



Michael Georg Hoesl, Stefan Oehm, Patrick Durkin, Elise Darmon, Lauri Peil, Hans-Rudolf Aerni, Juri Rappaport, Jesse Rinehart, David Leach, Dieter Söll und Nediljko Budisa*

Abstract: Der natürliche Satz an Aminosäuren innerhalb des genetischen Codes wurde durch kontinuierliche Evolution von *Escherichia coli* so modifiziert, dass diese in Gegenwart der synthetischen Aminosäure L- β -(Thieno[3,2-*b*]pyrrolyl)alanin ([3,2]Tpa) als alleiniges Surrogat zur kanonischen Aminosäure L-Tryptophan (Trp) wachsen. Mittels Langzeit-Kultivierung in synthetischem Nährmedium konnten Bakterien evolviert werden, die diese Substitution im Proteom an allen 20899 TGG-Codons im Genom von *E. coli* W3110 aufweisen. Die erzeugten Bakterien mit naturfremder Aminosäurezusammensetzung zeigen robustes Wachstum selbst in Abwesenheit von Tryptophan. Unsere Experimente stellen einen richtungweisenden Ansatz zur Evolution synthetischer Zellen mithilfe alternativer biochemischer Basiskomponenten dar.

Translationale Zweideutigkeit als ein grundlegender Mechanismus für die Flexibilität des genetischen Codes bietet einen guten Ansatzpunkt für die Entwicklung und Evolution eines alternativen Codes.^[1-3] Auf dieser Basis wagten wir den nächsten Schritt in Richtung der experimentellen Diversifizierung des genetischen Codes: der vollständigen Substitution einer kanonischen (cAA) gegen eine nichtkanonische Aminosäure (ncAA). Im Unterschied zu Ansätzen, die auf einer Stop-Codon-Suppression beruhen,^[4-6] zielten wir darauf ab, eine ncAA vollständig im kompletten Proteom zu manifestieren. Auch wenn bereits frühere Arbeiten in diese Richtung durchgeführt wurden,^[7-9] konnten wegen des Fehlens empfindlicher Analytik für eine umfassende Proteom-Analyse bislang keine abschließenden Belege für den proteomeitlichen Austausch mit einem nichtkanonischen Analogon erhalten werden.

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201502868
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201502868

Trp wurde vermutlich im Laufe der Evolution als letzte cAA zum genetischen Code hinzugefügt^[10] und erfordert von allen proteinogenen Aminosäuren den höchsten metabolischen Aufwand. Dies spiegelt sich im relativ seltenen Vorkommen in Proteinen (ca. 1 % oder etwa 20000-mal im gesamten *E. coli*-Proteom^[11]) wie auch in seiner Kodierung durch ein einzelnes Codon (UGG) wider. Weiterhin zeigt Trp einzigartige biophysikalische Eigenschaften, die ihm zahlreiche unterschiedliche Wechselwirkungen ermöglichen ($\pi \rightarrow \pi$ -Wechselwirkung, Wasserstoffbrücken, Kation- π -Wechselwirkung). Diese begründen die zentrale Bedeutung von Trp für Proteinstabilität und -faltung wie auch für Rezeptor-Liganden- und Enzym-Substrat-Wechselwirkungen. Folglich resultieren Trp-Substitutionen durch andere cAAs meist in gefalteten Proteinen oder inaktiven Enzymen, die letztlich zum Tod der Zelle führen. Die vielseitigen Möglichkeiten moderner Indolchemie jedoch eröffnen den Zugang zu zahlreichen potenziellen Analoga, die die Funktionen von Trp nach einer zellulären und genetischen Adaption der bakteriellen Zelle übernehmen könnten. Insofern lässt die Substitution von Trp in Proteinen durch ähnliche aromatische Systeme keine allzu schädlichen Auswirkungen auf die strukturelle und funktionelle Integrität der Zelle erwarten. Bereits 1956/1957 wurde die Möglichkeit der Inkorporation von 7-Azatryptophan und 2-Azatryptophan in Proteine beschrieben.^[12,13] Bis vor kurzem wurde Trp jedoch hauptsächlich nur in einzelnen, rekombinanten Proteinen durch verschiedene nichtkanonische Aza-, Fluor-, Amino- oder Hydroxytryptophane ersetzt.^[14]

Auf Proteomebene konnten Trp-auxotrophe *Bacillus subtilis*-Stämme, selektiert auf Wachstum in Gegenwart von 4-Fluortryptophan (4FTrp) als alleiniges Surrogat für Trp,

[*] Dr. M. G. Hoesl, M. Sc. S. Oehm, Dr. P. Durkin, Prof. Dr. N. Budisa
Institut für Chemie, Technische Universität Berlin
Müller-Breslau-Straße 10, 10623 Berlin (Deutschland)
E-Mail: nediljko.budisa@tu-berlin.de

Prof. Dr. J. Rappaport
Institut für Biotechnologie
Technische Universität Berlin (Deutschland)

Dr. L. Peil, Prof. Dr. J. Rappaport
Wellcome Trust Centre for Cell Biology
School of Biological Sciences
University of Edinburgh (Großbritannien)

Dr. H.-R. Aerni, Prof. Dr. J. Rinehart
Systems Biology Institute, Yale University (USA)

Prof. Dr. D. Söll
Department of Molecular Biophysics and Biochemistry
und Department of Chemistry, Yale University (USA)

Dr. E. Darmon, Prof. Dr. D. Leach
Institute of Cell Biology, School of Biological Sciences
University of Edinburgh (Großbritannien)

[**] Wir danken Laure Prat für Hilfe und Rat bei den Polyacrylamid-Harnstoffgelen und bei der Northern-Blot-Analyse, Traudi Wenger für ihre Arbeit beim Passagieren der Stämme sowie bei den phänotypischen Analysen, Nina Bach (TU München) für die Analyse von eGFP-H6([3,2]Tpa) mittels ESI-MS und Julia Forstner für logistische Unterstützung. Unser Dank gilt auch den finanziellen Förderern: dem von der Einstein-Stiftung unterstützten ARTCODE-Konsortium, dem EU-finanzierten METACODE-Konsortium FP7, dem UniCat-Exzellenz-Cluster der TU Berlin, der DFG-Forschergruppe 1805 (Ribosome Dynamics in Regulation of Speed and Accuracy of Translation), der DFG-Graduiertenschule „Fluor als Schlüsselement“ (GRK1582), dem National Institute for General Medical Sciences (von DS) und der Defense Advanced Research Projects Agency (Verträge N66001-12-C-4020 und N66001-12-C-4211 von DS).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (experimenteller Teil) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201502868> zu finden.

beschrieben werden.^[8] Allerdings wurde in diesen Versuchen ein „reiches“, synthetisches Nährmedium verwendet, das mit Vitaminen, Nukleobasen und Aminosäuren angereichert war. Diese Additive können gegebenenfalls schädliche Auswirkungen von 4FTrp auf die Proteinfunktionalität metabolisch kompensieren und somit den Selektionsdruck hin zu einem komplett veränderten und funktionalen Proteom abschwächen. Weiterhin wurden diese Stämme durch Verwendung eines Mutagens erzeugt, was eine eindeutige Genotypisierung erschwert. Eine andere Strategie, um *E. coli* an 4FTrp zu adaptieren, sieht vor, die Bakterien über einen längeren Zeitraum in Minimalmedium^[9] bei regelmäßiger Verdünnen zu kultivieren.^[15] Über den Zeitraum der Kultivierung wurde der Anteil an Trp schrittweise verringert, wobei gleichzeitig der Anteil an 4FTrp erhöht wurde. Die daraus hervorgegangenen Stämme konnten letztlich zwar in Gegenwart von 4FTrp wachsen, dies aber nur sehr limitiert (End-OD_{600nm} ≈ 0.1; OD_{600nm} = optische Dichte bei $\lambda = 600\text{ nm}$). Verunreinigungen (d.h. Spuren von Trp) in kommerziell erhältlichem 4FTrp waren zudem für eine signifikante Menge an restlichem Trp (ca. 90 nm) im abschließend verwendeten Kulturmedium verantwortlich. In der hier vorgestellten Arbeit lag der Fokus nun darin, einen *E. coli*-Stamm zu selektieren, der in Gegenwart eines Trp-Analogons in einem Minimalmedium ohne Spuren von kanonischem Trp wachsen kann. Um dies zu erreichen, wählten wir [3,2]Tpa als Analogon zu Trp (Abbildung 1) in unserem Evolutionsexperiment, da sein Synthe-

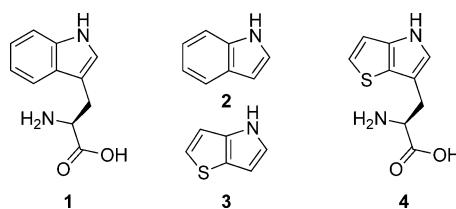


Abbildung 1. Strukturen von Tryptophan (Trp, 1), Indol (Ind, 2), β -Thieno[3,2-b]pyrrol ([3,2]Tp, 3) und L- β -(Thieno[3,2-b]pyrrolyl)alanin ([3,2]Tpa, 4).

seweg keine Indol- oder Trp-Intermediate enthält (siehe Hintergrundinformationen (SI)). Es ist bekannt, dass [3,2]Tpa translational aktiv ist, was durch die Inkorporation in einzelne Zielproteine bereits demonstriert werden konnte.^[16] In dieser früheren Studie bemerkten wir, dass das Ersetzen des Benzolrings von Trp durch Thiophen nicht nur gut von auxotrophen Zellen toleriert wurde, sondern dass [3,2]Tpa auch anteilig als Nährstoff für ein Wachstum der Zellen Verwendung fand.^[16]

In der vorliegenden Studie konnten wir eindeutig anhand von In-vitro- und In-vivo-Aktivierung sowie Aminoacylierungsexperimenten nachweisen, dass [3,2]Tpa ein gutes Substrat für die Tryptophanyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* ist (Sektion 3 der SI). Geeignete auxotrophe Stämme sind eine Voraussetzung, um einen Selektionsdruck hin zur Verwendung von Aminosäureanaloga durch die Zelle auszuüben. Wir wählten das *E. coli*-K12-W3110-Derivat CGSC# 7679.^[17] In diesem Stamm wurde das gesamte Trp-Operon entfernt

($\Delta trpLEDCBA$). In *E. coli*-Stämmen erfolgt die Aufnahme von Trp und dessen Analoga in die Zelle über aktiven Transport.^[18] Dieser Mechanismus bietet eine einfache Möglichkeit für die Zelle, die Aufnahme des betreffenden Analogs zu unterbinden und somit schädliche Auswirkungen des Einbaus in Proteine zu verhindern. Darum basierte unser experimenteller Ansatz auf Indol (Ind) und β -Thieno[3,2-b]pyrrol ([3,2]Tp; Abbildung 1), welche die bakterielle Zellmembran durch Diffusion überwinden.^[19] Um diese Vorstufen intrazellulär in Trp oder in [3,2]Tpa zu überführen, brachten wir das Plasmid pSTB7^[20] in CGSC# 7679 ein, das über eine Gensequenz für die Trp-Synthetase (TrpBA) aus *Salmonella typhimurium* verfügt. Diese ist bekannt für die effiziente Umsetzung von [3,2]Tp zu [3,2]Tpa. Der hierdurch für das Experiment erzeugte Ausgangsstamm *E. coli* K12 W3110 ($\Delta trpLEDCBA$) (pSTB7) wurde als MT0 bezeichnet.

Wir verwendeten New Minimal Medium (NMM) während des gesamten Evolutionsexperiments.^[21] Anfänglich enthielt das Nährmedium alle kanonischen Aminosäuren bis auf Trp (NMM19), um negative Auswirkungen auf die Biosynthesewege anderer cAAs durch [3,2]Tpa zu mildern. Zusätzlich können durch das Zufüttern von Aminosäuren höhere Zelldichten in der Kultur erreicht werden, die zum einen die Reduktion der Indolkonzentration im Medium beschleunigen und zum anderen zu kürzeren Generationszeiten führen, die zweifelsohne vorteilhaft für die anfängliche Adaption sind. Die Aminosäuren wurden anschließend schrittweise im späteren Verlauf des Versuchs entfernt, um schließlich bei einem reinen Minimalmedium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle zu enden (NMM0).

MT0-Zellen zeigten kein Wachstum in Gegenwart von [3,2]Tp (25 μM) ohne die Zugabe von Indol. Die zusätzliche Bereitstellung von 1 μM Indol genügte jedoch, um einen OD_{600nm}-Wert von 0.8–0.9 zu erzielen. Ausgehend von dieser Konfiguration begannen wir das Langzeit-Evolutionsexperiment durch regelmäßiges Re-Inokulieren der *E. coli*-Population in Flüssigkultur. Die Zellen wurden schrittweise dazu gezwungen, ihre Abhängigkeit von Trp aufzugeben: Die Indolkonzentration wurde beginnend mit 1 μM schrittweise bis auf null reduziert, wobei die Konzentration von [3,2]Tp bei 25 μM konstant belassen wurde (Abbildung 2).

Bereits nach 106-facher Passagierung (164 Kulturtage) konnte ein Wachstum in NMM19 ohne zugegebenes Indol beobachtet werden. Nach etwa 150 Passagierungen zeigte die maximale optische Dichte der Zellkultur keine stärkeren Schwankungen mehr und stabilisierte sich um einen OD_{600nm}-Wert von etwa 1.3. Ab Passage Nr. 170 (289 Kulturtage) begannen wir mit dem schrittweisen Entfernen von Aminosäuren aus dem Nährmedium. Für die Identifizierung von Aminosäuren, die nicht für das Wachstum der Kultur auf [3,2]Tp essenziell waren, teilten wir die vorhandenen 19 kanonischen Aminosäuren in metabolische Gruppen ein und entzogen diese Gruppen dem Medium kombinatorisch (Abbildung 2). Zum Ende des Experiments mussten einzelne Aminosäuren innerhalb der eingeteilten Gruppen jedoch auch gesondert entfernt werden (Sektion 5 der SI). Insgesamt waren sechs Stufen zur Entfernung der Aminosäuren notwendig. An dieser Stelle sei erwähnt, dass es uns nur durch Absenken der Kultivierungstemperatur von 37 auf 30°C

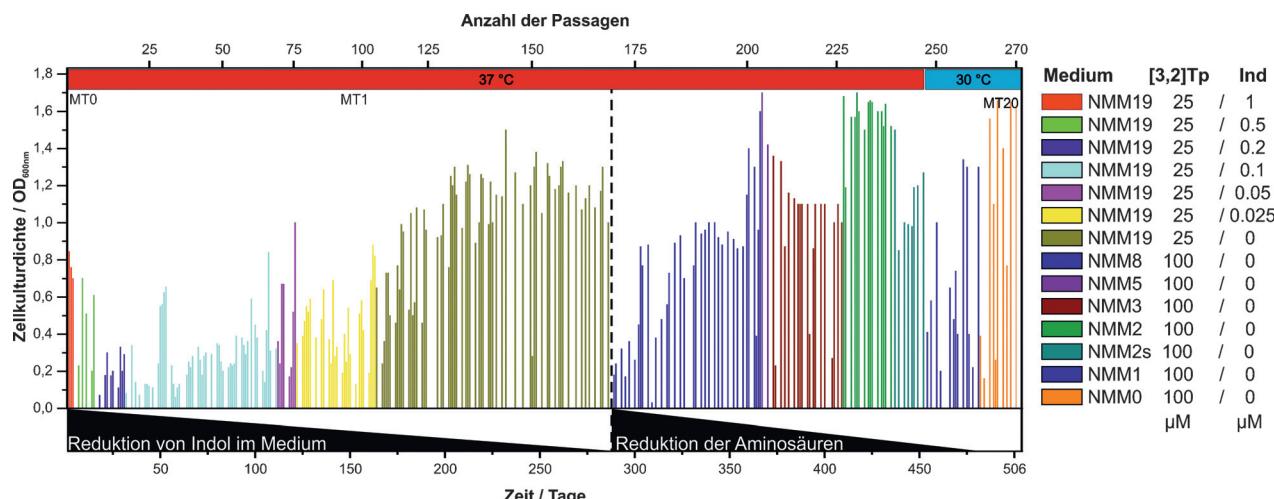


Abbildung 2. Adaption des *E.coli*-Stamms CGSC# 7679 (pSTB7) an [3,2]Tpa. Die obere Skala indiziert die Passagennummer, die untere Skala die verstrichene Zeit in Tagen. Zu jeder Passage wurden die OD_{600nm}-Werte erfasst. Die Wachstumstemperatur wurde während des Übergangs von NMM2 zu NMM1 von 37 auf 30°C gesenkt. Die verschiedenen Medienzusammensetzungen sind auf der rechten Seite vermerkt. Details zu den Medien siehe Sektion 4 der SI.

möglich war, ein Zellwachstum ohne die beiden zuletzt verbliebenen Aminosäuren Methionin und Histidin im Medium zu erreichen. Wir nehmen an, dass die Inkorporation von [3,2]Tpa zur Fehlfaltung von Enzymen führte, die für die Biosynthese dieser Aminosäuren unerlässlich sind.

Nach schließlich 264 Passagierungen erhielten wir eine *E.coli*-Population, die fähig war, in Mineralmedium mit Glukose (NMM0) und in Gegenwart von [3,2]Tpa zu wachsen. Der gesamte Vorgang der Adaption zum Wachstum mit [3,2]Tpa dauerte 506 Tage. Zu diesem Zeitpunkt wuchs die Kultur bis zu einem OD_{600nm}-Wert von rund 1.6 in etwa zwei Tagen (Abbildung 2).

Die Reinheit und genetische Identität der evolvierten Kultur wurden kontinuierlich durch Anzucht auf Agaroseplatten und PCR-Amplifikation (PCR = Polymerasekettenreaktion) ausgewählter Genregionen innerhalb des deletierten Trp-Operons und des Plasmids pSTB7 überprüft (Sektionen 6 und 7 der SI). Die Kultur war stets frei von Kontaminationen und behielt ihre Auxotrophie für Trp/[3,2]Tpa über den Zeitraum des gesamten Experiments bei.

Zu verschiedenen Zeitpunkten des Experiments isolierten wir robust wachsende Klone, um die verschiedenen Stufen der Evolution in unserer Dauerkultur zu dokumentieren (MT-Stämme). Das zuletzt entnommene Kulturisolat MT20 wächst bei 30°C in NMM0, das nur noch mit [3,2]Tpa supplementiert wurde. Es ist anzumerken, dass jedoch nach wie vor eine Präferenz für Indol besteht. Aus einem Vergleich der Wachstumskinetiken von MT0 und MT1, einem Isolat aus der mittleren Phase des Experiments, konnte ein leichter Anstieg der Verdopplungszeit von 24.4 zu 28.8 min bei 37°C in LB-Medium ermittelt werden. Weiterhin sank der OD_{600nm}-Wert von 3.5 in MT0 auf 2.2 in MT1 in einem Versuch mit einer Übernachtungskultur. Diese Werte lassen darauf schließen, dass der MT1-Stamm Mutationen erwarb, die seine relative Fitness in reicherem LB-Medium gegenüber jener des parentalen MT0-Stamms herabsetzen.

Zudem ergab ein Vergleich der Zellmorphologie zwischen ursprünglichen und evolvierten Bakterien, die in Gegenwart von [3,2]Tpa wuchsen, die Ausprägung verschiedener Phänotypen (Abbildung 3). Allgemein haben Bakterien des MT1-Kulturisolats eine länger gestreckte (ca. 1 μm) und weniger breite Zellform (ca. 0.1 μm). In NMM19 kultivierte MT1-Zellen erwiesen sich in Gegenwart von Indol außerdem als dünner. Dieser Befund könnte das Resultat der Adaption an ein stetig sinkendes Aminosäureangebot sein, das durch das Fehlen der kanonischen Aminosäure Trp eingeleitet wurde.^[22] Derzeit erfolgen umfassende mikroskopische und genomische Analysen, um mögliche physiologische Mechanismen hinter diesen Veränderungen in der Zellfitness zu beleuchten.

Um die Inkorporation von [3,2]Tpa anstelle von Trp im Proteom zu quantifizieren und um das Vorhandensein von Spuren an Trp oder auch genetische Reversion der Stämme auszuschließen, führten wir eine hochempfindliche Analyse mittels Gaschromatographie und MS/MS durch. Dafür nutzten wir frische MT-Isolate aus Glycerinkulturen, die in deren entsprechenden Kulturbedingungen neu angezogen wurden (Tabelle 1 sowie Sektionen 5 und 9 der SI).

Die MS/MS-Analytik wurde mit getrennt gewachsenen Kulturen in zwei verschiedenen Laboratorien und mit unterschiedlichen Messtechniken (Beispiel siehe Abbildung S5 der SI) durchgeführt. Beide Untersuchungen belegten unmittelbar den vollständigen, proteomweiten Austausch von Trp zu [3,2]Tpa. Wir analysierten die 20 häufigsten Peptide aus jeweils unterschiedlichen Proteinen mit je einer einzelnen Trp-Position (Sektion 8 der SI). Die Computer-gestützte Auswertung der MS/MS-Daten ergab, dass allein auf [3,2]Tpa kultivierte Zellen nur das Analogon im Proteom enthielten und keine Trp-haltigen Peptide detektiert werden konnten. Zusätzlich resultierte die heterologe Expression von eGFP in Medium mit [3,2]Tpa in seiner vollständigen Markierung, was durch ESI-MS bestätigt wurde (Sektion 7 der SI).

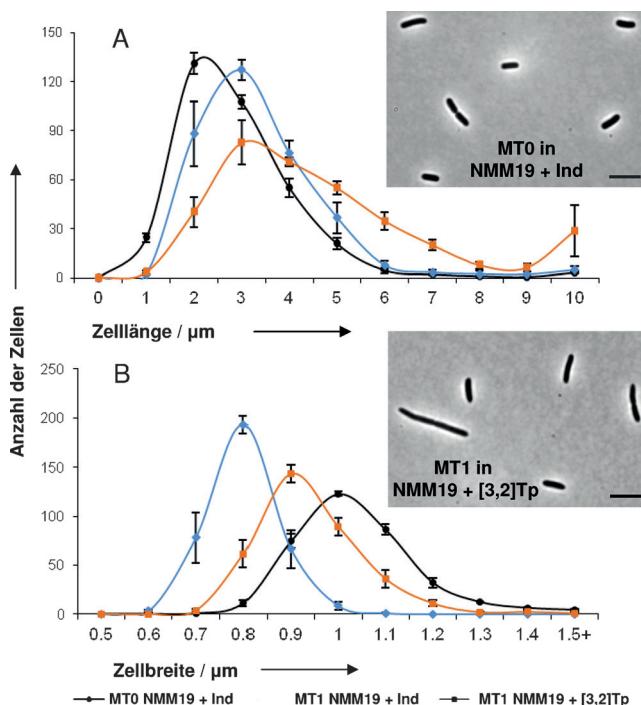


Abbildung 3. Morphologie und durchschnittliche Verteilung der Zelllänge (A) und -breite (B) von MT0 und MT1. Die Zellen wurden mikroskopisch vermessen. Die Stämme wurden in NMM19 entweder mit 100 μM Indol (schwarze Punkte: MT0; blaue Rauten: MT1) oder [3,2]Tp (orange Rechtecke: MT1) kultiviert. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes von vier Versuchen an (mit 350 Zellen je Versuch). Die Einschübe sind beispielhafte, hellfeldmikroskopische Aufnahmen der Kulturisolaten MT0 (0 μM [3,2]Tp/100 μM Indol) und MT1 (0 μM Indol/100 μM [3,2]Tp), die erst in NMM19 wuchsen und dann auf mit 1-proz. Agarose beschichtete Objektträger überführt wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm . Weitere Details siehe Sektionen 9 und 10 der SI.

Die Anwendung von hochempfindlicher GC/MS-Analytik ermöglichte uns die fundierte Schlussfolgerung, dass ein volliger Ausschluss von Trp im Proteom erreicht wurde (Tabelle 1). Wenngleich kein Indol mehr zum Kulturmedium hinzugefügt wurde, konnten in den Kulturisolaten MT1 und MT12 dennoch Spurenmengen an Trp detektiert werden. Dieser Befund mag der Tatsache geschuldet sein, dass die verwendeten Mediumkomponenten mehrheitlich aus biologischer Fermentation gewonnen werden und daher kleinste Verunreinigungen auftreten können.

Sobald keine Aminosäuren mehr zum Medium hinzugefügt wurden, verschwanden auch die detektierten Spuren von Trp (MT16–MT20). Daher demonstrieren diese GC/MS-Analysen im Rahmen des Detektionslimits unserer Methode und der verwendeten Messgeräte das vollständige Fehlen von Trp im Proteom der evolvierten Stämme. Es sollte jedoch auch erwähnt werden, dass wir keinen direkten Beweis für die Präsenz von [3,2]Tp durch GC/MS-Analytik erbringen konnten, da dieses vollständig im Hydrolyseschritt der Aminosäureanalyse zerfällt. Dies überrascht nicht, da Thienosurrogate von Trp weniger stabil sind (z.B. beträgt die aromatische Delokalisierungsenergie in Benzol 36 kcal mol⁻¹, bei Thiophen und Thiazol hingegen nur 29 bzw. 25 kcal mol⁻¹).^[23]

Tabelle 1: Nachweis des proteomweiten Einbaus von [3,2]Tp mithilfe von MS und Aminosäureanalyse.^[a]

Stamm ^[b]	MT0	MT0	MT1	MT20
<i>MS/MS:</i> ^[c]				
Trp [%]	99.5 \pm 1.2	99.7 \pm 0.5	0.6 \pm 0.8	0.5 \pm 0.8
[3,2]Tp [%]	0.5 \pm 1.2	0.6 \pm 0.5	99.4 \pm 0.8	99.5 \pm 0.8
<i>Aminosäureanalyse:</i> ^[d]				
Trp [%]	100 \pm 3.8	98.7 \pm 3.2	1.6 \pm 0.1	— ^[e]
<i>Medium:</i>				
Aa-Zugabe ^[f]	19	19	19	0
Ind [μM]	100	100	0	0
[3,2]Tp [μM]	0	25	25	100

[a] Die MT-Stämme wurden zu verschiedenen Zeitpunkten des Evolutionsexperiments isoliert (Abbildung 2) und spiegeln fortgeschrittene Phasen des Experiments wider. Eine erweiterte Version dieser Tabelle kann in den SI gefunden werden (Tabelle S5). [b] Stammdetails werden in den Sektionen 4 und 6 der SI aufgeführt. [c] Gefundene Peptidhäufigkeit von eingebautem [3,2]Tp und Trp, gemessen mit MS/MS. 20 der prominentesten Tryptophan-haltigen Peptide wurden für die Quantifizierung gewählt. [d] GC/MS-Analysen des hydrolysierten Proteoms sowie der veresterten und amidierten Aminosäuren. [e] Kein Peak detektiert im Chromatogramm. [f] Aminosäurezusammensetzung im Medium. Eine detaillierte Übersicht über die Mediumkomponenten ist in Sektion 4 der SI gegeben.

Wir haben Organismen erzeugt, deren Proteomzusammensetzung mithilfe eines Langzeit-Evolutionsexperiments von zunächst Trp zu [3,2]Tp verändert wurde. Der Ersatz wirkte sich dabei nicht signifikant negativ auf die zelluläre Fitness aus. Unser Experiment enthüllt die ausgeprägte evolutionäre Plastizität, welche die Substitution aller Tryptophane im Proteom von *E. coli* erst möglich machte. Derzeit untersuchen wir die Genome der evolvierten Stämme und erwarten (basierend auf vorherigen Arbeiten mit fluorierten Trp-Analoga^[8,9]), dass nur relativ wenige Proteine durch die Inkorporation von [3,2]Tp beeinträchtigt wurden.^[24]

Die genetische Verschlüsslung in lebenden Systemen beruht auf einer einheitlichen Chemie, bestehend aus den gleichen „Buchstaben“ oder Nukleotiden als polymere Informationsträger (DNA, RNA) und den 20 kanonischen Aminosäuren als „Bausteine“ für Proteine. Die Universalität des genetischen Codes ermöglicht den horizontalen Gentransfer über die Grenzen der biologischen Taxa hinweg, was ein hohes Maß an Standardisierung und Vernetzbarkeit erlaubt. Daher sind jedoch weitreichendere Änderungen der Chemie lebender Systemen in der Regel lethal.^[25–27]

In diesem Zusammenhang ist die Entwicklung einer Strategie zur Erweiterung des natürlichen, chemischen Standardrepertoires lebender Zellen eine der großen Herausforderungen für die Lebenswissenschaften im 21. Jahrhundert, um beispielsweise eine „genetische Firewall“ mithilfe gezielter oder evolutionärer Veränderung des genetischen Codes zu erzeugen.^[28–30] Zuletzt konnte bereits die Grenze zwischen nichtkanonisch und kanonisch mithilfe eines ebenfalls evolvierten *E. coli*-Stamms, in dessen Genom Thymin durch 5-Chloruracil ersetzt wurde, überschritten werden.^[31] Die genannte Arbeit markiert einen wichtigen Meilenstein in Richtung biologischer Systeme mit Xeno-Nukleinsäuren als Erbinformation.

Zwischen 30 und 40 Codons genügen wohl zur Kodierung der genetischen Information eines Organismus.^[32] Die große Anzahl verbliebener Codons (> 20) sollte also für eine Neuzuweisung zu ncAAs zur Verfügung stehen. Aktuelle Bestrebungen zur „Erweiterung des genetischen Codes“,^[33] die sich der Neuzuweisung von UAG- oder UGA-Stopp-Codons bedienen, sind dazu geeignet, künstliche Proteine mit einer oder wenigen eingebauten ncAAs mit fluoreszierenden oder reaktiven Gruppen für zahlreiche Anwendungen in vivo oder in vitro zu erzeugen. Ein proteomweiter Austausch von Aminosäuren auf diesem Wege ist jedoch nicht trivial. Unser Langzeit-Evolutionsexperiment mit einer *E.-coli*-Kultur führte zu einem Organismus, in welchem alle 20899 UGG-Codons neu codiert wurden, indem die natürliche Trp-tRNA^{Trp} zu einer ncAA-tRNA (d.h. [3,2]Tpa-tRNA^{Trp}) „rekodiert“ wurde. Dieses Beispiel für die proteomweite Substitution einer Aminosäure repräsentiert eine erhebliche „Erweiterung des genetischen Codes“ und einen weiteren Schritt in Richtung synthetischer Organismen.

Insgesamt erzielten Versuche zur Änderung der Interpretation der genetischen Information mithilfe chemisch veränderter Polymere (z.B. Xeno-Nukleinsäuren) oder auch durch Veränderungen im genetischen Code bereits erstaunliche Erfolge.^[34] Zukünftige Forschung sollte es ermöglichen, eine teilweise bis vollständige Neuausrichtung des biologischen Informationsflusses hin zu „neuen“ Versionen des genetischen Codes ausgehend von der „alten“^[25] biologischen Welt zu erschaffen.

Stichwörter: *Escherichia coli* · Kontinuierliche Evolution · Synthetische Biologie · Translation des genetischen Codes · Tryptophanaloge

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10030–10034
Angew. Chem. **2015**, *127*, 10168–10172

- [1] T. H. Jukes, S. Osawa, *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **1993**, *106*, 489–494.
- [2] S. Osawa, T. H. Jukes, K. Watanabe, A. Muto, *Microbiol. Rev.* **1992**, *56*, 229–264.
- [3] G. R. Moura, J. A. Paredes, M. A. S. Santos, *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 334–341.
- [4] C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Science* **1989**, *244*, 182–188.
- [5] R. Furter, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 419–426.
- [6] A. Dumas, L. Lercher, C. D. Spicer, B. G. Davis, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 50–69.

- [7] D. B. Cowie, G. N. Cohen, *Biochim. Biophys. Acta* **1957**, *26*, 252–261.
- [8] J. T. F. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 6303–6306.
- [9] J. M. Bacher, A. D. Ellington, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 5414–5425.
- [10] G. P. Fournier, E. J. Alm, *J. Mol. Evol.* **2015**, *80*, 171–185.
- [11] M. J. Lajoie et al., *Science* **2013**, *342*, 357–360.
- [12] A. B. Pardee, L. S. Prestidge, V. G. Shore, *Biochim. Biophys. Acta* **1956**, *21*, 406–407.
- [13] G. Brawerman, M. Ycas, *Arch. Biochem. Biophys.* **1957**, *68*, 112–177.
- [14] N. Budisa, P. P. Pal, *Biol. Chem.* **2004**, *385*, 893–904.
- [15] Z. D. Blount, C. Z. Borland, R. E. Lenski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 7899–7906.
- [16] N. Budisa, S. Alefelder, J. H. Bae, R. Golbik, C. Minks, R. Huber, L. Moroder, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1281–1292.
- [17] C. Yanofsky, V. Horn, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 4451–4456.
- [18] C. Yanofsky, V. Horn, P. Gollnick, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 6009–6017.
- [19] S. Piñero-Fernandez, C. Chimerel, U. F. Keyser, D. K. Summers, *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 1793–1798.
- [20] H. Kawasaki, R. Bauerle, G. Zon, S. A. Ahmed, E. W. Miles, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 10678–10683.
- [21] N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskorn, J. Kellermann, R. Huber, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 788–796.
- [22] N. Grossman, E. Z. Ron, C. L. Wolfringh, *J. Bacteriol.* **1982**, *152*, 35–41.
- [23] C. W. Bird, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 1409–1414.
- [24] A. C.-S. Yu, A. K.-Y. Yim, W.-K. Mat, A. H.-Y. Tong, S. Lok, H. Xue, S. K.-W. Tsui, J. T.-F. Wong, T.-F. Chan, *Genome Biol. Evol.* **2014**, *6*, 629–641.
- [25] P. Marlière, *Syst. Synth. Biol.* **2009**, *3*, 77–84.
- [26] M. Schmidt, *Bioessays* **2010**, *32*, 322–331.
- [27] C. G. Acevedo-Rocha, N. Budisa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6960–6962; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7094–7096.
- [28] D. J. Mandell, M. J. Lajoie, M. T. Mee, R. Takeuchi, G. Kuznetsov, J. E. Norville, C. J. Gregg, B. L. Stoddard, G. M. Church, *Nature* **2015**, *518*, 55–60.
- [29] A. J. Rovner et al., *Nature* **2015**, *518*, 89–93.
- [30] J. H. Campbell, P. O'Donoghue, A. G. Campbell, P. Schwientek, A. Sczyrba, T. Woyke, D. Söll, M. Podar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 5540–5545.
- [31] P. Marlière, J. Patrouix, V. Döring, P. Herdewijn, S. Tricot, S. Cruveiller, M. Bouzon, R. Mutzel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7109–7114; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7247–7252.
- [32] P. O'Donoghue, J. Ling, Y.-S. Wang, D. Söll, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 594–598.
- [33] J. W. Chin, *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83*, 379–408.
- [34] N. Budisa, *Curr. Org. Chem.* **2014**, *18*, 936–943.

Eingegangen am 30. März 2015,
veränderte Fassung am 19. Mai 2015
Online veröffentlicht am 1. Juli 2015