

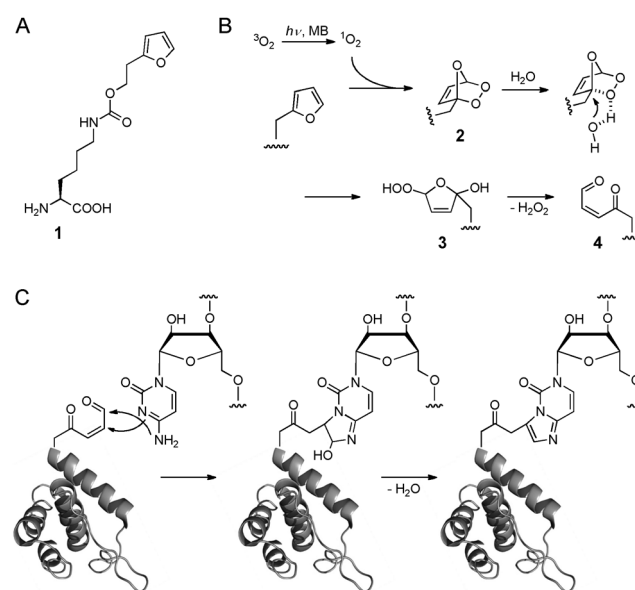
Durch rotes Licht kontrollierte Protein-RNA-Vernetzung mit einem genetisch kodierten Furan**

Moritz J. Schmidt und Daniel Summerer*

Protein-RNA-Wechselwirkungen spielen eine wichtige Rolle bei Transkription, Reifung, Transport, Translation und Zerfall von RNA und sind deswegen ein Schlüssel zur Regulation der Genexpression. Die Fähigkeit, selektiv die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen einem Peptid oder einem Protein von Interesse und seinem RNA-Bindungspartner zu induzieren, hat demzufolge Auswirkungen auf Therapie-möglichkeiten und ermöglicht die Entdeckung und Kartierung von schwachen und/oder transienten Protein-RNA-Wechselwirkungen. Ein ideales Vernetzungsreagens für diese Zwecke wäre rotes Licht. Dieses bietet hohe Eindringtiefe in biologischen Proben (z.B. benötigt für die photodynamische Therapie, PDT)^[1] und eine räumlich sowie zeitliche Reaktionskontrolle. Entsprechende Verfahren setzen jedoch eine ortsspezifische Installation der passenden funktionellen Gruppe mit einzigartigen, durch Licht kontrollierbaren Reaktivitäten in das gewünschte Peptid oder Protein voraus. Eine besonders nützliche Strategie hierfür ist die von Schultz^[2] entwickelte genetische Kodierung nichtkanonischer Aminosäuren (nkASs) mithilfe orthogonaler tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Paare (aaRS). Dies ermöglicht den Einbau neuer funktioneller Gruppen in ein gewünschtes Protein in Abhängigkeit eines einzigartigen Kodons *in vivo*. Unlängst konnten photochemisch vernetzbare nkASs basierend auf Arylaziden,^[3] Diazirinen^[4] und Benzophenon^[5] genetisch kodiert und in Studien mit Schwerpunkt auf Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt werden.^[4d,6] Diese nkASs setzen allerdings die Bestrahlung mit ultraviolettem Licht voraus, was ihre Anwendung in zellulären Proben und Geweben aufgrund der geringen Eindringtiefe^[1] und unerwünschten Nukleinsäure-schädigenden Photoreaktionen einschränkt.^[7]

Unser Ziel war die genetische Kodierung einer chemischen RNA-Vernetzungsreaktion, die durch Bestrahlung mit rotem Licht kontrolliert werden kann. Wir konzipierten die

Furan-basierte nkAS Nε-[2-(Furan-2-yl)ethoxy]carbonyl-Lysin (**1**, Schema 1A) als Vorstufe der photovernetzba- ren Gruppe. Der lange und flexible Linker von **1** sollte größere Reaktivitätsreichweite garantieren^[4b-d] als bei kurzen und starren Phenylalanin-basierten photovernetzba- ren nkASs.^[4a,5]



Scheme 1. A) Struktur von Nε-[2-(Furan-2-yl)ethoxy]carbonyl-Lysin (**1**). B) Vorgeschlagener Mechanismus der Bildung einer 1,4-En-dion-Gruppe (**4**) aus einer Furangruppe in wässriger Umgebung durch Oxidation mit Singulett-Sauerstoff. MB = Methylenblau. C) Protein-RNA-Vernetzung durch die Reaktion von 1,4-En-dion **4** mit einem Cytidin.

Furane können durch Singulett-Sauerstoff (¹O₂), welcher *in situ* über die Anregung eines Photosensibilisators mit Licht erzeugt wird, zu reaktiven Intermediaten oxidiert werden.^[8] Nach einer [4+2]-Cycloaddition zwischen ¹O₂ und dem Furan (Schema 1B), kann das resultierende Ozonid **2** durch Hydroxy-Nukleophile unter Bildung eines Hydroperoxids geöffnet werden.

Es wurde vorgeschlagen, dass in wässriger Umgebung ein Wassermolekül als Nukleophil bei der Bildung von **3** dient. Nach Eliminierung eines Moleküls H₂O₂ wird das elektrophile 1,4-En-dion **4** gebildet.^[9] 1,4-En-dione bilden spontan Addukte mit Cytosin-, Adenin- und Guanin-Nukleobasen unter physiologischen Bedingungen durch die Reaktion der exocyclischen Aminogruppe mit dem terminalen Aldehyd, gefolgt von einer 1,4-Addition des N3- oder N1-Atoms (je- weils in Cytosin und in Purinen) und potenzieller Aromati- sierung (Schema 1C, gezeigt für Cytidin).^[10] Vor kurzem

[*] M. Sc. M. J. Schmidt, Dr. D. Summerer
Fachbereich Chemie und Konstanz Research School Chemical
Biology, Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)
E-Mail: daniel.summerer@uni-konstanz.de
Homepage: <http://cms.uni-konstanz.de/summerer/>

[**] Wir bedanken uns für die Förderung des Zukunftskollegs der Uni- versität Konstanz und der Konstanz Research School Chemical Biology. Wir danken Peter G. Schultz für Plasmid pREP-CM3 + RBS. Wir danken Lei Wang für *E.-coli*-Stamm JX33. Wir danken Edward Lemke für Plasmid pEVOL_PyIRS_wt, _AF und pBAD_GFP-39TAG. Diese Arbeit wurde unterstützt durch die Deutsche Forschungsge- meinschaft (SPP1623).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201300754> zu finden.

wurde dieses Konzept für die Bildung von intermolekularen DNA-DNA-Vernetzungen durch den Einbau monosubstituierter Furane in DNA-Oligonukleotide über Festphasensynthese genutzt. Hohe Vernetzungsausbeuten wurden beobachtet, wenn Furane gegenüber den Nukleotiden dC und dA eingebaut und mit *N*-Bromsuccinimid (NBS)^[10d,11] oder mit ¹O₂ (in situ erzeugt durch Bestrahlung von Methylenblau mit rotem Licht) oxidiert wurden.^[12]

Wir untersuchten das tRNA^{Pyl}/Pyrrolysyl-RS(PylRS)-Paar von *Methanosarcina mazei* auf die Fähigkeit, **1** selektiv in Proteine in *E. coli* in Abhängigkeit des Amber-Stoppkodons (TAG) einzubauen.^[13]

Allerdings zeigten *E. coli*, die das Wildtyp(wt)-tRNA/PylRS-Paar (kodiert durch pEVOL-PylRS_wt) und mRNA, kodierend für Grün fluoreszierendes Protein (GFP) mit einem Amber-Stoppkodon an Position Y39 und einer C-terminalen His₆-Markierung (kodiert durch pBAD_GFP-39TAG),^[14] exprimierten, nur in Anwesenheit der als Positivkontrolle dienenden *nkAS* *N*-Boc-L-Lysin (Boc-Lys) eine signifikante Expression des Proteins GFP.^[13e] In Gegenwart von **1** konnte dagegen keine Expression durch Zellfluoreszenz- und SDS-PAGE-Analyse nachgewiesen werden.

Um PylRS zu evolvieren, die **1** als Substrat akzeptieren, unterwarfen wir drei fokussierte Bibliotheken mit randomisierten Positionen in der α -Helix 6 in der Pyrrolysyl-Bindestasche^[15] (Y306, Y306/L309 und Y306/A302) zusammen mit einer festen Y384F-Mutation^[13e,14,16] einem zuvor beschriebenen Selektionsprozess.^[17]

Um die Abhängigkeit des Zellwachstums von der Aminoacylierungsaktivität der PylRS-Mutanten zu maximieren, wurde die Selektion in dem von Wang^[18] entwickelten Freisetzungsfaktor-1(RF1)-defizienten *E. coli*-Stamm JX33 durchgeführt.

Wir identifizierten die beiden Mutanten Y306A/L309M/Y384F und Y306A/Y384F (PylRS_AF), die vergleichbare Effizienzen bei der GFP-Y39→**1**-Expression aufwiesen. Mit PylRS_AF wurden 17 mg L⁻¹ aufgereinigtes GFP-Y39→**1** erhalten, wohingegen keine Expression in Abwesenheit von **1** detektiert werden konnte, was eine hohe Einbaugenauigkeit anzeigt (Abbildung 1A). Elektrosprayionisations-Tandemmassenspektrometrie (ESI-MS/MS) von Trypsin-verdauten GFP-Y39→**1**-Proben bestätigte die Identität und den ortsspezifischen Einbau von **1** (Abbildung 1B; berechnet: 803.8652 Da, gefunden: 803.8650 Da). Nachfolgend exprimierten wir Thioredoxin (TRX) mit einem Amber-Stoppkodon an Position R74 und einer C-terminalen His₆-Markierung (kodiert durch pBAD_TRX-His₆-R74TAG) in *E. coli* wie beschrieben. Eine SDS-PAGE-Analyse zeigte hohe Effizienz (Ausbeute: 14 mg L⁻¹ aufgereinigtes TRX-R74→**1**) und Genauigkeit des Einbaus (Abbildung 1C, oben), und eine ESI-MS-Analyse bestätigte die Identität und die hohe Einbaugenauigkeit von **1** (Abbildung 1C, unten).

Der Einbau von **1** an mehreren Positionen eines Proteins würde die Vernetzungswahrscheinlichkeit erhöhen und die Vernetzung an mehreren Stellen in Komplexen höherer Ordnung ermöglichen. Dies ist jedoch normalerweise durch die begrenzte Effizienz der Amber-Suppression aufgrund der Konkurrenz zwischen der tRNA_{CUA} und RF1 eingeschränkt.^[18,19]

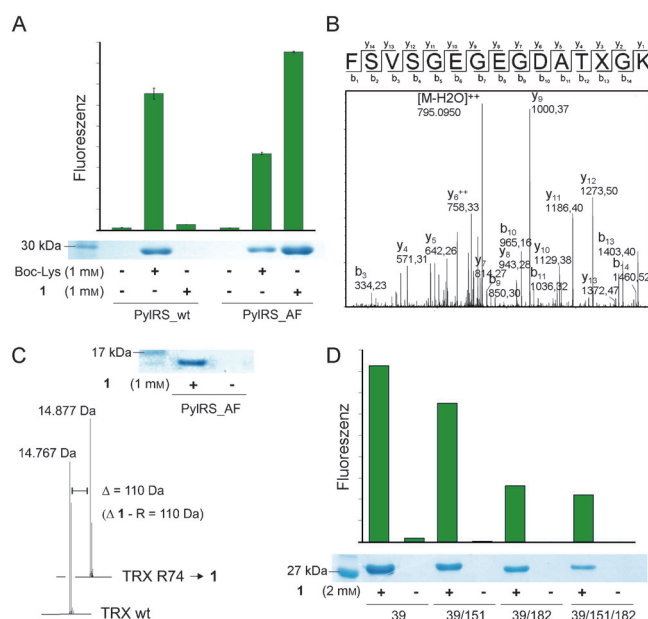


Abbildung 1. Effizienz und Genauigkeit des Einbaus von **1** in Proteine in *E. coli*. A) Expression von GFP-Y39→**1** und GFP-Y39→Boc-Lys unter Koexpression von PylRS_wt oder PylRS_AF. Oben: Zelluläre GFP-Fluoreszenz. Unten: SDS-PAGE-Analyse von Ni-NTA aufgereinigten GFP-Expressionen. B) ESI-MS/MS-Spektrum von einem trypsinverdauten GFP-Y39→**1**-Peptidfragment. **1** ist gekennzeichnet durch ein „X“. C) Oben: SDS-PAGE-Analyse einer aufgereinigten TRX-R74→**1**-Expression unter Koexpression von PylRS_AF. Unten: ESI-MS-Spektrum von aufgereinigten TRX-wt und TRX-R74→**1**. D) Einbau von **1** in GFP an mehreren Positionen wie gezeigt, unter Koexpression von PylRS_AF in *E. coli* JX33 analysiert wie in Abbildung 1A.

Wir exprimierten GFP mit ein bis drei Amber-Stoppkodons (kodiert durch pBAD_GFP-39TAG, -39/151TAG, -39/182TAG und -39/151/182TAG) in *E. coli* JX33 wie beschrieben. In allen Fällen konnte nur in Anwesenheit von **1** eine signifikante GFP-Expression beobachtet werden, was den Einbau an allen Positionen mit hoher Genauigkeit aufzeigt (Abbildung 1D). Obwohl die Effizienz positionsabhängig war (ca. 80 % für Y151 und ca. 32 % für Y182), konnten > 4.5 mg L⁻¹ aufgereinigtes Protein sogar für den dreifachen Einbau erhalten werden.

Haarnadelstrukturen zählen zu den häufigsten RNA-Sekundärstrukturen. Die selektive Erkennung dieser Strukturen durch regulatorische Proteine ist entscheidend für die Transkription, den Transport und die Translation von RNA. Folglich sind diese Strukturen vielversprechende Ziele für therapeutische Ansätze.^[20]

Ein zentrales Wirkstoffziel und ein Paradigma für virale Protein/RNA-Haarnadelstruktur-Komplexe ist die Wechselwirkung zwischen dem HIV-1-TAT-Protein („transactivator of transcription“) und seiner kognaten RNA („transactivator response RNA“, TAR, Abbildung 2A), aufgrund seiner ubiquitären, essentiellen Rolle in der Transkription des HIV Genoms. HIV-1 TAR weist jedoch eine hohe konformative Flexibilität auf, was das Design von Inhibitoren und strukturelle Einsichten erschwert. Gleichwohl haben sich kationische Peptide wie TAT-basierte Arginin-reiche Motive (ARM) vor

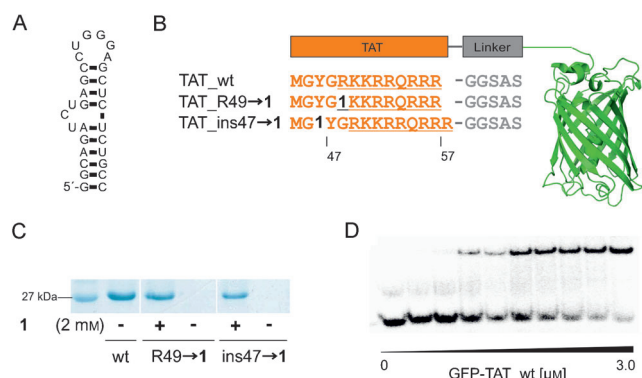


Abbildung 2. Einbau von **1** in das Arginin-reiche Motiv (ARM) von HIV-1-TAT und Bindungsstudie mit HIV-1-TAR-RNA. A) Nukleotidsequenz der HIV-1-TAR-RNA. B) Design und Aminosäuresequenz der verwendeten TAT-Peptide. TAT-Sequenz ist in orange gezeigt (ARM unterstrichen), Linker in grau und GFP als grünes Bändermodell. C) SDS-PAGE-Analyse von aufgereinigten TAT-wt-, TAT-ins47→1- und TAT-R49→1-Expressionen. D) Elektrophoretischer „Mobility-Shift“-Assay der Bindung des GFP-TAT-wt an HIV-1-TAR-RNA.

kurzem als vielversprechende Klasse von TAR-Inhibitoren erwiesen.^[21]

Die Möglichkeit, **1** in ARM zu integrieren, könnte daher neue Erkenntnisse zur TAR-Erkennung liefern, die auf anderen Wegen schwer zugänglich sind, und sie bietet zudem einen chemischen „Gefechtskopf“ für das Design Peptid-basierter Therapeutika.

Wir exprimierten zwei GFP-Fusionskonstrukte, die über ein N-terminales HIV-1-TAT-ARM verfügen, mit und ohne **1** anstelle von R49. Dieser Rest ist zwar Teil des ARM, hat aber keinen entscheidenden Einfluss auf die Bindung (Abbildung 2B, kodiert durch pBAD_GFP-TAT_wt oder _R49TAG). SDS-PAGE- (Abbildung 2C) und ESI-MS-Analysen belegten den Einbau von **1** mit hoher Effizienz und Genauigkeit (berechnet: 29544.9 und 29654.9 Da, gefunden: 29542.0 und 29653.0 Da). Elektrophoretische Mobilitätsstu-

dien zeigten, dass beide Konstrukte TAR binden können (Abbildung 2D, $K_D = (0.47 \pm 0.05) \mu\text{M}$, und $(1.32 \pm 0.17) \mu\text{M}$ für TAT_wt und _R49→1). Als Nächstes inkubierten wir $5\text{-}^{32}\text{P}$ -markierte TAR-RNA mit und ohne diese Konstrukte in An- oder Abwesenheit des Photosensibilisators MB und bestrahlten die Mischung mit rotem Licht unter aeroben Bedingungen. Denaturierende PAGE-Analyse zeigte keine photochemischen Vernetzungen in Abwesenheit von MB oder Licht (siehe die Hintergrundinformationen). Ebenso ergaben Reaktionen ohne TAT-Konstrukt oder mit TAT_wt keine Veränderung der Banden im Vergleich zur TAR-Bande (Abbildung 3A). Dagegen konnte in Reaktionen mit TAT_R49→1 eine Bande mit geringerer Elektromobilität beobachtet werden, was auf die Bildung eines Photovernetzungsprodukts schließen lässt (Abbildung 3A). Nachfolgend analysierten wir, ob die beobachteten Vernetzungen das Ergebnis einer $^1\text{O}_2$ -abhängigen Reaktion ist.

Der Zusatz von Natriumazid, einer bekannten Löschsubstanz von $^1\text{O}_2$,^[22] resultierte in einer Senkung der Vernetzungsausbeute von 20 auf 9%. Umgekehrt erhöhte der Zusatz von $^1\text{O}_2$ -stabilisierendem D_2O ^[23] die Ausbeute in konzentrationsabhängiger Weise, was die Entstehung der Vernetzungen als Resultat der Reaktion von **1**, $^1\text{O}_2$ und TAR bestätigte (Abbildung 3B).

Die Entdeckung von RNA-Bindungspartnern und das Kartieren von Protein-RNA-Wechselwirkungsflächen mithilfe unseres neuen Ansatzes erfordert eine Abhängigkeit der Vernetzungseffizienz von einer Komplexbildung und von der räumlichen Orientierung von **1**. Vernetzungsreaktionen mit TAT_R49→1 in Anwesenheit eines mit TAT konkurrierenden Peptids (aus den Aminosäuren 47–57 von TAT) führten zu verringerten Ausbeuten (6%), was die Abhängigkeit von der Komplexbildung aufzeigt. Zusätzlich exprimierten wir ein weiteres TAT-Konstrukt, wobei **1** in den N-Terminus des ARM eingefügt wurde (Abbildung 2B und C; TAT_ins47→1, ESI-MS: berechnet: 29811.0, gefunden: 29809.0 Da, $K_D = (1.34 \pm 0.41) \mu\text{M}$). TAT_ins47→1 zeigte 1.5-fach höhere Vernetzungsausbeuten als TAT_R49→1, was darauf schließen lässt, dass **1** in der Nähe der TAR orientiert ist und dass die Vernetzungsreaktivität tatsächlich durch eine unterschiedliche räumliche Orientierung von **1** im Vergleich zu TAT_R49→1 (siehe die Hintergrundinformationen) verändert ist.

Zusammenfassend präsentieren wir die erste genetisch kodierte Vernetzungsreaktion, die durch rotes Licht kontrolliert werden kann. Diese Strategie bietet eine hohe Eindringtiefe in Gewebe und eine Abhängigkeit von der Protein-RNA-Komplexbildung und der räumlichen Orientierung von **1** im Komplex, was sie für die Entdeckung und Kartierung von transienten Protein-RNA-Wechselwirkungen mit räumlicher und zeitlicher Auflösung qualifiziert. Sowohl die verwendete Wellenlänge als auch der Photosensibilisator werden in der PDT angewendet, und die Einführung von **1** ist flexibel in Bezug auf das Zielpeptid oder Protein sowie die Position und Zahl an Einbaupositionen. All das bietet eine vielversprechende Basis für die Entwicklung von RNA-gerichteten biologischen Therapeutika mit photoaktivierbaren Gefechtsköpfen für die PDT.

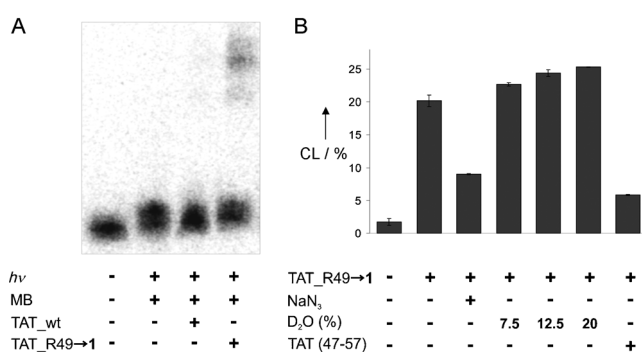


Abbildung 3. TAR-TAR-Photovernetzung mit rotem Licht. A) Denaturierende PAGE-Analyse der Photovernetzungsreaktion mit TAT_wt und TAT_R49→1. TAR-RNA wurde mit MB (8 Äquivalente des TAT-Konstrukts) und mit oder ohne TAT Konstrukt ($2 \mu\text{M}$) inkubiert und 2 min mit rotem Licht bestrahlt. B) Ausbeuten der TAR/TAT R49→1-Vernetzungsprodukte (CL) in Abbildung 3A in An- oder Abwesenheit von 4 mM Natriumazid (NaN_3), mit unterschiedlichen Anteilen an D_2O oder $6 \mu\text{M}$ eines synthetischen konkurrierenden TAT-Peptids. Proben wurden wie in Abbildung 3A behandelt.

Eingegangen am 28. Januar 2013
Online veröffentlicht am 19. März 2013

Stichwörter: Erweiterter genetischer Kode · Nichtkanonische Aminosäuren · Pyrrolsyt-tRNA-Synthetase · RNA-Erkennung · Vernetzungsreaktionen

- [1] J. F. Lovell, T. W. B. Liu, J. Chen, G. Zheng, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2839–2857.
- [2] C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 413–444.
- [3] a) J. W. Chin, S. W. Santoro, A. B. Martin, D. S. King, L. Wang, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9026–9027; b) A. Deiters, T. A. Cropp, M. Mukherji, J. W. Chin, J. C. Anderson, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11782–11783.
- [4] a) E. M. Tippmann, W. Liu, D. Summerer, A. V. Mack, P. G. Schultz, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2210–2214; b) C. J. Chou, R. Upreti, L. Davis, J. W. Chin, A. Deiters, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 480–483; c) T. Yanagisawa, N. Hino, F. Iraha, T. Mukai, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Mol. Biosyst.* **2012**, *8*, 1131–1135; d) M. Zhang, S. Lin, X. Song, J. Liu, Y. Fu, X. Ge, X. Fu, Z. Chang, P. R. Chen, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 671–677.
- [5] a) J. W. Chin, A. B. Martin, D. S. King, L. Wang, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11020–11024; b) J. W. Chin, T. A. Cropp, J. C. Anderson, M. Mukherji, Z. Zhang, P. G. Schultz, *Science* **2003**, *301*, 964–967.
- [6] a) C. Liu, A. L. Young, A. Starling-Windhof, A. Bracher, S. Saschenbrecker, B. V. Rao, K. V. Rao, O. Berninghausen, T. Mielke, F. U. Hartl, R. Beckmann, M. Hayer-Hartl, *Nature* **2010**, *463*, 197–202; b) S. Tagami, S. Sekine, T. Kumarevel, N. Hino, Y. Murayama, S. Kamegamori, M. Yamamoto, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Nature* **2010**, *468*, 978–982; c) P. Carvalho, A. M. Stanley, T. A. Rapoport, *Cell* **2010**, *143*, 579–591; d) I. S. Farrell, R. Toroney, J. L. Hazen, R. A. Mehl, J. W. Chin, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 377–384; e) H. S. Lee, R. D. Dimla, P. G. Schultz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5222–5224.
- [7] R. P. Sinha, D. P. Hader, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 225–236.
- [8] a) B. L. Feringa, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1987**, *106*, 469–488; b) K. Gollnick, A. Griesbeck, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 2057–2068; c) T. Montagnon, M. Tofi, G. Vassilikogiannakis, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1001–1011.
- [9] D. Noutsias, I. Alexopoulou, T. Montagnon, G. Vassilikogiannakis, *Green Chem.* **2012**, *14*, 601–604.
- [10] a) L. A. Peterson, *Drug Metab. Rev.* **2006**, *38*, 615–626; b) M. C. Byrns, C. C. Vu, L. A. Peterson, *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 1607–1613; c) L. Gingipalli, P. C. Dedon, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2664–2665; d) M. Op de Beeck, A. Madder, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 796–807.
- [11] a) A. M. Jawalekar, M. O. de Beeck, F. L. van Delft, A. Madder, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2796–2798; b) K. Stevens, A. Madder, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1555–1565.
- [12] M. Op de Beeck, A. Madder, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10737–10740.
- [13] a) 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; b) A. Gautier, D. P. Nguyen, H. Lusic, W. A. An, A. Deiters, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4086–4088; c) T. Fekner, X. Li, M. M. Lee, M. K. Chan, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1661–1663; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1633–1635; d) P. R. Chen, D. Groff, J. T. Guo, W. J. Ou, S. Cellitti, B. H. Geierstanger, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4112–4115; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4052–4055; e) T. Yanagisawa, R. Ishii, R. Fukunaga, T. Kobayashi, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 1187–1197; f) H. Neumann, S. Y. Peak-Chew, J. W. Chin, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 232–234; g) C. R. Polycarpo, S. Herring, A. Berube, J. L. Wood, D. Soll, A. Ambrogelly, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 6695–6700.
- [14] T. Plass, S. Milles, C. Koehler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3964–3967; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3878–3881.
- [15] a) T. Yanagisawa, R. Ishii, R. Fukunaga, T. Kobayashi, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *J. Mol. Biol.* **2008**, *378*, 634–652; b) J. M. Kavran, S. Gundllapalli, P. O'Donoghue, M. Englert, D. Soll, T. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 11268–11273.
- [16] T. Plass, S. Milles, C. Koehler, J. Szymanski, R. Mueller, M. Wiessler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4242–4246; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4166–4170.
- [17] C. E. Melançon III, P. G. Schultz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3845–3847.
- [18] a) D. B. Johnson, C. Wang, J. Xu, M. D. Schultz, R. J. Schmitz, J. R. Ecker, L. Wang, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1337–1344; b) D. B. F. Johnson, J. F. Xu, Z. X. 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.
- [19] a) T. Mukai, A. Hayashi, F. Iraha, A. Sato, K. Ohtake, S. Yokoyama, K. Sakamoto, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 8188–8195; b) Y. Huang, W. K. Russell, W. Wan, P. J. Pai, D. H. Russell, W. Liu, *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 683–686.
- [20] a) J. R. Thomas, P. J. Hergenrother, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1171–1224; b) L. R. Guan, M. D. Disney, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 73–86.
- [21] a) A. Davidson, T. C. Leeper, Z. Athanassiou, K. Patora-Komisarska, J. Karn, J. A. Robinson, G. Varani, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 11931–11936; b) S. J. Lee, S. Hyun, J. S. Kieft, J. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2224–2230; c) J. Pai, T. Yoon, N. D. Kim, I. S. Lee, J. Yu, I. Shin, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 19287–19296.
- [22] M. Y. Li, C. S. Cline, E. B. Koker, H. H. Carmichael, C. F. Chignell, P. Bilski, *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 760–764.
- [23] C. Schweitzer, R. Schmidt, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1685–1757.