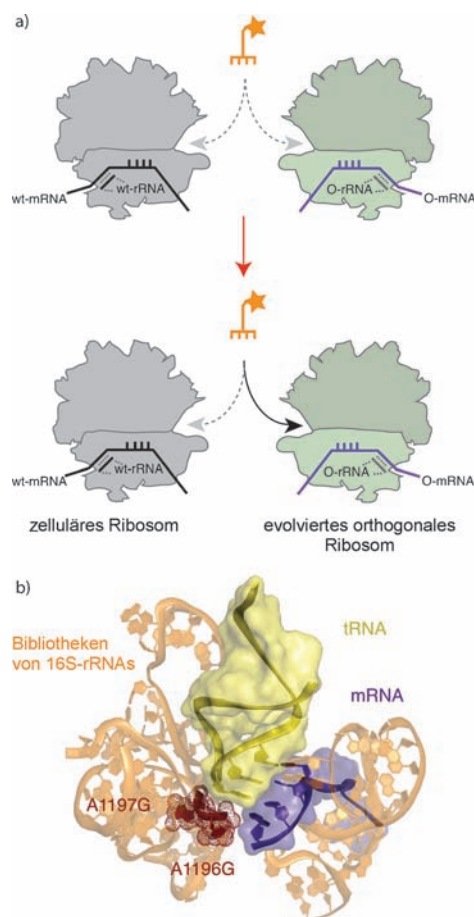


Abbildung 4. Selektion eines Ribosoms für die effiziente Decodierung von Quadruplettcodons durch Verwendung von tRNAs mit erweitertem Anticodon. a) Quadruplettcodons werden vom zellulären und vom orthogonalem Ribosom durch aminoacylierte tRNAs mit erweitertem Anticodon ineffizient decodiert (orange). Das orthogonale Ribosom kann im Labor so evolviert werden (roter Pfeil), dass es Quadruplettcodons effizient zu decodieren vermag. b) An der 16S-rRNA des orthogonalen Ribosoms selektierte Mutationen (rot hervorgehoben). Das Strukturmodell wurde mit Pymol (<http://www.pymol.org>) erzeugt, PDB-Code 2j00.

abgeleitet, einem evolvierten orthogonalem Ribosom, das auf verstärkte Amber-Suppression selektiert worden war und erstmals den effizienten und quantitativen Einbau multipler identischer nichtnatürlicher Aminosäuren an spezifischen Stellen ermöglichte.^[84] Ribo-Q1 war zusätzlich in der Lage, das Amber-Codon einer orthogonalen mRNA mithilfe einer Amber-Suppressor-tRNA effizient zu decodieren. Obwohl wir 127 Nucleotide im Decodierungszentrum von Ribo-X zur Selektion von Ribo-Q1 mutierten, enthält Ribo-Q1 nur zwei Mutationen bezüglich Ribo-X. Die Kartierung der selektierten Mutationen in einer Kristallstruktur eines tRNA-gebundenen Ribosoms (Abbildung 4b) offenbart, dass sich die selektierten Mutationen dort clustern, wo man die Anlagerung der vierten Base des erweiterten Anticodons vermutet. Dies führt zu dem Schluss, dass die selektierten Mutationen in einer lokalen Umlagerung der ribosomalen RNA-Struktur resultieren. Wir konnten zeigen, dass Ribo-Q1 eine ausgezeichnete Translationsgenauigkeit besitzt. Darüber hinaus

waren in der Lage, mittels Ribo-Q1 und tRNAs mit spezifischen erweiterten Anticodons mehrere spezifische Quadruplettcodons effizient zu decodieren. Unsere Forschungen lieferten somit mehrere freie Codons, die an der orthogonalen mRNA durch Ribo-Q1 spezifisch decodiert und potentiell neuen Aminosäuren zugewiesen werden können.

5.4. Synthetasen und tRNAs für einen orthogonalen genetischen Code

Um Ribo-Q1 für den Einbau multipler nichtnatürlicher Aminosäuren nutzen zu können, benötigen wir für jedes neue Codon ein orthogonales Synthetase/tRNA-Paar. Zwei nützliche Aminoacyl-tRNA/Synthetase(RS)-Paare, die in *E. coli* orthogonal sind (*Mj*TyrRS/tRNA_{CUA}^[11] und Pyrrolysyl (Pyl)RS/tRNA_{CUA} aus *Methanosarcina*),^[91,92] wurden durch Genimport aus Archaeen entdeckt (Abbildung 5). Dieser Ansatz beruht auf dem Umstand, dass, obgleich der genetische Code rezenter Lebensformen praktisch universell konserviert ist, die Identitätselemente, mit denen die archaischen Synthetasen ihre kognate tRNA erkennen, im Verlauf

der natürlichen Evolution zu orthogonalen Paaren divergiert sind.^[93–98] Das aktive Zentrum von *Mj*TyrRS wurde im Laboratorium so evolviert, dass es den Einbau einer Reihe aromatischer nichtnatürlicher Aminosäuren ermöglicht.^[11] Das PylRS/tRNA_{CUA}-Paar wurde kürzlich in bestimmten Methanogenen entdeckt. Es erkennt Pyrrolysyl und vermittelt den Einbau dieser Aminosäure in Reaktion auf das Amber-Stoppodon.^[91] Anders als beim Selenocystein-Einbau reichen ein Synthetase/tRNA-Paar und eine Aminosäure aus, um den Einbau von Pyrrolysyl in Reaktion auf ein Amber-Stoppodon zu dirigieren.^[91] Da das PylRS/tRNA_{CUA}-Paar orthogonal zu den Synthetasen und tRNAs aus *E. coli* ist und nicht die 20 natürlichen Aminosäuren verwertet, war es möglich, dieses Paar und seine künstlich evolvierten Varianten zu benutzen, um diverse nichtnatürliche Aminosäuren in Proteine einzubauen.^[91,92,99–109]

Wir konnten zeigen, dass die nichtkognaten Paarungen *Mj*TyrRS/*Mb*-tRNA_{CUA} und *Mb*PylRS/*Mj*-tRNA_{CUA} (*Mb* = *Methanosarcina barkeri*) nicht als Amber-Suppressoren agieren, was nahelegt, dass *Mj*TyrRS/tRNA_{CUA} und das *Mb*PylRS/tRNA_{CUA} in ihren Aminoacylierungsspezifitäten wechselseitig orthogonal sind.^[86] Um diese Synthetasen zusammen einsetzen zu können, um den Einbau spezifischer Aminosäuren in Reaktion auf spezifische Codons zu dirigieren, mussten wir die von ihnen decodierten Codons differenzieren. Um das *Mj*TyrRS/tRNA_{CUA}-Paar so abzuändern, dass es eine nichtnatürliche Aminosäure auf ein spezifisches Codon hin einbaut, mutierten wir zunächst das Anticodon von *Mj*tRNA_{CUA} zu UCCU (Erzeugung von *Mj*tRNA_{UCCU}). Da *Mj*TyrRS das Anticodon erkennt, resultierte diese Mutation in einem nichtfunktionellen Synthetase/tRNA-Paar. Um eine Synthetase zu erzeugen, die im Verbund mit *Mj*tRNA_{UCCU} eine nützliche nichtnatürliche Aminosäure auf ein Quadruplettcodon hin einbaut, ersetzten wir *Mj*TyrRS durch *Mj*AzPheRS (eine Synthetasevariante, die *p*-Azido-L-phenylalanin erkennt)^[110] und erzeugten eine Bibliothek von Mutation in derjenigen Region der Synthetase, die für die Erkennung des Anticodons zuständig ist. Anschließend selektierten wir Varianten von *Mj*AzPheRS/tRNA_{UCCU}-Paaren, die in Reaktion auf das AGGA-Codon *p*-Azido-L-phenylalanin einbauen (Abbildung 5b).

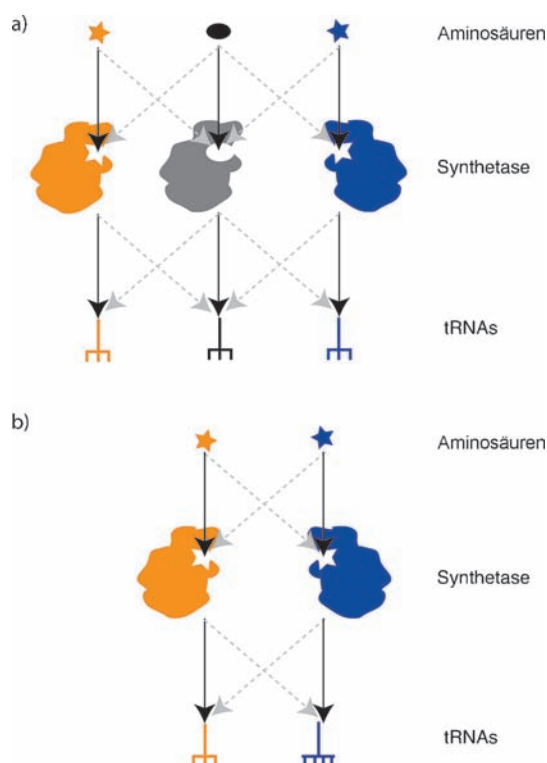


Abbildung 5. Orthogonale Aminoacyl-tRNA/Synthetase-Paare zur Erweiterung des genetischen Codes. a) Das Pyrrolysyl-tRNA-Synthetase/tRNA_{CUA}-Paar aus *Methanosarcina* sp. (orange) und das *Mj*Tyrosyl-tRNA-Synthetase/tRNA_{CUA}-Paar (blau) können nichtnatürliche Aminosäuren (orange bzw. blaue Sterne) verwerten oder dazu evolviert werden. Beide Synthetase/tRNA-Paare sind orthogonal zu den Synthetasen und tRNAs aus *E. coli* (grau/schwarz), die natürliche Aminosäuren (schwarze Ovale) verwerten. b) Von Pyrrolysyl-tRNA-Synthetase/tRNA_{CUA} und *Mj*Tyrosyl-tRNA-Synthetase/tRNA_{UCCU} abgeleitete Paare sind gegenseitig orthogonal und orthogonal zu endogenen Synthetasen und tRNAs.

5.5. Genetische Codierung von emergenten Eigenschaften in Proteinen durch orthogonale Translation

Um ein orthogonales Translationssystem zum ortsspezifischen Einbau zweier nichtnatürlicher Aminosäuren zu entwickeln, kombinierten wir Ribo-Q mit einer mRNA mit UAG- und AGGA-Codon, *Mj*AzPheRS/tRNA_{UCCU} und *Mb*PylRS/tRNA_{CUA}. Mit diesem System gelang uns die Bildung eines vollständigen Proteins nur in Gegenwart von *p*-Azido-L-phenylalanin und einem aliphatischen Alkin, das in vorherigen Studien als ein gutes Substrat für PylRS identifiziert wurde.^[103] Wir konnten außerdem zeigen, dass beide Aminosäuren an genetisch festgelegten Stellen eingebaut wurden (durch Massenspektrometrie nachgewiesen). Dieses Experiment war der Beleg für die Entwicklung eines parallelen Mechanismus in Zellen zum Einbau nichtnatürlicher

Aminosäuren in Reaktion auf Amber- und Quadruplett-codons der orthogonalen mRNA (Abbildung 6).^[86]

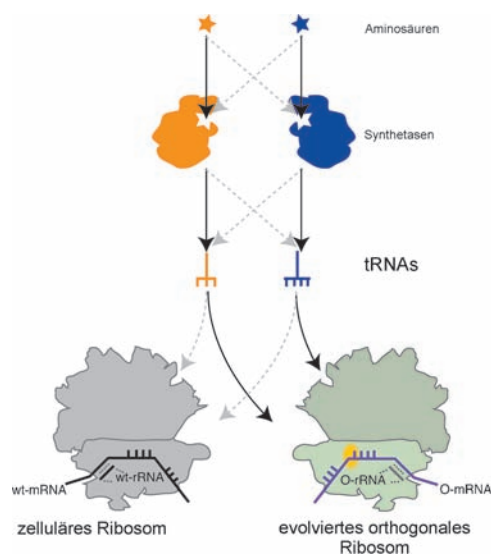


Abbildung 6. Ein orthogonaler Translationsmechanismus für den Einbau multipler nichtnatürlicher Aminosäuren. Die modulare Kombination von nichtnatürlichen Aminosäuren, wechselseitig orthogonalen evolvierten Synthetasen, tRNAs und einem evolvierten orthogonalen Ribosom/mRNA-Paar ermöglicht die Codierung von nichtnatürlichen Aminosäuren auf der orthogonalen mRNA.

Die Fähigkeit, zwei nichtnatürliche Aminosäuren gezielt in rekombinante Proteine einbauen zu können, ermöglicht es uns, Eigenschaften in das betreffende Protein einzuprogrammieren, die keine Eigenschaft einer der beiden Aminosäuren allein sind, sondern aus der Wechselwirkung zwischen beiden Aminosäuren hervorgehen (Abbildung 7a). Wir konnten zeigen, dass durch die genetische Codierung zweier Aminosäuren, von denen eine mit einer aliphatischen Alkylgruppe und die andere mit einer Azidgruppe ausgestattet wurde, eine rasch verlaufende proximitätsbeschleunigte Cycloaddition zwischen diesen bioorthogonalen Gruppen unter Bildung einer redoxstabilen Triazolbrücke in einem Protein programmiert werden kann (Abbildung 7b).^[86] Erweiterungen dieses Ansatzes könnten die schnelle Untersuchung aller möglichen Verbrückungen in Proteinen ermöglichen, was zur Fixierung bestimmter funktioneller Zustände von Proteinen oder für die Stabilisierung therapeutischer Proteine Anwendung finden könnte.

Die von *MjTyrRS*^[11] und *PylRS*^[91,92,99–109] abgeleiteten Synthetasen wurde jeweils zur Codierung zahlreicher nichtnatürlicher Aminosäuren benutzt, sodass es durch Erweiterung unseres Ansatzes nunmehr möglich ist, mehrere hundert paarweise Kombinationen von nichtnatürlichen Aminosäuren in Proteine einzubauen. Durch die Codierung neuer Kombinationen nichtnatürlicher Aminosäuren könnten neue Eigenschaften, wie z.B. Fluoreszenz, in Proteine einprogrammiert werden, was z.B. die Markierung spezifischer Proteine in vivo erleichtern könnte.

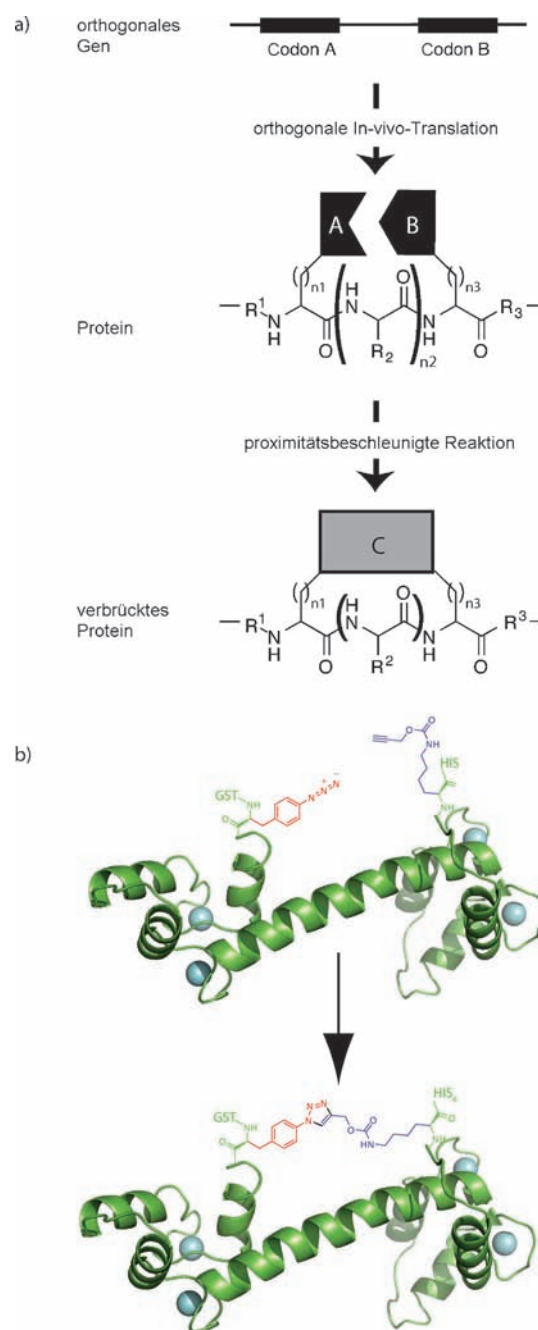


Abbildung 7. Programmierung emergenter Eigenschaften durch Kombinieren von Aminosäuren in rekombinanten Proteinen. a) Genetische Programmierung einer Proteincyclisierung. b) Struktur von Calmodulin mit zwei genetisch codierten nichtnatürlichen Aminosäuren. Das Strukturmodell wurde mit Pymol erzeugt, PDB-Code 4CLN. Die genetisch codierten nichtnatürlichen Aminosäuren bewirken eine spezifische Cyclisierung des Proteins in einer proximitätsbeschleunigten Reaktion (mit einem Cu^I -Katalysator) unter Bildung einer redoxstabilen nanoskaligen Verbrückung.

6. De-novo-Evolution orthogonaler Aminoacyl-tRNA-Synthetase/tRNA-Paare

Ribo-Q1 bietet zahlreiche weitere Codons auf der orthogonalen mRNA. Da jedoch nur zwei orthogonale Syn-

thetase/tRNA-Paare existieren, die zum Einbau spezifischer Aminosäuren verwendet werden können, können logischerweise auch nur zwei spezifische nichtnatürliche Aminosäuren in ein Protein eingebaut werden. Eine klare Herausforderung besteht darin, vom Einbau zweier nichtnatürlicher Aminosäuren zur Synthese vollständig nichtnatürlicher Polymere zu gelangen. Dazu müssen Strategien entdeckt oder erfunden werden, um neue orthogonale Aminoacyl-tRNA-Synthetase/tRNA-Paare zu erzeugen, die zum Einbau weiterer nichtnatürlicher Aminosäuren in ein einzelnes Polypeptid genutzt werden können.

Die beiden orthogonalen Synthetase/tRNA-Paare in *E. coli* wurden durch Genimport aus heterologen Organismen abgeleitet. Dabei machte man sich den Umstand zunutze, dass der genetische Code praktisch universell konserviert ist, die Sequenzen und Strukturen von Synthetasen und tRNAs aber im Verlauf der Evolution divergierten. Nach jetzigem Stand ist jedoch unklar, wie viele wechselseitig orthogonale Synthetase/tRNA-Kombinationen basierend auf natürlichen evolutionären Divergenzen gefunden werden können. Da außerdem die Evolutionsforschung Hinweise darauf gibt, dass der gegenwärtige Satz von Synthetasen und tRNAs durch Genduplikation und Spezialisierung aus einem einfacheren Basissatz entstanden ist (so scheinen z. B. die Tyrosyl- und die Tryptophanyl-tRNA-Synthetase von einem gemeinsamen Vorläufer abzustammen),^[11] sollte es im Prinzip möglich sein, diesen evolutionären Prozess im Labor fortzusetzen, um so neue orthogonale Synthetasen und tRNAs de novo zu erzeugen. Uns gelang es, mit einer Serie von genetischen Selektionen in strukturgerichteten Bibliotheken ein neues Synthetase/tRNA-Paar zu evolvieren, das sowohl zum ursprünglichen Synthetase/tRNA-Paar, aus dem es evolviert wurde, als auch zu jeder anderen Synthetase und tRNA in der Zelle orthogonal ist (Abbildung 8).^[12] Diese Studie belegt,

dass die geringe Zahl orthogonaler Synthetase/tRNA-Paare, die in der Natur entdeckt wurden, die potentiellen Möglichkeiten zur Erweiterung des genetischen Codes mit dem Ziel der Codierung zusätzlicher nichtnatürlicher Aminosäuren nicht intrinsisch beschränkt.

7. Schlussfolgerungen und Ausblick

Zukünftige Arbeiten werden darauf abzielen, die von uns beschriebenen Strategien zu erweitern, um neue Codons bereitzustellen und diese mit zusätzlichen orthogonalen Synthetasen und tRNAs zu kombinieren, um so den orthogonalen genetischen Code auf die zelluläre Synthese vollständig nichtnatürlicher Polymere zu erweitern. Wir werden außerdem die Evolution des orthogonalen Ribosoms weiter erforschen, mit dem Ziel einer In-vivo-Biosynthese von nichtnatürlichen Polymeren aus anderen als α -L-Aminosäuren. Ein solches Vorhaben wird vermutlich die Evolution des Peptidyltransferasezentrums und eventuell noch anderer Teile des Ribosoms erfordern. Die bereits nachgewiesene Evolvierbarkeit des orthogonalen Ribosoms ist hierfür ein Ausgangspunkt. Durch die Erzeugung von Zellen, die mit genetisch codierten, vererblichen Polymeren ausgestattet sind, wird es vielleicht möglich sein, die kombinatorische Biosynthese von Materialien und Therapeutika zu erforschen. Es könnte weiterhin möglich sein, Forschungen darüber anzustellen, ob Lebewesen mit zusätzlichen genetisch codierten Polymeren Funktionen evolvieren, die die „natürliche Biologie“ nicht beherrscht.

Die Arbeiten unserer Forschungsgruppe werden vom Medical Research Council (U105181009, UD99999908), dem European Research Council, dem Human Frontiers of Science

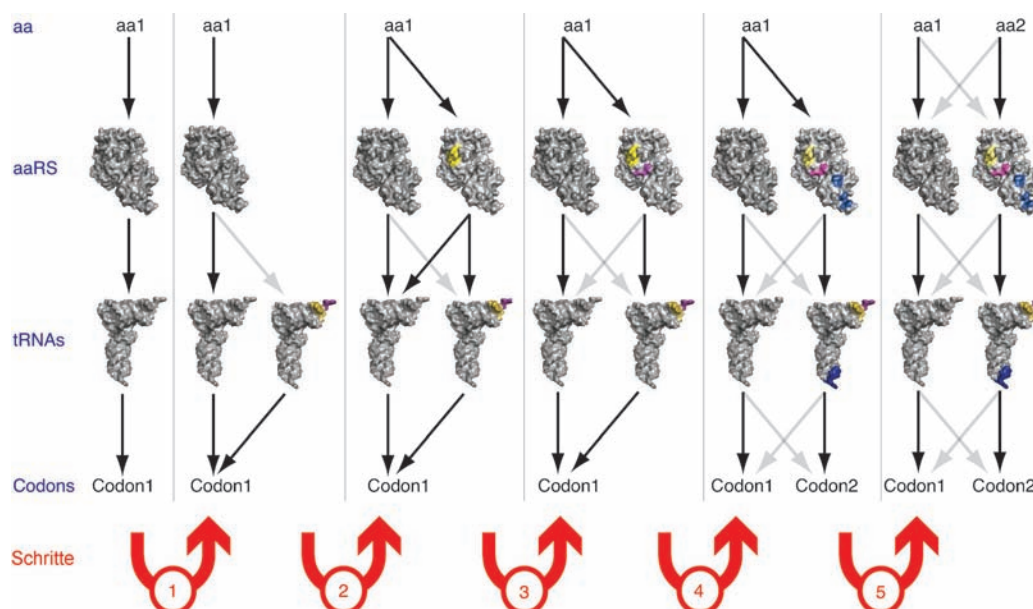


Abbildung 8. De-novo-Erzeugung von orthogonalen Synthetase/tRNA-Paaren. Jeder Schritt stellt eine gerichtete Evolution oder ein Screening-experiment dar. Die Experimente wurden mit dem *Mj*Tyrosyl-tRNA-Synthetase/tRNA_{CUA}-Paar durchgeführt. Codon1 ist UAG, Codon2 ist AGGA. aa = Aminosäure, aaRS = Aminoacyl-tRNA-Synthetase.

Program und der Louis Jenatet Foundation (LJ-YICA) gefördert. K.W. dankt dem Trinity College, Cambridge, für ein Forschungsstipendium.

Eingegangen am 18. Juli 2011

Online veröffentlicht am 19. Januar 2012

Übersetzt von Dr. Thomas Lazar, Paderborn

- [1] A. Tsugita, H. Fraenkelconrat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1960**, 46, 636.
- [2] F. H. Crick, S. Brenner, R. Watstobi, L. Barnett, *Nature* **1961**, 192, 1227.
- [3] M. W. Nirenberg, J. H. Matthae, O. W. Jones, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1962**, 48, 104.
- [4] H. G. Khorana, *Harvey Lect.* **1966**, 62, 79.
- [5] H. G. Khorana, H. Buchi, H. Ghosh, N. Gupta, T. M. Jacob, H. Kossel, R. Morgan, S. A. Narang, E. Ohtsuka, R. D. Wells, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1966**, 31, 39.
- [6] F. H. C. Crick, *J. Mol. Biol.* **1968**, 38, 367.
- [7] G. Baldini, B. Martoglio, A. Schachenmann, C. Zugliani, J. Brunner, *Biochemistry* **1988**, 27, 7951.
- [8] C. J. Noren, S. J. Anthonycahill, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Science* **1989**, 244, 182.
- [9] J. D. Bain, C. G. Glabe, T. A. Dix, A. R. Chamberlin, E. S. Diala, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 8013.
- [10] D. Mendel, V. W. Cornish, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, 24, 435.
- [11] J. M. Xie, P. G. Schultz, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, 7, 775.
- [12] J. W. Chin, *EMBO J.* **2011**, 30, 2312.
- [13] S. Greiss, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 14196.
- [14] K. Josephson, M. C. T. Hartman, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 11727.
- [15] T. Kawakami, H. Murakami, H. Suga, *Chem. Biol.* **2008**, 15, 32.
- [16] 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.
- [17] T. M. Schmeing, V. Ramakrishnan, *Nature* **2009**, 461, 1234.
- [18] V. Ramakrishnan, *Cell* **2002**, 108, 557.
- [19] A. Simonetti, S. Marzi, L. Jenner, A. Myasnikov, P. Romby, G. Yusupova, B. P. Klaholz, M. Yusupov, *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, 66, 423.
- [20] B. S. Laursen, H. P. Sorensen, K. K. Mortensen, H. U. Sperling-Petersen, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2005**, 69, 101.
- [21] M. L. Sprengart, A. G. Porter, *Mol. Microbiol.* **1997**, 24, 19.
- [22] J. Shine, L. Dalgarno, *Biochem. J.* **1974**, 141, 609.
- [23] J. A. Steitz, K. Jakes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, 72, 4734.
- [24] C. R. Woese, G. J. Olsen, M. Ibba, D. Soll, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, 64, 202.
- [25] P. O'Donoghue, Z. Luthey-Schulten, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, 67, 550.
- [26] F. J. LaRiviere, A. D. Wolfson, O. C. Uhlenbeck, *Science* **2001**, 294, 165.
- [27] J. M. Ogle, F. V. Murphy, M. J. Tarry, V. Ramakrishnan, *Cell* **2002**, 111, 721.
- [28] J. M. Ogle, A. P. Carter, V. Ramakrishnan, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, 28, 259.
- [29] M. V. Rodnina, K. B. Gromadski, U. Kothe, H. J. Wieden, *FEBS Lett.* **2005**, 579, 938.
- [30] M. V. Rodnina, W. Wintermeyer, *Biochem. Soc. Trans.* **2011**, 39, 658.
- [31] A. Korostelev, S. Trakhanov, M. Laurberg, H. F. Noller, *Cell* **2006**, 126, 1065.
- [32] J. F. Atkins, R. B. Weiss, S. Thompson, R. F. Gesteland, *Annu. Rev. Genet.* **1991**, 25, 201.
- [33] P. J. Farabaugh, *Microbiol. Rev.* **1996**, 60, 103.
- [34] J. F. Atkins, G. R. Bjork, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2009**, 73, 178.
- [35] R. B. Weiss, D. M. Dunn, J. F. Atkins, R. F. Gesteland, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1987**, 52, 687.
- [36] W. M. Huang, S. Z. Ao, S. Casjens, R. Orlandi, R. Zeikus, R. Weiss, D. Winge, M. Fang, *Science* **1988**, 239, 1005.
- [37] R. B. Weiss, D. M. Dunn, J. F. Atkins, R. F. Gesteland, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1990**, 39, 159.
- [38] I. Benhar, H. Engelbergkulka, *Cell* **1993**, 72, 121.
- [39] E. Tendand, I. Brierley, S. Inglis, C. Pleij, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 2304.
- [40] E. B. Tendand, P. W. G. Verlaan, C. W. A. Pleij, *RNA* **1995**, 1, 146.
- [41] R. C. L. Olsthoorn, R. Reumerman, C. W. Hilbers, C. W. A. Pleij, H. A. Heus, *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38, 7665.
- [42] R. B. Weiss, D. M. Dunn, A. E. Dahlberg, J. F. Atkins, R. F. Gesteland, *EMBO J.* **1988**, 7, 1503.
- [43] M. O'Connor, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 759.
- [44] T. Jacks, H. D. Madhani, F. R. Masiarz, H. E. Varmus, *Cell* **1988**, 55, 447.
- [45] R. B. Weiss, D. M. Dunn, M. Shuh, J. F. Atkins, R. F. Gesteland, *New Biol.* **1989**, 1, 159.
- [46] P. J. Farabaugh, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 10361.
- [47] D. L. Riddle, J. Carbon, *Nature New Biol.* **1973**, 242, 230.
- [48] D. L. Riddle, J. R. Roth, *J. Mol. Biol.* **1970**, 54, 131.
- [49] J. Yourno, T. Kohno, *Science* **1972**, 175, 650.
- [50] B. Moore, B. C. Persson, C. C. Nelson, R. F. Gesteland, J. F. Atkins, *J. Mol. Biol.* **2000**, 298, 195.
- [51] T. J. Magliery, J. C. Anderson, P. G. Schultz, *J. Mol. Biol.* **2001**, 307, 755.
- [52] J. C. Anderson, T. J. Magliery, P. G. Schultz, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 237.
- [53] M. Taki, J. Matsushita, M. Sisido, *ChemBioChem* **2006**, 7, 425.
- [54] J. D. Bain, E. S. Diala, C. G. Glabe, D. A. Wacker, M. H. Lyttle, T. A. Dix, A. R. Chamberlin, *Biochemistry* **1991**, 30, 5411.
- [55] J. R. Roesser, M. S. Chorghade, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1986**, 25, 6361.
- [56] C. H. Ma, W. Kudlicki, O. W. Odom, G. Kramer, B. Hardesty, *Biochemistry* **1993**, 32, 7939.
- [57] T. Hohsaka, Y. Ashizuka, H. Murakami, M. Sisido, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9778.
- [58] M. W. Nowak, J. P. Gallivan, S. K. Silverman, C. G. Labarca, D. A. Dougherty, H. A. Lester, *Ion Channels, Pt. B, Vol. 293*, Academic Press, San Diego, **1998**, p. 504.
- [59] D. L. Beene, D. A. Dougherty, H. A. Lester, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2003**, 13, 264.
- [60] D. A. Dougherty, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 645.
- [61] T. Hohsaka, R. Abe, K. Shiraga, M. Sisido, *Nucleic Acids Res. Suppl.* **2003**, 271.
- [62] T. Hohsaka, N. Muranaka, C. Komiyama, K. Matsui, S. Takaura, R. Abe, H. Murakami, M. Sisido, *FEBS Lett.* **2004**, 560, 173.
- [63] T. Hohsaka, M. Sisido, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 809.
- [64] M. Taki, Y. Tokuda, T. Ohtsuki, M. Sisido, *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, 102, 511.
- [65] Y. Tokuda, M. Taki, M. Sisido, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2006**, 50, 277.
- [66] H. Taira, M. Fukushima, T. Hohsaka, M. Sisido, *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, 99, 473.
- [67] N. Muranaka, T. Hohsaka, M. Sisido, *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, e7.
- [68] T. Hohsaka, Y. Ashizuka, H. Taira, H. Murakami, M. Sisido, *Biochemistry* **2001**, 40, 11060.
- [69] T. Ohtsuki, T. Manabe, M. Sisido, *FEBS Lett.* **2005**, 579, 6769.
- [70] D. Kajihara, R. Abe, I. Iijima, C. Komiyama, M. Sisido, T. Hohsaka, *Nat. Methods* **2006**, 3, 923.

- [71] A. M. Shafer, T. Kalai, S. Q. B. Liu, K. Hideg, J. C. Voss, *Biochemistry* **2004**, *43*, 8470.
- [72] E. A. Rodriguez, H. A. Lester, D. A. Dougherty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 8650.
- [73] S. W. Santoro, J. C. Anderson, V. Lakshman, P. G. Schultz, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 6700.
- [74] J. C. Anderson, N. Wu, S. W. Santoro, V. Lakshman, D. S. King, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 7566.
- [75] C. M. Dunham, M. Selmer, S. S. Phelps, A. C. Kelley, T. Suzuki, S. Joseph, V. Ramakrishnan, *RNA* **2007**, *13*, 817.
- [76] J. F. Curran, M. Yarus, *Science* **1987**, *238*, 1545.
- [77] S. S. Phelps, C. Gaudin, S. Yoshizawa, C. Benitez, D. Fourmy, S. Joseph, *J. Mol. Biol.* **2006**, *360*, 610.
- [78] S. E. Walker, K. Fredrick, *J. Mol. Biol.* **2006**, *360*, 599.
- [79] Q. Qian, J. N. Li, H. Zhao, T. G. Hagervall, P. J. Farabaugh, G. R. Bjork, *Mol. Cell* **1998**, *1*, 471.
- [80] O. Rackham, J. W. Chin, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 159.
- [81] O. Rackham, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17584.
- [82] O. Rackham, K. Wang, J. W. Chin, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 254.
- [83] W. L. An, J. W. Chin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 8477.
- [84] K. H. Wang, H. Neumann, S. Y. Peak-Chew, J. W. Chin, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 770.
- [85] O. P. T. Barrett, J. W. Chin, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 2682.
- [86] H. Neumann, K. H. Wang, L. Davis, M. Garcia-Alai, J. W. Chin, *Nature* **2010**, *464*, 441.
- [87] C. Fabret, S. D. Ehrlich, P. Noirot, *Mol. Microbiol.* **2002**, *46*, 25.
- [88] M. Selmer, C. M. Dunham, F. V. Murphy, A. Weixlbaumer, S. Petry, A. C. Kelley, J. R. Weir, V. Ramakrishnan, *Science* **2006**, *313*, 1935.
- [89] H. F. Noller, M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, L. Lancaster, A. Dallas, K. Fredrick, T. N. Earnest, J. H. D. Cate, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **2001**, *66*, 57.
- [90] M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. N. Earnest, J. H. D. Cate, H. F. Noller, *Science* **2001**, *292*, 883.
- [91] A. Ambrogelly, S. Palioura, D. Soll, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 29.
- [92] H. Neumann, S. Y. Peak-Chew, J. W. Chin, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 232.
- [93] D. Soll, *Experientia* **1990**, *46*, 1089.
- [94] R. Giege, M. Sissler, C. Florentz, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5017.
- [95] P. J. Beuning, K. Musier-Forsyth, *Biopolymers* **1999**, *52*, 1.
- [96] P. Fechter, J. Rudinger-Thirion, M. Tukalo, R. Giege, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 761.
- [97] T. Kobayashi, O. Nureki, R. Ishitani, A. Yaremchuk, M. Tukalo, S. Cusack, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 425.
- [98] K. Nozawa, P. O'Donoghue, S. Gundllapalli, Y. Arais, R. Ishitani, T. Umehara, D. Soll, O. Nureki, *Nature* **2009**, *457*, 1163.
- [99] T. Mukai, T. Kobayashi, N. Hino, T. Yanagisawa, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *371*, 818.
- [100] T. Fekner, X. Li, M. M. Lee, M. K. Chan, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1661; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1633.
- [101] A. Gautier, D. P. Nguyen, H. Lusic, W. A. An, A. Deiters, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4086.
- [102] X. Li, T. Fekner, J. J. Ottesen, M. K. Chan, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9348; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9184.
- [103] D. P. Nguyen, M. M. G. Alai, P. B. Kapadnis, H. Neumann, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14194.
- [104] D. P. Nguyen, M. M. G. Alai, S. Virdee, J. W. Chin, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 1072.
- [105] D. P. Nguyen, H. Lusic, H. Neumann, P. B. Kapadnis, A. Deiters, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8720.
- [106] C. R. Polycarpo, S. Herring, A. Bérubé, J. L. Wood, D. Söll, A. Ambrogelly, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 6695.
- [107] S. Virdee, Y. Ye, D. P. Nguyen, D. Komander, J. W. Chin, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 750.
- [108] S. Virdee, P. B. Kapadnis, T. Elliott, K. Lang, J. Madrzak, D. P. Nguyen, L. Riechmann, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10708.
- [109] D. P. Nguyen, T. Elliott, M. Holt, T. W. Muir, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11418.
- [110] J. W. Chin, S. W. Santoro, A. B. Martin, D. S. King, L. Wang, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9026.
- [111] L. Ribas de Pouplana, P. Schimmel, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 591.
- [112] H. Neumann, A. L. Slusarczyk, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2142.