

Proteinbiosynthese

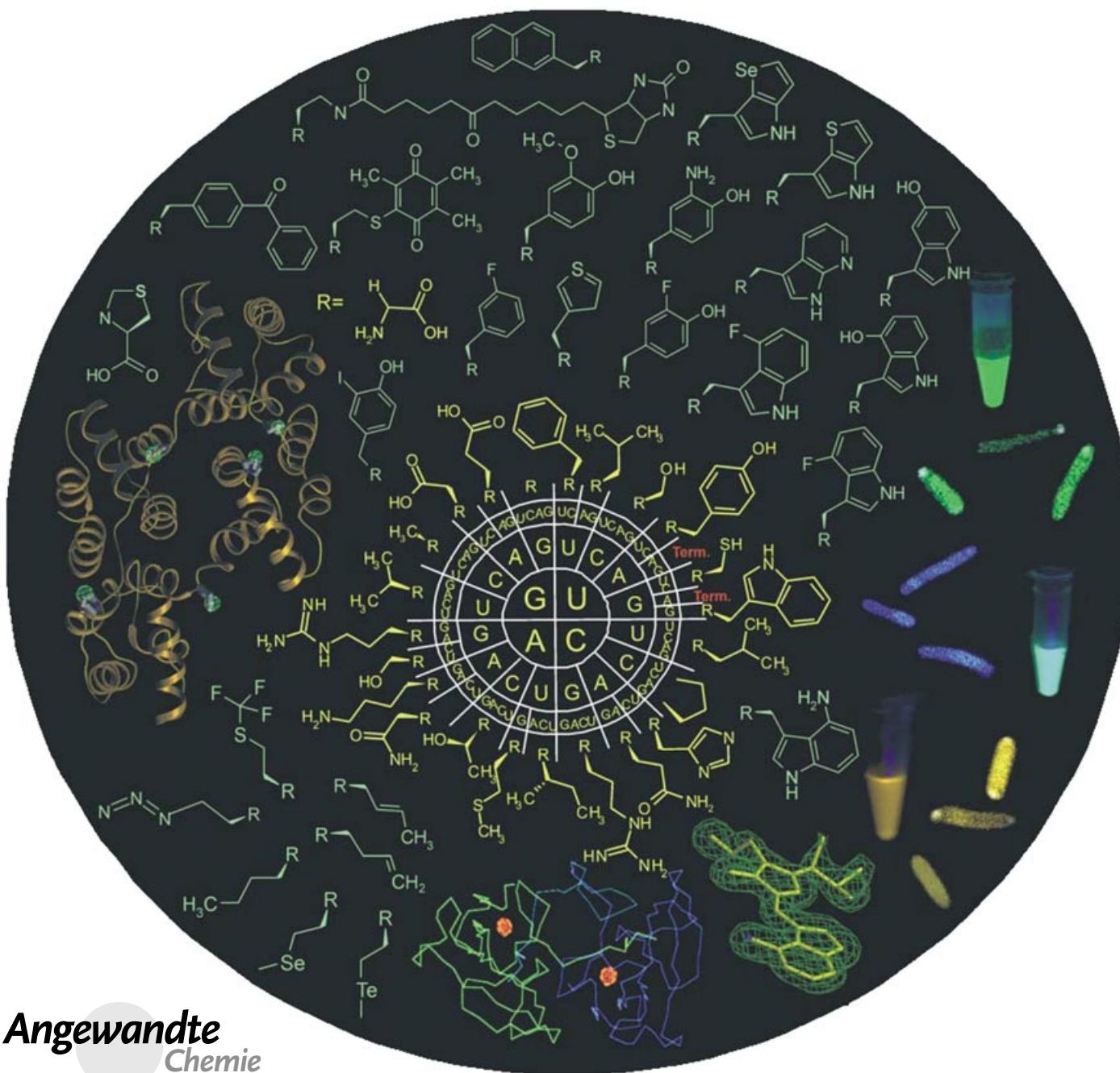
Prolegomena zum experimentellen Engineering des genetischen Codes durch Erweiterung seines Aminosäurerepertoires

Nediljko Budisa*

Stichwörter:

Aminosäuren · Biosynthese · Evolution ·

Genetischer Code · Proteine

**Angewandte
Chemie**

Die Proteinsynthese und ihre Verbindung mit dem genetischen Code spielten lange Zeit eine zentrale Rolle in der Biologie. Der schnelle experimentelle Fortschritt führte im vergangenen Jahrzehnt zu einer nahezu kompletten Beschreibung dieser Prozesse. Weitere wichtige Experimente ergaben Hinweise dafür, dass die natürliche Protein-Translationsmaschinerie neu programmiert werden kann, um viele nichtkanonische Aminosäuren genetisch zu codieren. Tatsächlich lassen die 20 kanonischen Aminosäuren, die im universellen genetischen Code verwendet werden, viele wünschenswerte Funktionalitäten vermissen, etwa Halogen-, Keto-, Cyan-, Azido-, Nitroso-, Nitro- oder Silylgruppen sowie C=C- oder C≡C-Bindungen. Die Fähigkeit, genetisch eine derartige chemische Vielfalt zu codieren, wird uns ermöglichen, lebende Zellen wie Bakterien neu zu programmieren, sodass sie maßgeschneiderte Proteine mit vielseitigen Funktionen exprimieren. An der Schnittstelle von Biologie, Chemie und Physik entwickelt sich mit dem Engineering des genetischen Codes ein aufstrebendes Forschungsgebiet.

„Wenn es uns gelingt, in dem dunklen Gebiet der organischen Natur auf einen lichten Punkt zu treffen, der uns wie einer der Eingänge erscheint, durch die wir vielleicht auf die wahren Wege zur Erforschung und Erkennung dieses Gebietes gelangen können, so hat man immer Ursache sich Glück zu wünschen, selbst wenn man sich der Unerschöpflichkeit des vorgesetzten Gegenstandes bewusst ist.“

F. Wöhler und J. Liebig, Ann. Pharm. 1833, 3, 249

1. Einführung

1.1. Das genetische Programm und die Naturgesetze

Das Leben ist ein fortwährendes Wechselspiel zwischen einem autonomen, sich selbst erhaltenden System aus organischer Materie und seiner physikochemischen Umgebung. Zwei Rahmenbedingungen schränken diesen Prozess ein: die Naturgesetze, die deterministischen Gesetze der Chemie und der Physik, sowie das genetische Programm, das alle biologischen Aktionen und Phänomene bestimmt. Die Existenz eines solchen genetischen Programms unterscheidet lebende von nichtlebender Materie:^[1] Nucleinsäuren codieren Informationen, die von Proteinen repliziert werden.

Die genetische Information wird durch Sequenzen genau festgelegt, durch die Abfolge der Basen in Nucleinsäuren und durch die Aminosäuresequenz in Proteinen. Die in der Desoxyribonucleinsäure (DNA) enthaltene Information kann als regulatorische DNA gespeichert werden, in Ribonucleinsäure (RNA) überführt werden und dort wiederum in Form von tRNA, rRNA, snRNA, tmRNA, etc. gespeichert werden. Auch lässt sich die Information von der Messenger-

Aus dem Inhalt

1. Einführung	6587
2. Charakteristika und Voraussetzungen der zellulären Proteinsynthese	6589
3. Traditionelle Auxotrophie-Methoden	6592
4. Möglichkeiten und Grenzen des Selektionsdrucks: Engineering eines zweiten Codes	6599
5. Suppressionsbasierte Methoden	6605
6. Weitere Aspekte eines erweiterten Aminosäurerepertoires	6610
7. Einige praktische Anwendungen nichtkanonischer Monomere	6613
8. Die Zukunft des Engineerings des genetischen Codes	6618

RNA (mRNA) zurück in DNA schreiben (durch eine reverse Transkriptase) oder von der RNA (über mRNA) weiter auf ein Protein übertragen. Das ursprünglich von Crick formulierte „zentrale Dogma“ der Molekularbiologie^[2] war die erste Hypothese, die die Richtung des Transfers genetischer Information in Lebewesen vorhersagte. Es besagt, dass „der Transfer der Information von Nucleinsäure zu Nucleinsäure oder von Nucleinsäure zu Protein möglich ist, dass aber der Transfer von Protein zu Protein oder von Protein zu Nucleinsäure unmöglich ist.“ Dieser Transfer wird vom genetischen Code durch ein Regelwerk bestimmt, das der Sequenz von Basentriplets in Nucleinsäuren (Polynucleotiden) genau eine Aminosäuresequenz in Proteinen (Polypeptiden) zuordnet. Durch die Aufklärung des in Triplets gruppierten genetischen Codes^[3,4] wurde klar, wie die colinearen Nucleinsäuresequenzen die Information für lineare Aminosäuresequenzen beherbergen. Heute zählt es zum biochemischen Grundwissen, dass die zwanzig Standard- oder auch kanonischen Aminosäuren durch 61 codierende Triplet-Kombinationen und drei Stop-Signale zugewiesen werden (Abbildung 1).

[*] Dr. N. Budisa

Max-Planck-Institut für Biochemie
Selbständige Nachwuchsgruppe „Molekulare Biotechnologie“
Am Klopferspitz 18a
82152 Martinsried bei München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-8578-3516
E-mail: budisa@biochem.mpg.de

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

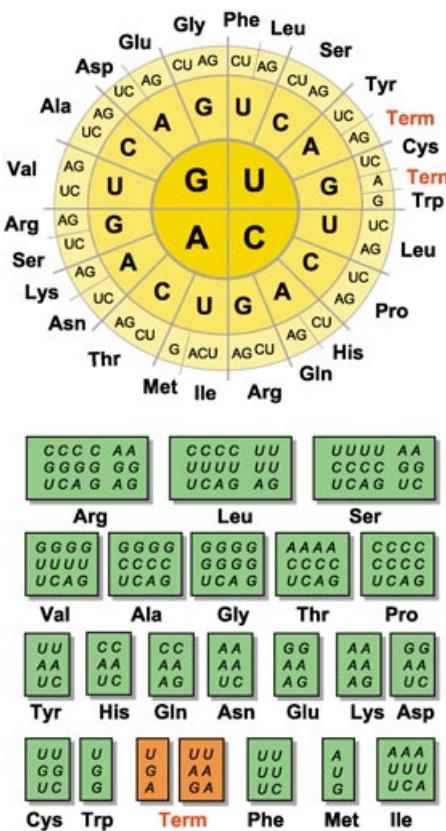


Abbildung 1. Die Struktur des genetischen Codes. Zwanzig Aminosäuren werden von 61 Triplet-Codierungseinheiten („Sense“-Codons) codiert, die übrigen drei Codons (UAA, UGA, UAU) wirken als Stop-Signale bei der Proteintranslation („Nonsense“-Codons). Das Ensemble der 20 kanonischen Aminosäuren ist das Ergebnis der evolutionären Zuordnung von codierenden Triplets oder Codonfamilien zu bestimmten Aminosäuren (unten). Bemerkenswert ist die Zuordnung mehrerer redundanter Synonymcodons zu streng polaren und unpolaren Aminosäuren: Arg, Ser (XGX-Codons), Leu und anderen hydrophoben Aminosäuren (XUX-Codons). Met (AUG) und Trp (UGC) ist dagegen nur jeweils ein codierendes Triplet zugeordnet.

1.2. Was ist das Engineering des genetischen Codes?

Experimentelle Ansätze zur Erweiterung der Auswahl von Aminosäuren, die als Grundbausteine in der ribosomalen Proteinsynthese stehen, werden in der Literatur mit unterschiedlichen Namen bezeichnet. Beispiele hierfür sind „erweiterter Anwendungsbereich der Proteinsynthese“ („expanded scope of protein synthesis“),^[5] „erweitertes Aminosäurerepertoire“ („expanded amino acid repertoire“),^[6] „erweiterter genetischer Code“ („expanded genetic code“),^[7] „tRNA-vermitteltes Protein-Engineering“ („tRNA mediated protein engineering“, TRAMPE)^[8] und „ortsspezifischer Austausch gegen nichtnative Aminosäuren“ („site-directed non-native amino acid replacement“, SNAAR).^[9]

Alle Ansätze haben eine experimentelle Neucodierung, ein Überlesen („readthrough“) oder Veränderungen in der Bedeutung codierender Triplets im universellen genetischen Code gemeinsam. Prinzipiell kann man das experimentelle Überlesen entweder durch die Neufestlegung evolutionär zugewiesener codierender Triplets (Sense-Codons) oder durch das Unterdrücken von Stopp-Triplets (UGA, UGG, UGU) oder Nicht-Triplet-Codierungseinheiten erreichen. In Bezug auf die Proteinexpression wird dies durch die Steuerung von Umgebungsfaktoren (d.h. durch Selektionsdruck) und/oder durch den Zusatz neuer Translationskomponenten möglich. Das Ergebnis dieser experimentellen Eingriffe in den universellen genetischen Code ist eine erhöhte Codierungskapazität durch die Erweiterung des Aminosäurerepertoires. Mit anderen Worten, die Änderungen in der Interpretation des genetischen Codes erweitern die Bandbreite der ribosomalen Proteinsynthese. Der Ausdruck „Engineering des genetischen Codes“ vereint alle diese Aspekte, denn er bezieht sich explizit auf Experimente mit dem Ziel, die Interpretation des universellen genetischen Codes und somit die Struktur des Codes durch die Einführung neuer Codierungseinheiten zu verändern.

1.3. Engineering des genetischen Codes: Terminologie

Das Engineering des genetischen Codes bezieht viele Disziplinen ein. Daher ist es schwierig, einen umfassenden Überblick über dieses Gebiet zu erhalten. Beispielsweise bringt das Teilgebiet Genetik eine sehr komplexe Terminologie ein. Weit verbreitete Begriffe wie „Funktionelle Genomik“ oder „Proteomik“ decken die Genwirkungen und -wechselwirkungen für das Genom bzw. Proteom ab, und dabei werden wenigstens vier Komplexitätsebenen unterschieden: Gene (das Genom), Messenger-RNA (das Transcriptom), Proteine (das Proteom) und der Stoffwechsel (das Metabolom).^[10] Noch komplizierter wird es, wenn weitere Aspekte berücksichtigt werden, etwa posttranskriptionale Modifikationen oder pharmakologische Eigenschaften, da jedes dieser Forschungsgebiete seine eigene Terminologie verwendet.

Bislang gibt es keine allgemein akzeptierte Nomenklatur für das Code-Engineering. Eine vereinfachte Terminologie^[6] unterteilt die Aminosäuren in zwei Hauptgruppen: kanonische und nichtkanonische. Andere Systeme unterscheiden beispielsweise zwischen verwandten (cognate) und nichtverwandten, codierten und nichtcodierten, proteinogenen und nichtproteinogenen, Standard- und Nicht-Standard-, natürlichen/unnatürlichen/nichtnatürlichen, speziellen kanonischen Aminosäuren und biogenen Aminosäuren. Isostere Amino-



Nediljko Budisa, geboren 1966 in Sibenik (Kroatien), studierte Chemie, Biologie, Molekularbiologie und Biophysik an der Universität Zagreb (Kroatien). Seine Doktorarbeit führte er in der Gruppe von Robert Huber am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durch. Nach seiner Promotion (Technische Universität München, 1997) blieb er als Postdoc bei Robert Huber und Luis Moroder in Martinsried, wo er 2000 eine Forschungsgruppe für „Protein-Engineering“ übernahm und jetzt eine Nachwuchsguppenleiterstelle („Molekulare Biotechnologie“) innehat. Derzeit schließt er seine Habilitation an der TU München ab.

säuren oder solche, die den kanonischen ähneln, bezeichnet man als Analoga oder Surrogate; ihr Einbau in Proteine kann positionsspezifisch (dirigiert durch die Neuzuweisung seltener Codons sowie durch Unterdrücken von Stopcodons oder Codierungseinheiten mit verschobenem Leseraster (framshifted coding-units)) oder multipositionell erfolgen (üblicherweise dirigiert durch die Neuzuweisung gemeinsamer codierender Triplets oder ganzer Codon-Familien in der Target-Sequenz).

1.4. Wege zu einem erweiterten Aminosäurerepertoire

Die aktuellen methodologischen Entwicklungen zur künstlichen Erweiterung des genetischen Codes lassen sich zwei gleichermaßen viel versprechenden Ansätzen mit unterschiedlichen Traditionen zuordnen. Der erste Ansatz, der auf der Verwendung auxotropher Stämme beruht, lässt sich auf ein klassisches Experiment von Cowie und Cohen im Jahre 1957 zurückführen.^[11] Es beruhte auf klassischer Genetik mit Brüten, Konstruktion von Stämmen und Selektion gezielt induzierter genetischer Variationen in intakten exprimierenden Wirtszellen, die durch kontrollierte Bedingungen und Manipulation, also durch einen externen Selektionsdruck, zu „falschem“ Einbau veranlasst werden. Dieser experimentelle Ansatz wird üblicherweise als Codon-Neuzuordnung und Mehrfacheinbau (multiple-site mode of incorporation) bezeichnet.

Der zweite Ansatz geht ebenfalls auf frühe Experimente zurück, bei denen versucht wurde, den genetischen Code und die Proteinsynthese aufzuklären. Das bekannteste Beispiel ist die klassische Entdeckung von Chapeville et al.,^[12] die 1962 zeigten, dass sich misacylierte tRNAs (tRNAs, die nichtverwandte Aminosäuren enthalten) – im Einklang mit der Adapter-Hypothese – an der Knüpfung von Peptidbindungen am Ribosom beteiligen können. Diese Entdeckung kann man als die Geburtsstunde derjenigen experimentellen Ansätze bezeichnen, bei denen hauptsächlich tRNAs mit veränderter Identität, in der Regel Suppressor-tRNAs, zum Einsatz kommen. Durch die Verwendung chemisch oder enzymatisch aminoacylierter tRNAs wird die ursprüngliche Bedeutung der Codierungseinheiten unterdrückt. Diese suppressionsbasierten Methoden werden gewöhnlich mit einem positionspezifischen Einbau verbunden.

1.5. Thema dieses Aufsatzes

In diesem Aufsatz werde ich die Bedeutung von Selektionsdruckmethoden für das Engineering des genetischen Codes in einem weiten Zusammenhang diskutieren.^[6,13–17] Dies ist notwendig, da keine neueren umfassenden und kritischen Aufsätze zu diesem Thema vorliegen. Der Überblick über das gesamte Gebiet wird durch eine systematische Beschreibung suppressionsbasierter Methoden abgerundet. Wieviele verschiedene Teilgebiete von Chemie und Biologie dieses neue Forschungsgebiet berührt, wird am Beispiel aktueller Fragestellungen aus der biologischen Chemie gezeigt. Außerdem sollen taxonomische Unklarheiten geklärt,

potenzielle zukünftige Forschungsgebiete vorgestellt und auch mögliche Einflüsse des Code-Engineerings auf die Gesellschaft berücksichtigt werden.

Viele der beschriebenen Untersuchungen des Code-Engineering stützen sich auf die Chemie von *Escherichia coli*, da dieser Mikroorganismus in der Biochemie nach wie vor das wichtigste Modell für die Proteinexpression ist. Eine Hauptaufgabe zukünftiger Experimente wird es sein, das Engineering des genetischen Codes in eukaryotischen Zellen im größeren Ausmaß möglich zu machen, da sich hieraus sicherlich aufregende Einblicke und Konzepte ergeben werden. Verwandte Gebiete wie Proteinmodifikationen, Peptidsynthese, rekombinant exprimierte Proteine und native Ligation sowie der In-vitro-Einsatz chemisch misacylierter tRNAs werden nicht behandelt, da bereits zahlreiche Aufsätze und Bücher zu diesen Themen zur Verfügung stehen.

2. Charakteristika und Voraussetzungen der zellulären Proteinsynthese

2.1. Chemie und Metabolismus kanonischer und nichtkanonischer Aminosäuren

Einer der größten Erfolge in der Biochemie des 19. Jahrhunderts war das Konzept des Stickstoffhaushalts,^[18] das eng mit dem Aminosäurestoffwechsel verbunden ist. Erst nach der Einführung der radioaktiven Markierung bei metabolischen Untersuchungen wurde klar, dass dieses Konzept das Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und -abbau beschreibt. Als Folge dieser Balance findet man Aminosäuren in lebenden Organismen in freier Form (modifiziert oder nichtmodifiziert), kovalent in Peptiden und Proteinen integriert oder mit anderen Strukturen konjugiert. Viele Organismen haben im Zuge der Evolution spezifische Methoden zur Verarbeitung von Aminosäuren entwickelt. Daher lassen sich viele Entdeckungen in *Escherichia coli* bezüglich 1) der Mechanismen der Aminosäuresynthese, 2) ihrer chemischen Eigenschaften und 3) ihres intrazellulären Transports sowie ihrer Freisetzung gleichsam auf Säugetierzellen und andere Zelltypen anwenden.^[19] Im Allgemeinen werden Aminosäuren entweder metabolisch hergestellt oder durch aktiven Transport in Gewebe eingeführt. Sie können unterschiedliche Stoffwechselwege durchlaufen: Bei ihrer Desaminierung entstehen Ketosäuren, die wiederum in Form von Pyruvat oder Acetyl-CoA in den glycolytischen Abbau oder in den Krebs-Zyklus eintreten. Darüber hinaus dienen sie als Grundbausteine der Proteinsynthese sowie als wichtige Komponenten in der Biosynthese von zahlreichen bioaktiven Molekülen, z.B. Nucleinsäuren, Glutathion, Nicotinamidsphingosinen, Porphyrin-Derivaten, metabolischen Cofaktoren, Neurotransmittern und Pigmenten.^[10]

Unter physiologischen Bedingungen sowie unter Gleichgewichtsbedingungen im Wachstumsmedium bleiben die Aminosäurekonzentrationen des intrazellulären Vorrats konstant – Schwankungen und Veränderungen sind lediglich von der Zellzyklusphase abhängig.^[20] Der Transport von Aminosäuren durch die Plasmamembran ist ein aktiver Prozess, der

durch Membranpermeasen vermittelt wird, die entsprechend ihrer Präferenzen für bestimmte Aminosäuren gruppiert sind. Lebende Zellen prüfen viele Substanzen, die ihren Stoffwechsel stören könnten. Ihre Transportsysteme sind vergleichsweise promiskuitiv, d.h. sie können nicht zwischen chemisch und sterisch ähnlichen Aminosäuren (und anderen kleinen Molekülen) unterscheiden. So kommt es, dass die Zellen der Aufnahme schädlicher Substanzen Tribut zollen müssen.^[19] Es ist also zu erwarten, dass nichtkanonische Aminosäuren ebenso eingelagert werden wie kanonische.

Aufgrund der mangelnden Spezifität bei den zellulären Aufnahmemechanismen würde eine bestimmte Zelle mit den D- und L-Formen ähnlich oder sogar identisch verfahren und das Eindringen aller Arten von kleinen Molekülen zulassen, wodurch sich intrazelluläre Vorräte an β -Imino-, β - und γ -Aminosäuren, cyclischen Formen, usw. bilden könnten. Sind derartige Substanzen erst einmal ins Cytosol gelangt, so kann dies Auswirkungen auf eine Vielzahl physiologischer Funktionen haben. Im Allgemeinen haben diese Aminosäuren mehrere Effekte: 1) Sie beeinflussen die Aminosäurebiosynthese, 2) sie wechselwirken mit katabolischen Enzymen, 3) sie wirken als mechanismusbasierte irreversible Enzyminhibitoren, 4) sie stören den Transport und die Speicherung von Aminosäuren und 5) sie nehmen als Substrate bei der Proteinsynthese an der Translation teil (d.h. sie werden in den genetischen Code aufgenommen).^[19,21]

2.2. Warum gibt es nur 20 kanonische Aminosäuren?

Numerum combinationum in terminis etiam numero finitis esse infinitum; si rite omnia expendantur. In ipso immenso combinatorium numero in immensum plures esse combinaciones inordinatas, quam ordinatas.

(Eine gründliche Untersuchung enthüllt die unendliche Zahl der Kombinationen aus einer endlichen Zahl von Termen. Unter dieser Vielzahl von Kombinationen sind viel mehr Vertreter ohne Ordnung als solche mit Ordnung.)

R. J. Boscovich *Theoria philosophiae naturalis redacta ad unicam legem virium in natura existentium*, Venetiis, Ex Typographia Remondiana, **1763**, S. 254–256.

Der Aufbau polymerer Moleküle aus Bausteinen nach definierten Kombinationsregeln führt unausweichlich zu kombinatorischen Explosionen.^[22] Die Zahl der monomeren Bausteine ist begrenzt, wohingegen die aus ihnen gebildeten Polymere schnell eine große Gruppe bilden. Die organisierten polymeren Strukturen in Lebewesen entstehen unter Nichtgleichgewichtsbedingungen in einem Selbstorganisationsprozess, der durch Selbstvergrößerung oder kooperative Effekte erleichtert wird.^[23] Diese Strukturen werden um ein Templat herum aufgebaut, und die Wahl ihrer Grundbausteine richtet sich nach den biologischen Funktionen, die sie nach der Implementierung erfüllen sollen. Im Laufe der Evolution haben sich bei diesem Aufbauprozess bestimmte Struktur-Funktions-Einheiten aufgrund ihrer Selektionsvorteile durchgesetzt. Diesbezüglich stellen sich folgende Kernfragen:

Welche grundlegenden Eigenschaften sollten die Polymere haben? Wodurch werden ihre Größe, Vielfalt und Komplexität beschränkt?

Vor einigen Jahrzehnten beschäftigten sich Miller und Weber^[24] mit dem hypothetischen Szenario der unabhängigen Entstehung von Leben auf einem anderen Planeten, bei der Proteine als Katalysatoren wirken sollten. Welche Verbindungen kämen als Grundbausteine für die Synthese der Proteine infrage? Auf der Grundlage von physikochemischen, genetischen und historischen Beweisführungen^[25] folgerten Miller und Weber, dass etwa zwei Drittel der Grundbausteine ihrer physikochemischen Natur nach mit ihren Äquivalenten auf der Erde übereinstimmen würden. Diesem Konzept zufolge wären solche Aminosäuren vom Code ausgeschlossen, die ungünstige Effekte auf Struktur, Stabilität und Funktion der Proteine haben. Der Ausschluss anderer Aminosäuren, die diese Bedingung nicht verletzen, ist höchstwahrscheinlich historisch bedingt, etwa durch ihre mangelhafte Verfügbarkeit oder dadurch, dass der Zeitrahmen der Evolution nicht ausreichte, um sie durch Biosynthese herzustellen.^[26]

Daher ist die Antwort auf die Frage, warum das Standardrepertoire des universellen genetischen Codes nur aus 20 Aminosäuren besteht, evolutionär begründet. Die Entwicklung dieses Standardsatzes war sicherlich ein historischer Prozess, ein evolutionärer Engpass, auf den alle Codierungseigenschaften zurückgeführt werden können.^[27] Dieses Ereignis wurde bildlich als „letzter universeller gemeinsamer Vorfahre“^[28] oder als „Progenote“ lokaler Populationen^[29] beschrieben. Mit anderen Worten, in ihrer evolutionären Entwicklung hatten die Lebewesen eine Stufe erreicht, von der aus eine Erweiterung des Aminosäurereservoirs (d.h. eine weitere Einführung oder Neuzuordnung von codierenden Triplets) ohne letale Folgen nicht mehr möglich war. Das ist insofern verwunderlich, als die Komplexität von Genom und Proteom evolutionär fortgeschritten eukaryotischer Zellen eine weitere funktionelle Diversifizierung durchaus zulässt, wie an anderer Stelle bereits ausführlich diskutiert wurde.^[27]

In dieser Hinsicht kann man das Aminosäurereservoir des genetischen Codes als konserviert bezeichnen. Kanonische Aminosäuren als die grundlegenden Monomere von Proteinstrukturen ermöglichen es, durch Faltung angemessen stabile und funktionelle Strukturen mit ausgewogenen und optimierten Sequenzen aufzubauen. Dabei sind sie vollkommen in den Zellstoffwechsel und die Bioenergetik integriert. Als ein Ergebnis dieser evolutionären Optimierung sind charakteristische Faltungsmuster und stabile Konformationen in Proteinen trotz großer Variationen in ihren Sequenzen größtenteils erhalten worden.

Obwohl das Code-Repertoire derart streng konserviert ist, ist es seit Jahrzehnten durch einfache Experimente mit gewissen Einschränkungen möglich, im gesamten Proteom eine kanonische Aminosäure durch eine ähnliche nichtkanonische zu ersetzen. Dieses Verfahren greift den einfachen Experimenten mit Selektionsdruck vor, die auf einer Kombination aus Phänotypselektion (Zellen mit verändertem Stoffwechsel, z.B. Auxotrophe), bestimmten Fermentationsbedingungen und einer gesteuerten Zufuhr von Aminosäuren

beruhen. Die rekombinante DNA-Technologie macht dies für einzelne Proteine möglich (siehe Abschnitt 3.4).

Entwirft man experimentell „intrinsische“ Codonnezuordnungen, so sollten diese auch chemisch plausibel sein. Für jede Aminosäure, die für den Einbau in einen „maßgeschneiderten“ genetischen Code „privilegiert“ ist, gelten Auswahlkriterien wie Polarität, Hydropathie, Molekülvolumen, isoelektrischer Punkt oder die Position in der Proteinstruktur mit optimiertem Codonemplat. Entsprechend wird ein Selektionsdruckexperiment die Tatsache nutzen, dass ausreichend Spielraum für eine Erweiterung des genetischen Codes zur Verfügung steht.

2.3. Grundlegende Merkmale der ribosomalen Proteinsynthese

Die an der Replikation, Transkription, Aminoacylierung und Translation beteiligten Gene sind in den Lebensreichen nahezu universell konserviert. Die Proteinsynthese, ein Schlüsselschritt bei der Umsetzung der genetischen Information, vollzieht sich in allen Organismen an den Ribosomen. Diese übersetzen die genetische Information, die zuvor von der DNA-Vorlage in eine mRNA umgeschrieben wurde (Kopie des Templatzes), in die Aminosäuresequenz eines Proteins. DNA-Replikation, RNA-Transkription und Proteintranslation sind voneinander unabhängige Prozesse, die der richtigen Faltung eines Zielproteins^[6] zugrunde liegen (siehe Abbildung 2).

Die Proteintranslation wird durch zwei molekulare Erkennungssignale gekennzeichnet: eine Codon-Anticodon-Wechselwirkung zwischen tRNA und mRNA im Ribosom (genau genommen ist dies die Translation der genetischen Information) sowie eine spezifische Selektion der Aminosäuresubstrate durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen.

sen^[30] (die Interpretation des genetischen Codes). Die Translation der genetischen Information beruht somit auf Nucleinsäure-Nucleinsäure-Wechselwirkungen (Basenpaarung), ihre Interpretation auf Enzym-Substrat-Wechselwirkungen^[31] mit der Aminoacyl-tRNA-Synthetase (aaRS), in Ausnahmefällen auch mit anderen Enzymen. Die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen reagieren im zweiten Erkennungssignal, der tRNA-Aminoacylierung, hoch spezifisch für bestimmte Aminosäuren und ihnen verwandte tRNA-Isoacceptoren. Daher spielen die aaRSs und tRNAs eine zentrale Rolle bei der Translation,^[32] indem sie die Aktivierung der Aminosäuren und die korrekte Biosynthese von Aminoacyl-tRNAs, den unmittelbaren Vorstufen der codierten Proteine, katalysieren.

Die Transfer-RNA übernimmt die Rolle eines Adapters zwischen Aminosäuren und mRNA-Molekülen,^[2] da sie die in der Nucleotidsequenz der mRNA codierte Information colinear mit der Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins verknüpft. Wegen der Entartung des genetischen Codes gibt es bereits in *E. coli* mehr als vierzig Adapter. Die tRNA-Moleküle^[33,34] bestehen aus einem Acceptorstamm, der mit einer Aminosäure beladen werden kann, und einer Anticodon-Schleife, die eine zu den codierenden Triplets auf der mRNA komplementäre Sequenz enthält. Dieser Aufbau garantiert, dass das tRNA-Molekül an beiden Erkennungssignalen teilnehmen kann, die für die fehlerfreie Translation einer bestimmten mRNA zur Target-Proteinsequenz entscheidend sind.

Bei der ursprünglichen Formulierung der Adapter-Hypothese wurde postuliert, dass die Synthese von Proteinen aus Messenger-RNA möglich ist, weil jede verwandte tRNA von einem eigenen Enzym aminoacyliert wird.^[2] Heute weiß man jedoch, dass viele Archaea-Bakterien nur 16 von 20 kanonischen aaRSs enthalten. Das Fehlen bestimmter aaRSs (etwa AsnRS und GlnRS) wird oft durch indirekte Wege ausgegli-

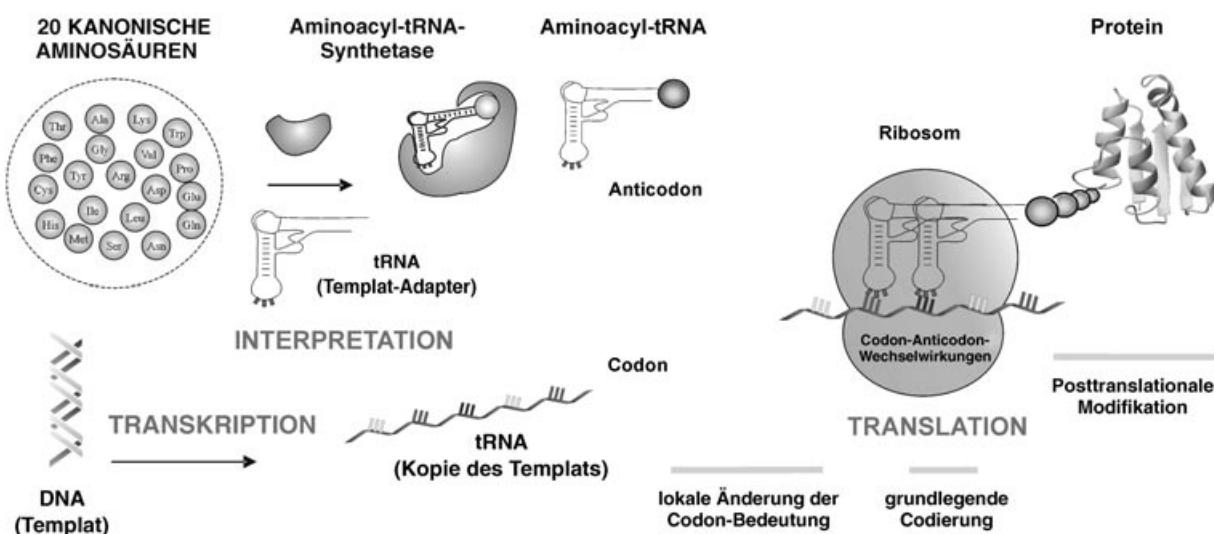


Abbildung 2. Fließschema der Übertragung von genetischer Information. Die Exaktheit des Translationsprozesses hängt stark von zwei sukzessiven unabhängigen Erkennungssignalen ab: 1) Selektion, Aktivierung und kovalente Verknüpfung verwandter Aminosäuren mit den entsprechenden tRNAs (Aminoacylierung) und 2) nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen der beladenen tRNA und der mRNA auf den Ribosomen (die eigentliche Translation). Die grundlegende Codierung erfolgt über die konservative Codon-Anticodon(mRNA-tRNA)-Basenpaarung; bei der Aminoacylierung wird die Bedeutung jedes Codons durch die strenge Substratspezifität der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (aaRSs) interpretiert. Lokale Veränderungen in der Bedeutung von Codons sowie posttranskriptionale Modifikationen dienen dazu, die Proteinfunktionalität zu diversifizieren.

chen, d.h. durch die Übertragung der Aufgabe auf Enzyme des Intermediärmetabolismus.^[32] Interessanterweise wird die fehlende CysRS durch die duale Funktion von ProRS (die offensichtlich beide Substrate erkennt) kompensiert.^[35]

Ein weiteres Merkmal des Translationsapparats ist die Existenz von Kontrollmechanismen, die zwischen verwandten, nichtverwandten und biogenen Aminosäuren unterscheiden.^[36–38] Jede tRNA aus dem zellulären Vorrat hat ihre eigene „Identität“. Diese ist definiert als die Summe der Eigenschaften, die ihre Erkennung durch die verwandte Aminoacyl-tRNA-Synthetase gewährleistet und die Bindung anderer Enzyme verhindert.^[39,40] Das „Identitäts-Problem“ von Aminosäuren in einem erweiterten Aminosäurereservoir kann analog betrachtet werden. Es ist denkbar, dass eine Aminosäure als Substrat für zwei Synthetasen dient. Die beiden unterschiedlichen tRNA-Spezies sind dann als Isoacceptoren mit der gleichen Aminosäure beladen und haben die gleiche „Identität“. Beispielsweise demonstrierten Tirrell und Mitarbeiter,^[41] dass Norleucin und Norvalin nicht nur Substrate für MetRS, sondern, mit verminderter Aktivität, auch für LeuRS sind. Ebenso sind chlorierte und bromierte Phe-Analoga ähnlich gute Substrate für veränderte PheRS aus *E. coli*^[42] sowie für TyrRS aus *M. jannaschii*.^[43] Daher sollte man erwarten, dass experimentelle Veränderungen der intrazellulären Konzentrationen sowie der Substratspezifitäten von aaRSs zu „Identitätsschaltern“ führen können, die bestimmte nichtkanonische Aminosäuren bei der Proteintranslation unterschiedlichen codierenden Triplets zuordnen.

3. Traditionelle Auxotrophie-Methoden

Aus der Evolutionstheorie ist bekannt, dass Mutationen in lebenden Organismen spontan auftreten. Es sind also nicht günstige Änderungen,^[1,44] sondern Zufallsereignisse, und die Umwelt dient als Filter für vorteilhafte Mutationen (Selektion).^[45] Die Übertragung dieser Strategie aus der Natur ins Labor ermöglicht eine anthropogene Selektion des interessierenden Phänotyps. Für die Arbeit unter Laborbedingungen, also in für Menschen sehr kurzen Zeiträumen, werden gewöhnlich Systeme gewählt, die sich schnell entwickeln, z.B. Viren, Bakterien, Protozoen oder einige Organellen sowie in Kultur schnell wachsende Säugetierzellen. Eine besondere Klasse von Mutanten bakterieller oder eukaryotischer Zellen, die nicht in der Lage sind, sich selbst mit Aminosäuren versorgen (Auxotrophe), kann mit Methoden der klassischen Genetik kultiviert und selektiert werden.^[46] Das Engineering des genetischen Codes profitiert von derartigen Zellen, die entweder Mikroorganismen mit veränderten Stoffwechselwegen oder eukaryotische Zellen darstellen. Nach diesem Kriterium selektierte Zellen bilden eine nahezu ideale Grundlage, um die Selektion von Aminosäuren für die Proteinbiosynthese zu beeinflussen und so das Aminosäurereservoir zu erweitern. Für jede Aminosäure, die als Proteinbaustein neu eingeführt werden soll, muss im Allgemeinen ein spezifischer Selektionsdruck entworfen werden. Ein erfolgreiches Experiment besteht aus 1) der Aufnahme der nichtkanonischen Aminosäure, 2) ihrer Konjugation mit der

tRNA sowie 3) ihrem Einbau in die neu entstehende Polypeptidkette.

Bezüglich des genetischen Codes und der Translation der genetischen Information führt dieser traditionelle Auxotrophieansatz zu einer Neuzuordnung von Sense-Codons, die die Substitution einer kanonischen gegen eine nichtkanonische Aminosäure in der Proteinsequenz zur Folge hat. Bei ersten Experimenten betraf diese Substitution das gesamte Protein.^[11] Später, als extrachromosomal, plasmidgesteuerte Proteinexpressionssysteme verfügbar wurden, konnten auch Aminosäuren in einzelnen Target-Proteinen gezielt ersetzt werden (siehe z. B. Lit. [13, 17, 47–49]).

3.1. Frühe Experimente

Die Substitution kanonischer Aminosäuren durch nichtkanonische ist ein relativ alter Ansatz.^[50,51] Zahlreiche Ergebnisse früher Untersuchungen sind jedoch auch heute noch relevant für die Entwicklung neuer Methoden, und in jüngsten Studien erleben die bahnbrechenden Ideen aus den 50er und 60er Jahren eine Renaissance.^[52] In den ursprünglichen Arbeiten spielte *Escherichia coli* noch nicht die Rolle eines Modellorganismus für die Proteinexpression. Andere Mikroorganismen (*Staphylococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Salmonella*, *Leuconostoc*) und eine Vielzahl eukaryotischer Zelltypen (*Saccharomyces*, *Neurospora*, *Tetrahymena*, Krebszellen wie *HeLa*, Hepatozyten, Lymphozyten, etc.) wurden ebenfalls für Einbauexperimente verwendet.^[52]

Bei ersten Versuchen, Variationen in der Aminosäurezusammensetzung von Proteinen zu erzeugen, wurden bei der Fermentierung von Mikroorganismen Strukturanaloga der Aminosäuren zugesetzt.^[53] Eine Substanz kann als „Analoga“ bezeichnet werden, wenn sie in Form und Größe dem natürlichen Molekül ähnelt und sich in ihren biophysikalischen Eigenschaften nicht stark unterscheidet. Analoga, deren sterischer Anspruch demjenigen der kanonischen Aminosäure fast identisch ist, nennt man Isostere (z. B. Met/SeMet^[11] oder Arg/Canavanin^[54]). Modifikationen durch Addition/Deletion einer oder mehrerer Methylengruppen in der Seitenkette (z. B. Met/Ethionin)^[53] oder anderer Gruppen führen zu Homologen der Aminosäuren. In neuerer Zeit werden solche Aminosäuren üblicherweise „Surrogate“ genannt (Beispiele siehe Abschnitt 4).

Analoga/Surrogate wirken potenziell als Antimetaboliten, und sie gelangen auf dem gleichen Weg wie die entsprechenden kanonischen Verbindungen in den Aminosäurevorrat von Bakterien. Dieser Vorrat ist im dynamischen Gleichgewicht mit der Proteinsynthesemaschinerie. Es zeigte sich auch, dass bestimmte Analoga, etwa 3- α -Indolylacrylsäure, die Tryptophan-Biosynthese inhibieren.^[55] Bei Fermentationsexperimenten offenbarten sich antimetabolische Effekte dadurch, dass Kulturen, denen diese Analoga zugesetzt wurden, ein lineares anstelle eines exponentiellen Wachstums zeigten.^[56] Dieses lineare Wachstum wurde dem Einbau der Aminosäure-Analoga in lebensnotwendige zelluläre Enzyme zugeschrieben, deren Aktivität auf diese Weise herabgesetzt oder ganz aufgehoben wurde. Bei fast allen dokumentierten Fermentationsexperimenten, bei denen eine Vielzahl von

Analoga eingesetzt wurden, war das Wachstum der Kulturen nach Zugabe eines Analogons in die synthetischen Kulturmédien linear (eine Ausnahme bildet SeMet).^[57] Diese richtungsweisenden Experimente bestätigten, dass die Zusammensetzung von Proteinen durch Veränderungen der Umgebung, d.h. durch experimentellen Selektionsdruck, beeinflusst werden kann. Seither werden zunehmend spezifische Ziele definiert, um Genaueres über die Faktoren zu erfahren, die den Einbau von Aminosäuren in Proteine steuern. Allgemeine Regeln, die vorhersagen, welche Änderungen zu translationsaktiven Aminosäure-Analoga führen, stehen allerdings noch aus. Es gibt lediglich empirische Beobachtungen bezüglich der chemischen Reaktivität, der molekularen Struktur, des Volumens und weiterer Eigenschaften der Analoga/Surrogate.

Nichtsdestoweniger ebneten die frühen Studien den Weg für umfassendere Untersuchungen der Vielfalt enzymatischer und immunologischer Effekte, die der Austausch kanonischer gegen nichkanonische Aminosäuren in ausgesuchten Proteinen bewirkt. Zahlreiche historische Beispiele der Anwendung von Aminosäure-Analoga auf unterschiedlichen Gebieten, von der Mikrobiologie bis hin zur Biomedizin, sind ausführlich beschrieben worden.^[50,51,58]

3.2. Die Bedeutung von Zellextrakten für frühe Einbauexperimente

Bereits zu Beginn der 50er Jahre wurde durch verschiedene Forschergruppen gezeigt, dass die ribosomale Proteinsynthese auch nach der Zerstörung der Zelle abläuft und nicht auf die intakte Zelle angewiesen ist.^[59] Die Ribosomen in den Zellextrakten konnte man mit endogenen DNA-Templaten programmieren. Dadurch hatten diese Systeme einen unschätzbar wert für Untersuchungen zu Voraussetzungen und molekularen Mechanismen der Proteinbiosynthese sowie bei der Aufklärung des genetischen Codes. Die Einführung von exogenen Botenstoffen durch Nirenberg und Matthaei^[3,4,60] ermöglichte nicht nur die eindeutige Aufklärung des genetischen Codes, sondern auch die Entwicklung moderner zellfreier Systeme mit einer deutlich höheren Leistungsfähigkeit. Auch die gute Verfügbarkeit dieser zellfreien Extrakte war wesentlich für die Untersuchung der Proteintranslation mit Aminosäure-Analoga/Surrogaten.

Dass eine Vielzahl von Aminosäure-Analoga aktiviert werden kann, war bereits bekannt, bevor man ein klares Bild von der Aminoacylierung hatte. In den ersten Experimenten untersuchte man die Aktivierung nichkanonischer Aminosäuren in *E.-coli*-Extrakten. Norvalin, α -Amino- β -chlorbuttersäure, *p*-Fluorphenylalanin, Nle, SeMet, und Ethionin wurden in *E.-coli*-Extrakten aktiviert.^[52] Das wichtigste Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass die Geschwindigkeit der Aktivierung nicht direkt mit der Translationsfähigkeit der Aminosäure-Analoga in Proteinsequenzen korreliert. Beispielsweise aktivierten die Extrakte einer Phe-abhängigen *E.-coli*-Linie β -2-Thienylalanin mit der gleichen Geschwindigkeit wie Phe, das Analagon ist jedoch ein schlechtes Substrat für die Proteinsynthese in intakten *E.-coli*-Zellen. Die Lehre aus diesen Experimenten war offensichtlich: Aktivierbare

Aminosäure sind nicht automatisch auch translationsaktiv. Später wurden die Extrakte aus auxotrophen mikrobiellen Stämmen durch gereinigte Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (aaRS) ersetzt, und die Aktivierung wurde direkt in ATP-Pyrophosphat-Austauschreaktionen getestet. Schon gegen Ende der 70er Jahre war eine beeindruckende Zahl nichkanonischer Analoga identifiziert worden, die an Aktivierungsreaktionen teilnehmen.^[61]

3.3. Proteomweiterer Austausch: ein „unnatürlicher“ Mikroorganismus“

Bereits in den 50er Jahren war bekannt, dass man Aminosäure-Analoga in die Proteine von *E. coli* einbauen kann und dass derartige Substitutionen zu verschiedenen biologischen Effekten führen.^[52] Die bedeutendste Entdeckung war jedoch der SeMet-Einbau in Proteine des Metauxotrophen *E.-coli*-Stamms ML304d durch Cowie und Cohen.^[11] Die Wachstumsgeschwindigkeit der Kultur hing von der Menge an extern zugeführtem Met ab. In einem synthetischen Medium, in dem Met durch SeMet ersetzt wurde, wuchsen ML304d-Zellen langsamer als in Kulturen mit Met, die Wachstumskurve verlief jedoch exponentiell. Wenn nur SeMet anstelle von Met zur Verfügung stand, so ersetzte es Met in allen zellulären Proteinen vollständig und unterschiedslos; dabei blieb das exponentielle Wachstum gewährleistet. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde durch den Austausch gegen SeMet nicht drastisch eingeschränkt, und dieser erste „unnatürliche“ Organismus hatte ähnliche Eigenschaften wie sein Met-haltiger Vorläufer.

Das bahnbrechende Experiment von Cowie und Cohen^[11] war sicherlich die erste proteomumfassende Substitution von Met-Resten durch Selenomethionin. SeMet zählt zu den wenigen Analoga, für die eine große Substitutionskapazität nachgewiesen werden konnte. Überdies ist die Arbeit von Cowie und Cohen^[11] ein außergewöhnlich gutes Beispiel für experimentell erzwungene Veränderungen bei der Interpretation des genetischen Codes (namentlich die Met → SeMet-Neuzuordnung für das codierende Triplet AUG) durch den Einsatz von Zellen mit verändertem Stoffwechsel (Met-Auxotrophen). In den folgenden Jahrzehnten richtete sich das Augenmerk auf die Mechanismen des SeMet-Einbaus in unterschiedlichen Zellen sowie dessen Rolle bei der Aminoacylierung und der Proteinsynthese. Der Einbau von SeMet in Proteine rückte erneut in den Mittelpunkt des Interesses, als Hendrickson^[62] den Ansatz von Cowie und Cohen für die Strukturbioologie wiederentdeckte. Der Austausch von Schwefel in den Met-Resten gegen Selen führte effektiv zum Auftreten einer anomalen Röntgenstreuung, einer grundlegenden Voraussetzung für die „Multiwavelength Anomalous Diffraction“ (MAD) zur Lösung des Phasenproblems in der Röntgenkristallographie von Proteinen.^[63] Die zunehmende Zahl an Proteinstrukturen, die durch MAD gelöst werden konnte, belegt hervorragend, dass SeMet-Proteine nicht nur ein kurzlebiger Trend in der Biochemie sind.^[64]

Ein zweites Beispiel für einen „unnatürlichen“ Mikroorganismus lieferte Wong,^[65] der über eine Reihe von Mikroorganismen berichtete, die ihre Präferenz für Aminosäuren

intrinsisch ändern können. In diesem Experiment wurde der *Bacillus-subtilis*-QB928-Trp-Auxotroph fortlaufend mutiert und viele Generationen lang in einem definierten Minimalmedium kultiviert, das 4-Fluortryptophan enthielt. Den dadurch entstehenden *Bacillus-subtilis*-Mutanten HR15, der 4-Fluortryptophan gegenüber dem kanonischen Trp bevorzugt, bezeichnete man als den „ersten freilebenden Organismus seit mehreren Milliarden Jahren, der mit einem genetischen Code gedeihen kann, der sich vom universellen Code unterscheidet“. Leider wurde keine Analyse des Genotyps mitgeliefert. Unseres Wissens wurden außerdem bislang keine Experimente durchgeführt, die diese aufregende Entdeckung reproduzieren. Da 4-Fluortryptophan bei Raumtemperatur nicht charakteristisch fluoresziert, sollten entsprechend markierte Proteine eine „stille“ (unterdrückte) Fluoreszenz aufweisen. Dies wurde für ribosomale Proteine aus *B.-subtilis*-HR15 beobachtet, die als Folge des Austauschs von Trp gegen 4-Fluortryptophan ihre Fluoreszenz verloren.^[66] Bedeutung haben die Experimente von Wong dadurch, dass sie zweierlei demonstrierten: 1) Die genetische Selektion ist wirksam, und 2) experimenteller Druck kann zu Mikroorganismen führen, deren genetischer Code ein verändertes Vokabular nutzt.

Ellington und Bacher haben kürzlich den Ansatz von Wong zur Entwicklung eines „unnatürlichen“ Organismus wieder aufgenommen. 2001 beschrieben sie Versuche, *E.-coli*-Varianten zu entwickeln, die in Gegenwart von wachstumsinhibierendem 4-Fluortryptophan ((4-F)Trp) überleben.^[253] Sie vermuteten, dass nur wenige Proteine geschädigt sein könnten und dass einige Zellen mutieren und sich über viele Generationen weiterentwickeln würden. So sollte (4-F)Trp in einem einfachen Transferexperiment in das Proteom der Zellen aufgenommen werden. Nach 250 h Evolutionsdauer und 14 Transfers war der Elternstamm an 99% (4-F)Trp im Medium gewöhnt. Obwohl mutante Stämme aus synthetischen Medien mit 99.97% (4-F)Trp isoliert wurden, waren alle erzeugten Stämme auf die Zufuhr von Trp angewiesen. Die Autoren schlossen daraus, dass der Einbau nichtkanonischer Aminosäuren in die Proteome von Organismen zwar möglich sein könnte, aber eine ausgiebige Evolution zur Reoptimierung der Proteine und des Stoffwechsels mit sich bringen würde, um die Analoga einzuführen. In ihrem aktuellsten Beitrag setzten Bacher, Bull und Ellington den Bakteriophagen Q β als Modellsystem für den Aufbau chemisch mehrdeutiger Proteome ein.^[254] Q β ist ein vergleichsweise einfaches System; das Genom dieser Quasi-Spezies stellt den gewichteten Mittelwert der Sequenzen einer Vielzahl unterschiedlicher Individuen dar. Die Replikation des Phagen wurde in Trp-auxotrophem *E. coli* in Gegenwart verschiedener monofluorierter Trp-Analoga untersucht. Obwohl der Phage sich nach 25 Zyklen merklich angepasst hatte, blieb er auf Spuren von L-Trp angewiesen.

Die genetische Selektion war auch das Mittel der Wahl für die ehrgeizigen Experimente von Marliere et al.,^[67] die zum Ziel hatten, „mikrobielle Stämme mit einem definierten Bedarf für eine zusätzliche Aminosäure“ herzustellen, „was zur experimentellen Erweiterung des genetischen Codes beitragen sollte“.^[68] Aus den Mutagenese-Selektions-Zyklen gingen Stämme von *E.-coli*-Mutanten hervor, die Translationsmechanismen für den spezifischen Einbau einer zusätz-

lichen Aminosäure *in vivo* entwickeln konnten. Bei diesem Experiment wurde ein *E.-coli*-Mutant mit einer defekten Thymidylat-Synthetase gezüchtet, dem somit ein zum Wachsen und Überleben notwendiges Enzym fehlte. Nachdem das essenzielle Arginin-Codon (für Arg126) im Gen der Thymidylat-Synthetase zu einem Leucin-Codon mutiert war, wuchsen die Zellen nur noch in Gegenwart von Azaleucin. Die Aktivität des Enzyms konnte nur wiederhergestellt werden, indem Azaleucin (das strukturell Leucin ähnelt, funktionell jedoch Arginin ersetzt) an Position 126 des Enzyms eingebaut wurde. Dieser Selektionsdruck führte also zu einer phänotypischen Suppression, die eine Kompensation von Arg durch die antibiotische Aminosäure Azaleucin bewirkt. In weiteren Experimenten selektierten Döring und Marliere^[69] stabile Bakterienstämme mit mehrdeutig codierenden Triplets. Dabei wurde das seltene Isoleucin-Codon AUA als codierendes Signal verwendet; Cystein diente wegen der Seltenheit seiner Codons in den Genomen als „Codon-Fänger“. Auch die totale Neuzuordnung des seltenen Codons AUA in *E. coli* durch eine geeignete Selektion unter experimentellem Druck wurde vorgeschlagen. Vor kurzem konstruierten Marliere und Mitarbeiter^[67] einen *E.-coli*-Stamm mit einer defekten Korrekturfunktion von ValRS (Thr222Pro), mit dem es möglich ist, fast 24% an Valin im zellulären Proteom gegen α -Aminobuttersäure auszutauschen.

3.4. Substitutionen in einzelnen Target-Proteinen durch Selektionsdruck

Eine allgemeine Regel besagt, dass nahezu alle Aminosäuren außer den 20 kanonischen Aminosäuren und ihren metabolischen Zwischenstufen toxisch sind und das Zellwachstum nicht unterstützen. SeMet bildet eine Ausnahme von dieser Regel:^[70] Es konnte schon früh gezeigt werden, dass der *E.-coli*-Met-Auxotroph ML304d in zellulären Proteinen Met vollständig durch SeMet ersetzt.^[11] Andererseits können auch toxische Analoga (fluorierte Phenylalaninderivate, Norleucin und Canavanin) als Substrate in der Proteinsynthese dienen. Wenn derartige toxische Analoga zusammen mit ihren kanonischen Gegenstücken im synthetischen Wachstumsmedium zur Verfügung stehen, werden sie gewöhnlich in geringem Maß in alle zellulären Proteine eingebracht. Beispielsweise führt das Met-Analogon Norleucin in den Proteinen zum Austausch von nur 38% des zellulären Met, wodurch die Lebensfähigkeit von *E.-coli*-ML304d aber stark beeinträchtigt ist.^[57] Aus neueren Experimenten geht hervor, dass auf diese Weise etwa 50% des Met in den zellulären Proteinen ersetzt werden können, da nach der Erschöpfung des intrazellulären und extrazellulären (im Medium vorhandenen) Met-Vorrats eine weitere Zellteilung stattfindet.^[71,72]

Das grundlegende Problem bei einer vollständigen Substitution in den Target-Proteinen bestand darin, die Translationsfähigkeit zu erhalten und gleichzeitig die Stoffwechseltoxizität auszuschließen. Auxotrophe Bakterien-Mutanten bieten eine Lösung, um die Stoffwechseltoxizität zu umgehen. Mithilfe derartiger Zellen gelingen Austauschexperimente,

bei denen eine nichtkanonischen Aminosäure bevorzugt gegenüber einer kanonischen eingebaut werden kann. Ein besonders effizienter Ansatz beruht darauf, die Wirtszellen bezüglich einer spezifischen kanonischen Aminosäure auszuhungern und unter Zugabe des Analogons zum Kulturmedium die Synthese eines spezifischen Proteins zu induzieren. Sykes et al.^[73] erzielten auf diese Weise in der alkalischen Phosphatase einen Austausch von 10% aller Tyr-Reste. Bakteriophagen-codierte Proteine, die mit fluorierten Aminosäuren markiert waren, wurden nach einer ähnlichen Methode durch Auslösen einer Bakteriophagen-Infektion und die simultane Zugabe des Aminosäure-Analogons hergestellt.^[50]

Der Auxotrophieansatz für eine komplette Markierung der Target-Proteine konnte jedoch erst nach der Einführung von rekombinanten DNA-Techniken generell auf einzelne Target-Proteine angewendet werden. Cohen, Boyer und Mitarbeiter^[74] gelang die Anordnung isolierter DNA-Fragmente und Gene zu neuen Arrangements, die sie in lebenden Zellen vermehrten. Diese Methode stellte hoch effiziente Expressionssysteme für die Herstellung großer Mengen heterologer Proteine zur Verfügung. Derartige extrachromosomal codierte Proteinexpressionssysteme bieten darüber hinaus eine hervorragende Grundlage zur Erweiterung des Aminosäurerepertoires. Insbesondere die strikte Kontrolle der heterologen Genexpression gestattet es, durch einen Selektionsdruck auf den Translationsapparat gezielt einzelne substituierte Target-Proteine zu erzeugen, die sich in einer Wirtszelle mit ansonsten unverändertem Proteom befinden.

Besonders erwähnenswert ist, dass die gewünschte nichtkanonische Aminosäure in einzelne Target-Proteine eingebaut werden kann, ohne dass dem Expressionswirt daraus globale Schäden erwachsen. Zu den Grundvoraussetzungen zählen: 1) die Selektion eines geeigneten Zell- und Expressionssystems, 2) die Kontrolle der Fermentationsbedingungen (d.h. der Umgebung), 3) der Selektionsdruck für den Austausch der Aminosäure (d.h. die Neuzuordnung des/der Sense-Codons) in einem einzelnen Protein.^[13] Dieser Ansatz, der Einbau unter Selektionsdruck (selective pressure incorporation, SPI), beruht auf dem Prinzip, dass die Auswahl der Aminosäuren für die Proteinsynthese durch die Steuerung von Umgebungsfaktoren wie Aminosäureversorgung und Fermentationsparametern festgelegt werden kann.^[6]

Für die SPI-Methode haben Forschergruppen im vergangenen Jahrzehnt verschiedene Namen geprägt (z.B. Auxotrophie-Methode, Media-Shift). Im Zuge ihrer Untersuchungen wurde eine Vielzahl nichtkanonischer Aminosäuren in Proteine eingebaut. Der experimentelle Druck auf einen Expressionswirt wurde dabei wie folgt ausgeübt: Die Aktivität des Target-Gens wurde während des Wachstums der Wirtszellen bis zu einer bestimmten Zelldichte unterdrückt. Nachdem genügend „gesunde“ Zellen herangewachsen waren, wurde die Synthese des Target-Proteins induziert. Von diesem Zeitpunkt an dienten die Wirtszellen lediglich als „Fabrik“ für das gewünschte rekombinante Protein. Durch die Fermentation in Minimalmedien mit wachstumslimitierenden Konzentrationen der nativen Aminosäure wurde der Vorrat des natürlichen Substrats im Medium aufgebraucht. Daraufhin wurde die nichtkanonische Aminosäure zugege-

ben, und die Proteinsynthese wurde induziert. Als Folge des Drucks auf den Translationsapparat sammelte sich das Target-Protein an, das ausschließlich die entsprechende nichtkanonische Aminosäure enthielt. Dieser Prozess brachte das Zellwachstum zum Erliegen, was jedoch im Hinblick auf eine erfolgreiche Expression der Target-Proteinvarianten nur von untergeordneter Bedeutung ist.^[15] Die Toxizität wurde somit geradlinig umgangen. Alternativ können Biosynthesewege der Wirtszellen, deren endogene Versorgung also, durch intrazelluläre Zugabe entsprechender Inhibitoren während der Einbauexperimente blockiert werden.

Der SPI-Ansatz zur Erweiterung der heterologen Expression basiert darauf, dass die zuständigen aaRSs bei der Interpretation des genetischen Codes nicht zwischen einer Vielzahl strukturell und chemisch ähnlicher Substratanaloga für die Aminoacylierung unterscheiden können (Abbildung 3).^[6] Dadurch wird allgemein eine Neuzuordnung der codierenden Triplets möglich, oder anders ausgedrückt, der experimentelle Selektionsdruck ändert die Interpretation des genetischen Codes, während das übrige Proteom der Wirtszelle intakt bleibt. Die grundlegenden Vorteile der SPI-Methode liegen in den Möglichkeiten zur Sense-Codon-dirigierten (restspezifischen) Substitution, zur Expression und Reinigung modifizierter Proteine aus Wildtyp-Individuen sowie darin, dass sie leicht durchführbar und reproduzierbar ist. Aus diesen Gründen wird die SPI-Methode immer noch am häufigsten zur Produktion markierter Proteine im größeren Maßstab gewählt, z.B. für probenintensive strukturiologische Methoden (NMR-Spektroskopie^[73,75] oder Röntgenkristallographie von Proteinen^[63,70,76]) oder zur industriellen Produktion therapeutischer Proteine (Abschnitt 7).^[14,15,77]

3.5. Ein fortgeschrittenes Translationssystem für die Proteinbiosynthese

Durch die Manipulation der Aktivität bestimmter Translationskomponenten lassen sich Methoden, die auf Selektionsdruck beruhen, weiter verbessern. Tirrell und Mitarbeiter testeten eine Bibliothek aus neun ungesättigten Met-Analoga auf ihre Translationsaktivität (Abbildung 4),^[5] um verschiedene terminal gesättigte Met-Analoga einzuführen, jedoch nur *trans*-Crotylglycinsäure (**12**) wurde erfolgreich in ein Modellprotein eingebaut. Das andere Met-Surrogat, *cis*-Crotylglycin (**17**), war trotz einer mäßigen Aktivierungsfähigkeit nicht translationsaktiv. Ein effizienter Einbau (> 90%) dieser Verbindung in Modellproteine gelang erst nach endogener Coexpression rekombinanter MetRS.^[78] Hier zeigt sich klar eine Korrelation zwischen Aktivierungs- und Translationsfähigkeit mit aaRS für Tyr und Met ohne zusätzliche Korrekturfunktionen. Auf diesem Weg wurde eine Reihe von Met-Analoga in Proteine eingebaut. Die Target-Proteine wurden in Met-erschöpften *E. coli*-Kulturen exprimiert, in denen MetRS überexprimiert ist, indem das Analogon in millimolarer Konzentration zum Medium gegeben wurde.

Darüber hinaus lässt sich dieser Ansatz sogar auf Synthesen mit gut dokumentierter Korrekturleseaktivität anwenden, jedoch nur, wenn die gewünschte nichtkanonische

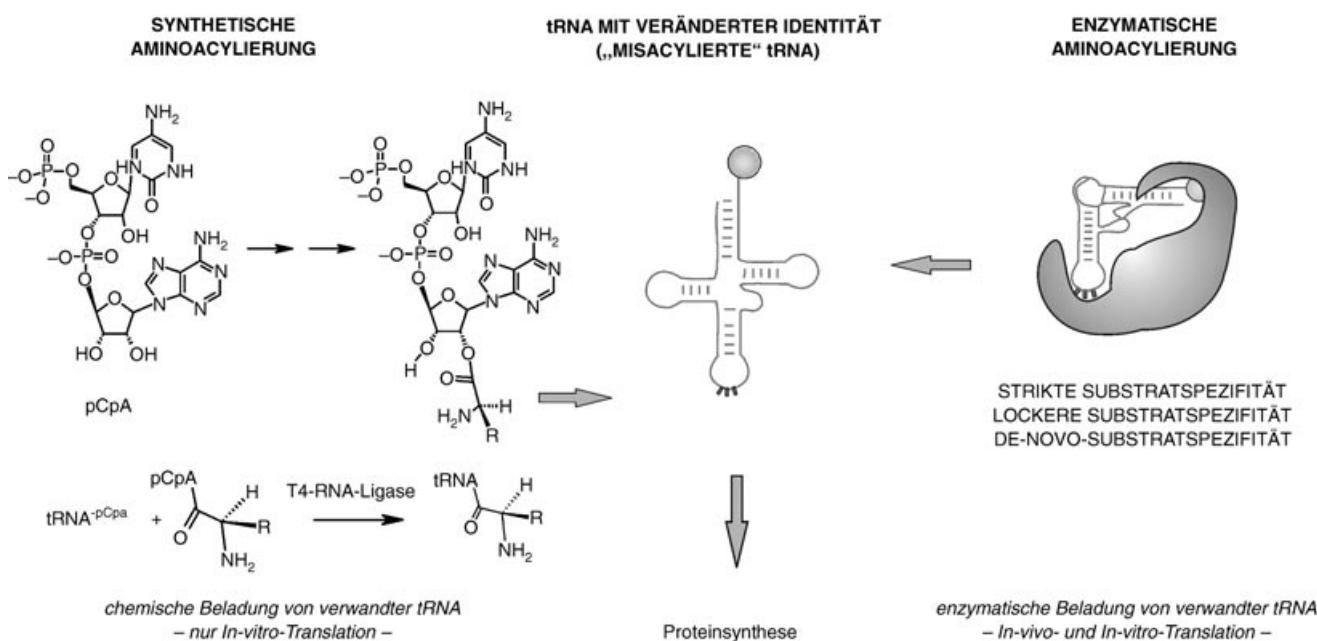


Abbildung 3. Die Hauptwege der experimentellen Erweiterung des Aminosäurereservoirs für die ribosomale Proteinsynthese. Im Mittelpunkt stehen dabei eine tRNA mit einer veränderten Identität oder eine mit der gewünschten nichtkanonischen Aminosäure aminoacylierte tRNA. Eine solche aminoacylierte tRNA kann entweder durch chemische Synthese (links) oder mithilfe von verwandten Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (aaRSs, rechts) hergestellt werden. Der Aufbau chemisch aminoacylierter tRNAs profitiert davon, dass alle tRNAs eine gemeinsame Acceptorsequenz haben (-CCA). Durch kontrollierten Verdau können in jedem tRNA-Typ die beiden terminalen Nucleotide (-CA) abgespalten werden.^[158] Die gewünschte Aminosäure kann chemisch mit dem Dinucleotid p(d)CpA verknüpft und anschließend mit T4-RNA-Ligase an die entsprechend vorbereitete Suppressor-tRNA angefügt werden.^[166] Diese tRNAs werden hauptsächlich bei der In-vitro-Proteinsynthese eingesetzt. Dagegen lässt sich die enzymatische Aminoacylierung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durchführen. Da native aaRSs oft promiskuitiv sind, lassen sich viele nichtkanonische Aminosäuren auf verwandte tRNAs laden und anschließend in die Target-Proteine einbauen.^[6]

Aminosäure kein Substrat für Korrekturreaktionen ist. Beispielsweise ist das Leucin-Analogon Trifluorleucin beim ATP/Pyrophosphat-Austausch-Aktivierungsassay etwa 200-mal weniger aktiv als Leucin.^[79] Nichtsdestotrotz kann es unter normalen Expressionsbedingungen leicht in relativ kleine Coiled-Coil-Proteine eingebaut werden.^[80] Demgegenüber nimmt das Leucin-Analogon Hexafluorleucin nicht an der Proteinsynthese teil, weil es ungefähr 4000-mal langsamer aktiviert wird als Leucin. Eine erhöhte Konzentrationen der Leucyl-tRNA-Synthetase in der Zelle erwies sich als entscheidend, um Hexafluorleucin an den Stellen in das Coiled-Coil-Protein HA1 einzubauen, die durch Leucin-codierende Triplets in der mRNA-Sequenz vorgegeben sind.^[81]

Mittlerweile hat sich herausgestellt, dass zumindest einige nichtkanonische Aminosäuren, die unter konventionellen Expressionsbedingungen nicht an der Proteinsynthese teilnehmen, effizient in Proteine eingebaut werden, wenn man die Menge an intrazellulärer aaRS im mikrobiellen Wirt erhöht.

3.6. Engineering der Katalyse- und Korrekturfunktionen von aaRS

Die Aminoacylierung ist einer der wichtigsten „Filter“, der den Einbau nichtkanonischer/nichtverwandter Aminosäuren verhindert.^[38] Der „klassische“ SPI-Ansatz nutzt le-

diglich die Promiskuität der Wildtyp-aaRSs, um das Aminosäurereservoir zu erweitern.^[6] Auf diesem Weg können nur relativ wenige nichtkanonische Aminosäuren in den genetischen Code eintreten. Im Vergleich zu suppressionsbasierten Methoden, die auf chemischer tRNA-Aminoacylierung beruhen, ist die chemische Vielfalt bescheiden. Die In-vivo-Erweiterung des Aminosäurereservoirs durch den SPI-Ansatz sollte jedoch stark profitieren, wenn die aaRSs des mikrobiellen Wirts durch künstliche Enzyme mit veränderter oder geringerer Substratspezifität ergänzt oder ersetzt würden.

Kast und Hennecke^[82] berichteten über einen Mutanten der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase (PheRS) mit einer Mutation in der Bindungstasche (Ala294Gly), die die tRNA^{Phe} mit *p*-Chlorphenylalanin belädt. Später zeigten Ibba et al.^[42] sowie Tirrell und Mitarbeiter,^[83] dass es möglich ist, Aminosäuren wie *p*-Chlorphenylalanin (**45**) und *p*-Bromphenylalanin (**52**) in rekombinante Luziferase und Dihydrofolat-Reduktase einzuführen, indem man bakterielle Wirte verwendet, die extrachromosomal mit dieser weniger substratspezifischen PheRS-Variante versorgt wurden. Am Computer wurde ein neuer Mutant der *E. coli*-PheRS mit der zusätzlichen Mutation Thr251Gly entworfen, der eine noch geringere Substratspezifität aufwies. Der *E. coli*-Expressionswirt mit diesem Enzym konnte in das Modellprotein Dihydrofolat-Reduktase einen Satz von Phe-Analoga und -Surrogaten einbauen, z.B. *O*-Acetyltyrosin (**65**), *p*-Bromphenylalanin (**52**), *p*-Iodphenylalanin (**46**), *p*-Cyanphenylalanin, *p*-Ethyl-

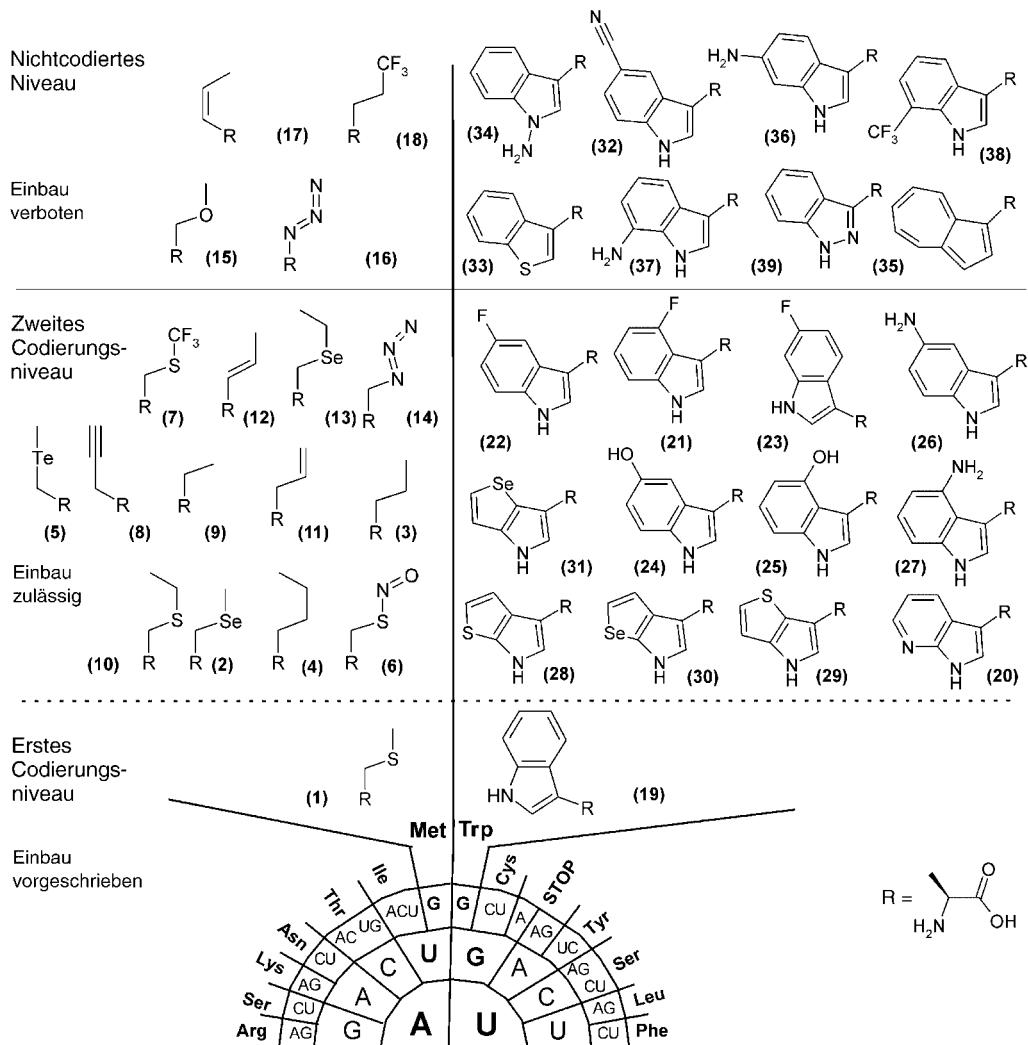


Abbildung 4. Erweiterung der Codierungskapazität von AUG- und UGG-Triplets, die im genetischen Code den kanonischen Aminosäuren Methionin (1)^[13, 76] bzw. Tryptophan (19)^[17, 74, 75, 102–106] zugeordnet sind. Diese evolutionären Codonzuordnungen machen Met und Trp zu obligatorischen Proteinbausteinen; beide gehören zum ersten Codierungsniveau. Durch die experimentelle Neuzuordnung der codierenden Triplets AUG und UGG können Bibliotheken meist isosterer nichtkanonischer Aminosäure-Analoga und -Surrogate als Substrate in der ribosomalen Proteinsynthese verwendet werden, wodurch ein zweites (fakultatives) Codierungsniveau geschaffen wurde. Nichtcodierte Niveaus enthalten Aminosäuren die bisher nicht eingebaut werden konnten. Eine der Hauptaufgaben beim Code-Engineering liegt darin, nicht translationsaktive Aminosäuren aus dem nichtcodierten Niveau in codierte Niveaus zu überführen. Die meisten der hier vorgestellten translationsaktiven Aminosäuren wurden durch die Gruppen von Budisa und Tirrell in Proteine eingebaut. Bemerkenswert ist, dass translationsaktives Allylglycin, 2-Butinylglycin ebenso wie Norvalin (9), Norleucin (3), Homoallylglycin (11) und Homopropargylglycin (8) auch als Substrate für veränderte LeuRS dienen könnten.^[102–106] Dieser neue Gesichtspunkt im Translationsprozess („Identitätsproblem“) wird im Text diskutiert. Methionin-Analoga und -Surrogate: Selenomethionin (SeMet, 2), 2-Aminohexansäure (4), Telluromethionin (TeMet, 5), S-Nitrosomethionin (6), Trifluormethionin (7), Ethionin (10), *trans*-Crotylglycin (12), Seleinethionin (13), Azidohomoalanin (14), Metoxinin (15), Azidoalanin (16), *cis*-Crotylglycin (17) und Trifluornorleucin (18). Translationsaktive Tryptophan-Analoga und -Surrogate: 7-Azatryptophan (20), 4-, 5- und 6-Fluortryptophan (21, 22 und 23), 5- und 4-Hydroxytryptophan (24 und 25), 5- und 4-Aminotryptophan (26 und 27), L-β-(Thieno[2,3-*b*]pyrrolyl)alanin (28), L-β-(Thieno[3,2-*b*]pyrrolyl)alanin (29), β-Selenolo[2,3-*b*]pyrrolyl-L-alanin (30) und β-Selenolo[3,2-*b*]pyrrolyl-L-alanin (31). Dazu kommen die nicht gezeigten Verbindungen 7-Fluortryptophan und 4-Methyltryptophan. Nicht translationsaktive Trp-Analoga und -Surrogate: 5-Cyantryptophan (32), Benzothienopenalanin (33), Azulen (35), 1-, 6- und 7-Aminotryptophan (34, 36 und 37), 7-Trifluoromethyltryptophan (38) und 2-Azatryptophan (39). Die IUPAC-Namen der vorgestellten Aminosäuren sind in den Hintergrundinformationen aufgeführt.

phenylalanin (**66**), *p*-Azidophenylalanin (**59**) sowie 2-, 3- und 4-Azaphenylalanin (**53**, **55**, **56**, Abbildung 5).^[83,84]

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen ohne Korrekturleseaktivität, etwa TyrRS, sind besonders attraktive Targets für das Engineering der Substratspezifität. Beispielsweise wurde der Mutant Phe130Ser von TyrRS aus *E. coli*, dessen Affinität für 2-Azatyrosin (**61**) erhöht ist, durch ein Screening von *E. coli*-

Zellen selektiert. Diese Zellen wurden mit Plasmiden trans-fiziert, die das mutante TyrRS-Gen (*tyrS*) enthielten.^[85] In ähnlicher Weise führte ein TyrRS-Engineering, das auf der dreidimensionalen Struktur des Enzyms aus *Bacillus stearothermophilus* beruhte, bei Hefe zu dem Mutanten Tyr43Gly-TyrRS, der *m*-substituierte Tyr-Analoga als Substrate für die Aminoacylierung akzeptiert.^[86] Nach der Einführung in *E.*

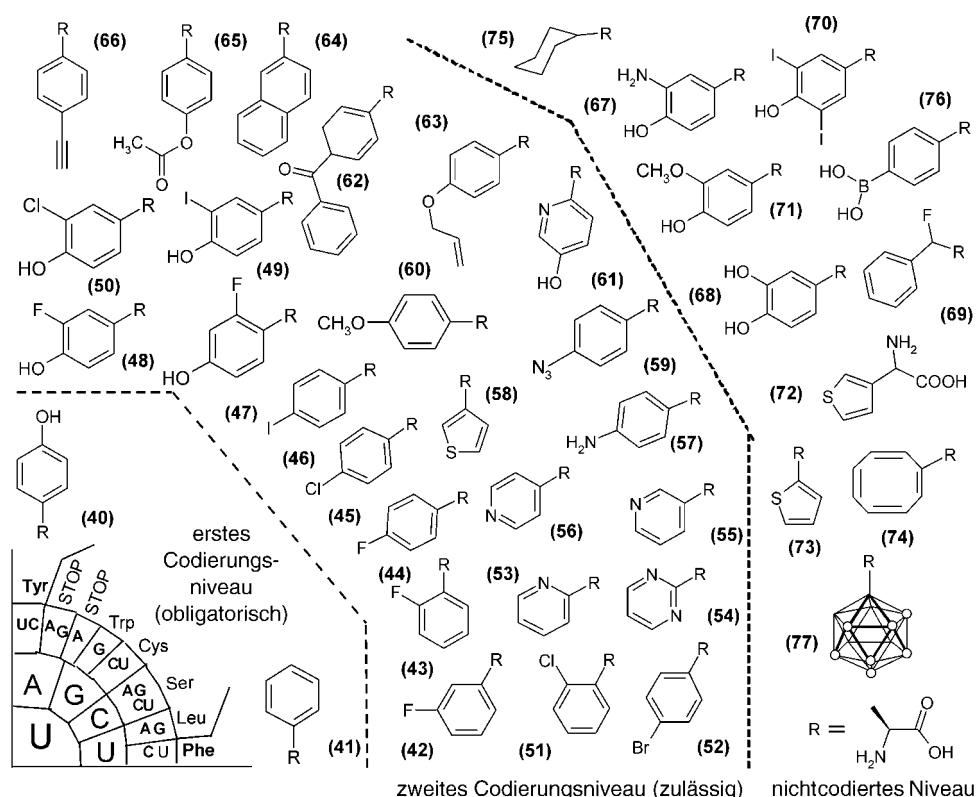


Abbildung 5. Den kanonischen Aminosäuren Phe und Tyr sind je zwei codierende Triplets zugeordnet. Ihr zweites Codierungsniveau enthält wenigstens 25 chemisch und strukturell unterschiedliche Analoga und Surrogate. Bezuglich ihrer „Identität“ können viele davon entweder als Tyr- oder als Phe-Analoga oder -Surrogate bezeichnet werden, abhängig von dem System, in dem sie verwendet werden. Beispielsweise können *p*-Iodphenylalanin (46) und *p*-Bromphenylalanin (52) in Proteine eingebaut werden – entweder mithilfe von *E. coli*-Zellen, deren PheRS eine gelockerte Substratspezifität haben, oder durch den Einsatz von Plasmiden, die TyrRS aus *M. jannaschii* mit einer neuen Substratspezifität tragen. Analoga wie *p*-Aminophenylalanin (57), *p*-Azidophenylalanin (59), *p*-Benzoylphenylalanin (62) und 2-Naphthylalanin (64) wurden mithilfe von Suppressor-tRNA für das UGA-Stoppcodon in Modellproteine eingefügt. Mit modifizierter TyrRS und entsprechenden tRNAs wird ein Einbau in Proteine auch als Antwort auf die Sense-Codons UAU oder UAC möglich (Details siehe Text). Vorgestellte Aminosäuren: Tyrosin (40), Phenylalanin (41), *m*-, *o*- und *p*-Fluorophenylalanin (42, 43 und 44), *p*- und *o*-Chlorphenylalanin (45, 51), *o*- und *m*-Fluortyrosin (47, 48), *m*-Iodtyrosin (49), *m*-Chlortyrosin (50), 2-, 3- und 4-Azaphenylalanin (53, 55 und 56), 2,6-Diazaphenylalanin (54), 3- und 2-Thienylalanin (58, 73), O-Methyltyrosin (60), 2-Azatyrosin (61), O-Allyltyrosin (63), O-Acetyltyrosin (65), *p*-Ethylnylphenylalanin (66), *m*-Aminotyrosin (67), *m*-Hydroxytyrosin (DOPA, 68), β -Fluorophenylalanin (69), 3,5-Diodotyrosin (70), *m*-Methoxytyrosin (71), 3-Thienylglycin (72), Cyclooctatetraenylalanin (74), Cyclohexylalanin (75), (4-Boronyl)phenylalanin (76) Carboranylalanin (77). Die IUPAC-Namen der vorgestellten Aminosäuren sind in den Hintergrundinformationen aufgeführt.

coli zieht diese Hefe-Tyr43Gly-TyrRS darüber hinaus *m*-Iodtyrosin (49) dem natürlichen Substrat Tyr vor. Schultz und Mitarbeiter^[87] wählten die TyrRS aus *Methanococcus jannaschii* und stellten eine Bibliothek von Mutanten mit neuer Substratspezifität her. Sie selektierten auf diese Weise einen Mutanten, der *O*-Methyltyrosin (60) gegenüber Tyr bevorzugt.^[88]

Kürzlich wurde über eine Kombination von genetischer Selektion und Screening berichtet. Dieses System ermöglicht die schnelle Entwicklung der Substratspezifität der TyrRS aus *M. jannaschii*. Beim Screening auf Varianten mit der gewünschten veränderten Aminosäurespezifität wurde ein antibiotischer Marker mit einem verstärkbaren Fluoreszenzreporter kombiniert.^[43] Ein Vorteil dieses Ansatzes liegt darin, dass der Fluoreszenzreporter eine Abschätzung der aaRS-Aktivität und -Selektivität ermöglicht. Die Aminosäurebindungs tasche einer TyrRS aus *M. jannaschii* wurde systematisch mutiert, und eine Reihe neuer TyrRS-Varianten wurde selektiert, die Tyr-Analoga spezifisch aminoacylieren. Unter

den Substraten waren Tyr-artige (oder Phe-artige) Aminosäuren mit Methoxy-,^[88] Amino-,^[89] Alkenyl-,^[90] Keto-,^[91] Azido-,^[92] oder Naphthyl^[93]-Gruppen sowie Substrate mit photochemisch vernetzbaren Gruppen^[94] (Abbildung 5).

Eine weitere Möglichkeit, das Aminosäurererertoire eines bestimmten Systems zu erweitern, bieten Synthetasen mit ausgeschalteter oder verminderter Korrekturleseaktivität. Kürzlich berichteten Mursinna und Martinis^[95] über die Blockierung der Aminosäurekorrektur in der LeuRS von *E. coli* mithilfe eines rationalen Ansatzes. In diesem Enzym spielt ein einziges Thr an Position 252 (in der Aminosäurebindungstasche des aktiven Zentrums für den Korrekturvorgang) eine entscheidende Rolle bei der Korrekturreaktion; seine Mutation zu sperrigen Aminosäuren, z. B. Phe oder Tyr, führte zum Verlust der Korrekturleseaktivität. Eine derart inaktivierte LeuRS eröffnet einen einfachen und effizienten enzymatischen Syntheseweg für tRNAs, die mit nichtkanonischen Aminosäuren beladen sind. Tirrell und Mitarbeiter isolierten und charakterisierten drei LeuRS-Mutanten

(Thr252Tyr; Thr252Leu; Thr252Phe) mit verminderter Korrekturleseaktivität.^[41] Der LeuRS-Thr252Tyr-Mutant wurde zusammen mit Target-Proteinen endogen überexprimiert, was den Einbau der nichtkanonischen Aminosäuren Norvalin (**9**) und Allylglycin ermöglichte. Darüber hinaus wurden an den Leu-Positionen des Modellproteins nichtkanonische Aminosäuren (Met-Surrogate) eingebaut, z.B. Homoallylglycin (**11**), Homopropargylglycin (**8**), (Abbildung 4) und 2-Butinylglycin.^[41]

Abschließend sei noch ein computergestützter Ansatz erwähnt, mit dem die relativen Bindungsenergien unterschiedlicher nichtkanonischer Aminosäuren an den Bindungsstellen der aaRS auf der Basis von Kristallstrukturen oder Homologiemodellen vorhergesagt werden können. Diese Methode eignet sich für das virtuelle Screening von Aminosäure-Analoga. Goddard III et al. berichteten, dass die errechneten Bindungsenergien zwischen einigen Phe-Analoga und PheRS gut mit ihren Translationsaktivitäten in *E. coli* korrelieren.^[96] Die „Clash Opportunity Progressive Computational Method“ wurde kürzlich als ein Verfahren entwickelt, mit dem sich aaRS-Mutanten entwerfen lassen, die nichtkanonische Aminosäuren als Substrate bevorzugen.^[97]

4. Möglichkeiten und Grenzen des Selektionsdrucks: Engineering eines „zweiten“ Codes

Die Erweiterung des Aminosäurerepertoires stößt besonders *in vivo* auf Grenzen, die durch das spezifische Experiment auferlegt werden. Dazu zählen metabolische Einschränkungen (Stoffwechseltoxizität der meisten nichtkanonischen Aminosäuren), Korrekturlesemechanismen bei der Übertragung der genetischen Information, die die exakte Proteintranslation gewährleisten, und schließlich die Regeln der Proteinfaltung, die eng mit der Struktur des genetischen Codes und den physikochemischen Eigenschaften der Aminosäuren verbunden sind. Die Veränderung oder Anpassung der aaRS-Aktivitäten ist einer der wichtigsten Wege, um diese Einschränkungen für das Engineering des genetischen Codes zu umgehen.

Die Darstellung der Erweiterung des Aminosäurerepertoires in Abbildung 6 macht deutlich, dass die postulierte Universalität des genetischen Codes nicht nur für seinen ersten (beschränkten) Teil gilt, sondern auch für einen zweiten (gelockerten) Teil (den „zweiten Code“), der experimentell zugänglich sein sollte.^[6] Im genetischen Code können drei Niveaus postuliert werden (Abbildung 4 und 5): Das erste Codierungs niveau umfasst die für den genetischen Code obligatorischen kanonischen Aminosäuren; das zweite Codierungs niveau bilden nichtkanonische Aminosäuren, deren Einbau gemäß des Codes erlaubt ist; das dritte oder auch nichtcodierte Niveau bilden alle „verbotenen“ Aminosäure-Analoga, die auf dem derzeitigen Entwicklungsstand nicht durch Sense-Codon-Neuzuordnungen in den genetischen Code eingeführt werden können.

Für jede kanonische Aminosäure sollte demnach eine ganze Bibliothek translationsaktiver Analoga und Surrogate existieren, die ersatzweise in Proteine eingebaut werden können. Das Ziel wäre der Aufbau eines erweiterten ge-

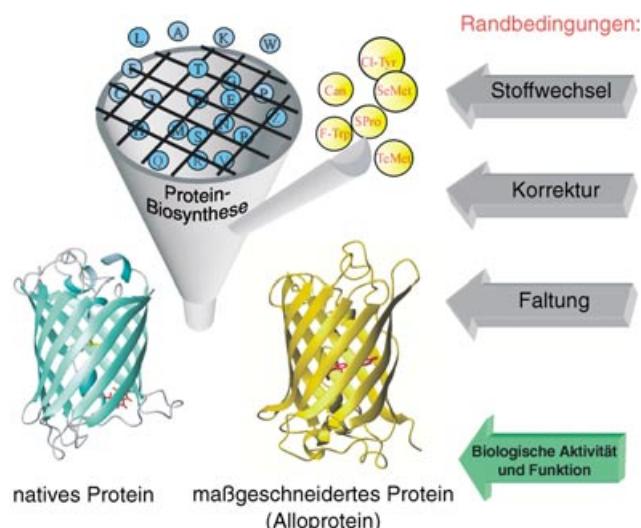


Abbildung 6. Die Rolle des zweiten Codierungs niveaus des genetischen Codes für ein erweitertes Aminosäurerertoire.^[6] Kanonische Aminosäuren sind nicht toxisch und unterliegen keinerlei Korrekturfunktionen. Für den Eintritt in den genetischen Code müssen nichtkanonische Aminosäuren drei Bedingungen erfüllen: Sie dürfen nicht toxisch sein, bei Korrekturlesemechanismen nicht auffallen und die korrekte Faltung des Target-Proteins nicht beeinträchtigen. Weitere Schwierigkeiten könnten bei der Aufnahme in die Zelle sowie bei der metabolischen Aktivierung oder Modifikation vor oder nach ihrer Beladung auf entsprechende tRNAs hinzukommen. Eine nichtkanonische Aminosäure, die reproduzierbar in eine Proteinsequenz übertragen worden ist, gehört dem zweiten Codierungs niveau des universellen genetischen Codes an. Derart exprimierte Proteine mit nichtkanonischen oder künstlichen Aminosäuren werden als Alloproteine^[121] oder maßgeschneiderte (custom-made) Proteine bezeichnet.^[204]

tischen Codes mit einem entsprechenden zweiten Codierungs niveau, wobei Aminosäuren von einem nichtcodierten auf ein codiertes Niveau übertragen werden. Die folgenden Abschnitte geben einen Überblick über elf Aminosäuren, die bereits Gegenstand eines derartigen Austauschs waren.

4.1. Tryptophan

Tryptophan ist als Target-Aminosäure attraktiv, da es nahezu alleine die UV-Absorption und Fluoreszenz von Proteinen bestimmt. Die vielseitige Indolchemie bietet zahlreiche Trp-Analoga, die auf ihre Translationsaktivität untersucht werden können. Mit nur etwa 1% aller Reste in globulären Proteinen ist Trp die seltenste Aminosäure. Trp ist eine nahezu positionsspezifische intrinsische Sonde zur Untersuchung von Struktur, Dynamik und Funktion von Proteinen.

Über die ersten Versuche zur Erweiterung des Aminosäurerepertoires für das Trp-codierende Triplet UGG berichteten Pardee et al. (1956)^[98] sowie Brawerman und Ycas (1957)^[99] mit dem Einbau von 7-Azatryptophan (**20**) und 2-Azatryptophan (**34**) in alle Proteine von *E. coli* sowie den Einbau von Trp-Analoga in eukaryotische Proteine. Schleisinger beschrieb am Beispiel einer alkalischen Phosphatase die erste gezielte Markierung eines einzelnen Enzyms in einer intakten Zelle mit diesen Aminosäuren.^[47] Die Gruppen von

Sykes und Ho führten die ¹⁹F-NMR-spektroskopische Analyse für Fluortryptophan-substituierte Proteine ein.^[73,100] Im letzten Jahrzehnt erweiterten Szabo, Ross und Mitarbeiter^[17,101,102] dieses Repertoire, indem sie mit 5-Hydroxytryptophan (**24**) eine wichtige Fluoreszenzsonde vorstellten. Selenophen- und thienylhaltige Trp-Analoga haben sich als Wirkstoffe sowie als Marker für die Protein-Röntgenkristallographie bewährt.^[76,103] Neuerdings wurden auch Aminotryptophan-Analoga eingebaut, die die Möglichkeit eröffnen, proteinbasierte Sensoren zu entwickeln (siehe Abschnitt 7).^[104,105]

Das mithilfe der SPI-Methode erweiterte Repertoire für das Trp-codierende Triplet UGG (Abbildung 4) umfasst derzeit 4-Fluortryptophan (**21**),^[66] 5-Fluortryptophan (**22**), 6-Fluortryptophan (**23**), 7-Fluortryptophan, 4-Methyltryptophan, 7-Azatryptophan (**20**), 4-Hydroxytryptophan (**25**),^[105] 5-Hydroxytryptophan (**24**),^[106] 4-Aminotryptophan (**27**), 5-Aminotryptophan (**26**),^[105] L-β-(Thieno[3,2-*b*]pyrrolyl)alanin (**28**), L-β-(Thieno[2,3-*b*]pyrrolyl)alanin (**29**),^[77] β-Selenolo[3,2-*b*]pyrrolyl-L-alanin (**31**) und β-Selenolo[2,3-*b*]pyrrolyl-L-alanin (**30**).^[76,103]

Obwohl frühe Arbeiten nahelegten, dass methylierte Trp-Analoga gute Substrate für die Tryptophan-tRNA-Synthetase (TrpRS) und die Translationsmaschinerie sein könnten,^[106] haben neuere Experimente gezeigt, dass nur 4-Methyltryptophan ein Substrat der nativen *E. coli*-Translationsmaschinerie ist.^[107] Der am Stickstoffatom protonierte Indolring hat offensichtlich generell große Bedeutung bei der Erkennung von Trp und seinen Analoga durch TrpRS und den Translationsapparat. Dies zeigte sich durch die Synthese von Analoga, deren Iminogruppe durch andere Heteroatome (Selen, Schwefel oder Sauerstoff) ersetzt wurde; die resultierenden Aminosäuren waren nicht translationsaktiv.^[77] Beispielsweise ist die Trp-artige blaue Aminosäure **35** mit einem Azulen-Ringsystem kein Substrat für die native Translationsmaschinerie,^[108] – auch dann nicht, wenn sie in einer In-vitro-Reaktion chemisch auf die tRNA übertragen wird.

Bisher gibt es keine Berichte über eine systematische Erweiterung der Substratspezifität von TrpRS.^[109] Dabei ließe sich mit einer veränderten TrpRS die chemische Vielfalt in Proteinen sicherlich vergrößern. Darüber hinaus wären Versuche, ein orthogonales Paar zu entwickeln, das das seltene UGG-Codon nutzt, der geradlinigste Weg zu positionsspezifischen und multiplen Austauschen.

4.2. Tyrosin

Mit dem Einbau von *m*-Fluortyrosin ((3-F)Tyr, **48**) in β-Galactosidase durch Munier und Sarrazin^[110] begann 1962 die Entwicklung eines erweiterten Aminosäurerepertoires für die Tyr-codierenden Triplets UAU und UAC. In den 70er Jahren erhielten Sykes, Lu und Mitarbeiter^[73,111] ¹⁹F-NMR-Spektren des mit (3-F)Tyr markierten lac-Repressors sowie der alkalischen Phosphatase aus *E. coli*. Ein Jahrzehnt später untersuchten Ring und Huber mithilfe der Substitution aller Tyr-Seitenketten durch (3-F)Tyr die Rolle von Tyr im aktiven Zentrum der β-Galactosidase bei der Katalyse.^[112,113] Brooks et al.^[114] erweiterten 1998 das Repertoire translationsaktiver

Tyr-Analoga, indem sie *o*-Fluortyrosin (**47**) und 2,3-Difluortyrosin in die Ketosteroid-Isomerase aus *Pseudomonas testosteroni* einbauten. Der früh von Calender und Berg^[115] beschriebene Einbau von L-Dopa (**68**) in Proteine wurde durch neuere Experimente nicht bestätigt (Abbildung 5).^[116]

Die Untersuchungen zur Modifizierung der Tyrosyl-tRNA-Synthetase (TyrRS) aus *E. coli* führten zu dem Mutanten Phe130Ser-TyrRS, mit dem man das Tyr-Analogon Azatyrosin (**61**) in zelluläre Proteine einfügen kann. Yokoyama und Mitarbeiter^[86] entwickelten eine Suppressor-tRNA^{Tyr} sowie eine mutante TyrRS, durch die *m*-Iodtyrosin (**49**) in Proteine von Säugetierzellen eingebaut wurde. Die Arbeitsgruppe von Schultz entwickelte einige orthogonale *M. jannaschii*-TyrRS/tRNA_{CUA}^{Tyr}-Paare mit einer beeindruckend weitreichenden Substratspezifität.^[43] Aminosäuren wie *O*-Methyltyrosin (**60**), *O*-Acetyltyrosin (**65**), *O*-Allyltyrosin (**63**), 2-Naphthylalanin (**64**), *p*-Aminophenylalanin (**57**), *p*-Iodphenylalanin (**46**), *p*-Bromphenylalanin (**52**), *p*-Azido-phenylalanin (**59**) und *p*-Benzoylphenylalanin (**62**) wurden durch eine effiziente Suppression des Stoppcodons UGA in grün fluoreszierendes Protein,^[89] Glutathion-S-Transferase^[117] und Dehydrofolat-Reduktase^[88] eingebaut (Abbildung 5).

Eine Strukturhomologie deutet an, dass TyrRS und TrpRS Konformationsisomere sind. Möglicherweise kann man mit dieser Eigenschaft die Substratspezifität der Enzyme schalten oder abschwächen und so das Aminosäurerepertoire zusätzlich erweitern.

4.3. Phenylalanin

Fluorierte Phenylalanin-Analoga kamen bei den anfänglichen Einbauexperimenten ebenso wie in den letzten Jahren hauptsächlich bei der NMR-spektroskopischen Untersuchung von Proteinen zum Einsatz. Yoshida fand heraus,^[118] dass die Stabilität der α-Amylase aus *Bacillus subtilis* beim partiellen Austausch von Phe durch *p*-Fluorphenylalanin (**44**) unverändert bleibt, ihre Aktivität jedoch nachlässt. Demgegenüber entdeckte Richmond,^[52] dass sich die Exopenicillase aus *Bacillus cereus* durch Substitution mit *p*-Fluorphenylalanin bezüglich ihrer immunologischen Eigenschaften veränderte. Bei der alkalischen Phosphatase aus *E. coli* hatte ein Austausch von 56 % der Phe-Reste gegen *p*-Fluorphenylalanin keinen erkennbaren Einfluss auf Stabilität und Aktivität. Kürzlich wurden *o*-, *m*- und *p*-Fluorphenylalanin (**42**, **43**, **44**) systematisch in rekombinante Proteine oder rekombinant hergestellte Materialien eingebaut,^[119] wobei interessante optische^[120] und thermische Eigenschaften beobachtet wurden und Veränderungen der Reaktionskinetik auftraten. Janecek und Rickenberg^[121] zeigten, dass β-Galactosidase, die in der Gegenwart des Phe-Surrogats 2-Thienylalanin (**73**) exprimiert wurde, labiler als das normale Enzym ist. 2-Thienylalanin inhibiert die Permeaseaktivität, d.h. seinen aktiven Transport in das Cytosol, obwohl es als Substrat für die Proteinsynthese wirkt. Deshalb wird dieses Analogon in auxotrophen Stämmen mit intakter Permeasefunktion nur in geringem Maß eingebaut. Später wurde das Phe-Analogon 3-Thienylalanin (**58**) in ein rekombinantes periodisches Protein

eingebaut, das lamellare Kristalle aus gleichmäßigen β -Faltblatt-Strukturen bildet.^[122] Koide et al.^[123] berichteten über den Einbau von Phe-Analoga mit Pyridylgruppen in einem rekombinanten humanen epidermalen Wachstumsfaktor. Diese Analoga, z.B. 2-, 3- und 4-Azaphenylalanin (**53**, **55** und **56**, Abbildung 5), liegen in sauren Lösungen protoniert vor.

Die Entdeckung einer bakteriellen PheRS-Variante mit verminderter Substratspezifität durch Kast und Hennecke^[82] ebnete den Weg für weitere translationsaktive Phe-Surrogate und -Analoga. Die halogenierten Analoga *p*-Chlor- (**45**) und *p*-Bromphenylalanin (**52**) wurden *in vitro* in die rekombinante Luziferase eingebaut.^[42] Eine weitergehende Neugestaltung des aktiven Zentrums der PheRS und die Möglichkeit der Coexpression in *E. coli* führten zu einem Austausch der Phe-Reste in der Dihydrofolat-Reduktase gegen *O*-Acetyltyrosin (**65**), *p*-Aminophenylalanin (**57**), *p*-Iodphenylalanin (**46**), *p*-Bromphenylalanin (**52**), *p*-Azidophenylalanin (**59**), *p*-Chlorphenylalanin (**45**), *p*-Cyanphenylalanin, *p*-Ethynylphenylalanin (**66**), *p*-Azidophenylalanin (**59**) und 2,6-Diaza-phenylalanin (**54**).^[83,124] Diese künstlichen PheRS-Varianten ermöglichen auch einen effizienten In-vivo-Einbau von Arylketo-Funktionalitäten in Proteine, der normalerweise durch die zelluläre Translationsmaschinerie verhindert wird.^[84] Einige Phe-Derivate, etwa *p*-Bromphenylalanin und *p*-Iodphenylalanin, wurden mithilfe einer veränderten TyrRS aus *M. jannaschii* als Antwort auf das Amber-Stoppcodon in Proteine eingebaut.^[43] Alle diese Aminosäuren haben demnach eine „duale Identität“, da sie Substrate für beide Systeme sind (Abbildung 5).

4.4. Histidin

Die Histidin-Analoga 1,2,4-Triazolyl-3-alanin und 2-Methylhistidin wurden erfolgreich in die alkalische Phosphatase von *E. coli* eingebaut. Das resultierende Enzym war jedoch inaktiv, da es nicht dimerisieren konnte.^[58] Die gleichen Analoga wurden in Aspartat-Transcarbamoylase und in eine mutante Phospholipase A2 eingebaut. Die Produkte dieser Modifikationen unterschieden sich bezüglich des pH-Aktivitäts-Profiles drastisch von den nativen Enzymen;^[125] so führte der Austausch von His gegen 1,2,4-Triazolyl-3-alanin zu einem Enzym mit hoher Aktivität im sauren pH-Bereich.^[126] Einen ähnlichen Effekt beobachtete man beim Einbau von 2-Fluorhistidin^[127] und 4-Fluorhistidin, wodurch der pK_a -Wert um ungefähr 5 erniedrigt wurde.^[58] Dieser drastische Aciditätsanstieg wirkt sich stark auf die Eigenschaften Fluorhistidin-haltiger Proteine aus und führt möglicherweise dazu, dass viele Proteine ihre enzymatische Aktivität im physiologischen Milieu einbüßen. Somit ließe sich die Toxizität von 2- und 4-Fluorhistidin dadurch erklären, dass sie gegen His ausgetauscht werden können.^[58] Diese Überlegungen wurden durch Untersuchungen an Ribonuclease S mit halbsynthetisch eingebautem 4-Fluorhistidin bestätigt.^[128] Kürzlich stellten Ikeda et al. einen vielseitigen Satz von Histidin-Analoga her, die gute Substrate für die Proteinsynthese sind.^[129]

His-Reste sind für das Engineering von Enzymaktivität und -katalyse besonders interessant, da sie häufig in aktiven

Zentren von Enzymen vertreten sind und nucleophile Reaktionen sowie Säure-Base-Reaktionen katalysieren. Der isostere Austausch bestimmter kanonischer Aminosäuren (z.B. Ser/Cys oder Thr/Val) ist eine hervorragende Methode, um zu prüfen, ob die Reste direkt an der Enzymkatalyse beteiligt sind. Derartige Austauschmanöver sind jedoch für His-Seitenketten nicht möglich. Das Engineering der Substratspezifität der Histidyl-tRNA-Synthetase (HisRS) ist daher besonders wichtig, um die Vielseitigkeit der Enzymkatalyse zu vergrößern.

4.5. Leucin, Valin und Isoleucin

Bahnbrechende Arbeiten von Anker und Mitarbeitern haben gezeigt, dass 5',5',5'-Trifluorleucin zwar von Bakterien, nicht jedoch von Eukaryoten in Proteine eingebaut wird. Diese Ergebnisse wurden von Tirrell und Tang^[80] bestätigt, denen es darüber hinaus gelang, Hexafluorleucin in in-vivo-exprimierte Peptide einzubauen.^[81] Die in *E. coli* exprimierte Dihydrofolat-Reduktase aus *Lactobacillus casei* wurde mit (2S,4S)-5-Fluorleucin substituiert, um durch Ligandenbindung induzierte Konformationsänderungen des Proteins mithilfe von ^{19}F -NMR-Spektroskopie zu untersuchen.^[130] Hortin und Boime beschrieben die Translationsaktivität von *threo*-3-Hydroxyleucin,^[50] und kürzlich fanden Apostol et al. heraus,^[131] dass Norvalin (**9**) anstelle von Leucin in rekombinante Proteine eingebaut werden kann. Die nichtkanonischen Aminosäuren Norvalin (**9**), Norleucin (**3**), Allylglycin, Homallylglycin (**11**), Homopropargylglycin (**8**) und 2-Butinylalanin wurden effizient an den Leucin-Positionen rekombinanter Proteine eingebaut.^[41] Dazu wurde die T252Y-Mutante von Leucyl-tRNA-Synthetase mit verminderter Korrekturleseaktivität in *E. coli* unter Bedingungen ihrer konstitutiven Überexpression verwendet.

Die Valin-Analoga 2-Amino-3-chlorbuttersäure, Cyclobutylglycin, Penicillamin und *allo*-Isoleucin wurden zur Untersuchung des Transports sekretorischer Proteine durch das endoplasmatische Reticulum eingesetzt,^[51] in welchem Umfang sie eingebaut wurden ist jedoch bis heute nicht geklärt. Beispielsweise berichteten Porter et al.,^[132] dass Cyclobutylglycin durch ValRS unter Bildung von Cyclobutylglycyl-tRNA^{Val} aktiviert und bevorzugt anstelle von Valin in Proteine eingebaut wird. Eine neuere Studie von Marliere und Mitarbeitern hat eindeutig gezeigt, dass eine 24%ige proteomumfassende Substitution von Valin durch α -Aminobutyrat in einem *E. coli*-Stamm mit verminderter ValRS-Korrekturleseaktivität möglich ist.^[67]

Zu den Isoleucin-Analoga, die in den ersten Experimenten zum Einsatz kamen, zählen 4-Thiaisoleucin, *O*-Ethyl-threonin, *O*-Methylthreonin, 4-Fluorisoleucin und *allo*-Isoleucin.^[50-52] Unter den kürzlich in Modellproteine eingebauten neueren Isoleucin-Analoga sind Furanomycin und Trifluorisoleucin zu nennen.^[133]

Die Systeme zur Selektion und tRNA-Aminoacylierung von Leucin, Valin und Isoleucin haben in ihren Synthetasen zusätzliche Domänen für eine „Doppelsieb“-Unterscheidung^[36] zwischen verwandten und nichtverwandten, nichtkanonischen und biogenen Aminosäuren entwickelt. Veränder-

te Valyl- oder Leucyl-tRNA-Synthetasen mit inaktiverter oder verminderter Korrekturleseaktivität sollten das zweite Codierungsniveau von Leucin, Valin und Isoleucin um eine Vielzahl von Analoga, Surrogaten oder ähnlichen Aminosäuren bereichern.

4.6. Methionin

Methionin-Reste tragen sowohl durch hydrophobe Wechselwirkungen als auch durch Wasserstoffbrücken zur Strukturbildung in Proteinen bei. Sie sind relativ selten (nur 1.5 % aller Reste in Proteinen mit bekannter Struktur) und befinden sich gewöhnlich an Positionen, die vom Lösungsmittel nicht erreicht werden; nur 15 % aller Met-Reste liegen an der Proteinoberfläche.^[134] Met (**1**) war in Proteinen und Peptiden schon lange ein interessantes Austausch-Target, da es leicht und reversibel durch Oxidation in eine hydrophile Sulfoxid-Form umgewandelt werden kann. Mit der natürlichen Translationsmaschinerie war es in *E. coli* und gleichfalls in Hefezellen möglich, Met-Reste durch SeMet (**2**),^[11] Nle (**3**),^[49,71,72] Ethionin (**10**)^[13,52] und sogar Telluromethionin (**5**)^[13,135] zu ersetzen. Honek und Mitarbeiter beschrieben 1997 den Einbau von Trifluormethionin (**7**) in Phagen-Lyszym.^[136]

Ein Target für die Korrekturleseaktivität der MetRS ist die metabolische Met-Vorstufe Homocystein.^[137] Normalerweise erkennen Korrekturfunktionen alle Met-artigen Aminosäuren, die kleiner als Met sind; Nle bildet die Grenze dieses großenbasierten Ausschlussverfahrens.^[138] Kürzlich belegte Jakubowski, dass *S*-Nitrosomethionin (**6**) mithilfe von MetRS auf tRNA^{Met} übertragen und in *E. coli* sowie in Kaninchenretikulozyten in Proteine eingebaut werden kann.^[139] Durch Abspaltung der Nitrosogruppe von *S*-Nitrosomethionin-tRNA^{Met} entsteht Homocysteinyl-tRNA^{Met}, über die Homocystein anstelle von Met in vitro in Proteine eingebaut werden kann.

Die Erhöhung der intrazellulären MetRS-Konzentration durch Coexpressionsexperimente im *E. coli*-Met-Auxotroph CAG18491 mit Dihydrofolat-Reduktase als Modellprotein^[140] führten weitere Met-Analoga und -Surrogate ein (Abbildung 4): Homoallylglycin (**11**), Homopropargylglycin (**8**), *cis*-Crotylglycin (**17**), *trans*-Crotylglycin (**12**), Allylglycin, 2-Butinylglycin, 2-Aminoheptansäure (**4**), Norvalin (**9**) und Azidohomoalanin (**14**).^[141] Einige dieser Aminosäuren haben eine „doppelte Identität“ (z. B. Norvalin (**9**), 2-Butinylglycin, Homoallylglycin (**11**) und Allylglycin), da sie sowohl für MetRS, als auch für LeuRS mit verminderter Korrekturleseaktivität als Substrate dienen.^[41]

4.7. Prolin

Prolin ist die einzige kanonische Aminosäure mit einer cyclischen Seitenkette. Wegen des fixierten Winkels ϕ wirkt es als Unterbrecher von α -Helix- und β -Faltblatt-Strukturen in wasserlöslichen Proteinen und Peptiden. Bei der langsamem Faltung vieler Proteine ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die *cis-trans*-Isomerisierung an Peptidyl-Prolyl-

Amidbindungen.^[142] Ein weiterer Unterschied zu den übrigen 19 kanonischen Aminosäuren besteht darin, dass Prolin in Protein- und Peptidsequenzen oft posttranslational hydroxyliert wird. Wegen dieser Unterschiede kann Pro nur mithilfe eines erweiterten Aminosäurereservoirs cotranslational substituiert werden.

Früher nahm man an, dass 3,4-Dehydroprolin, 4-Thiaprolin, 4-Selenoprolin, *cis*-4-Hydroxyprolin, *cis*-4-Fluorprolin, *trans*-4-Fluorprolin und Azetidin-2-carbonsäure als Prolin-Analoga in der Proteinsynthese in Frage kommen,^[50-52] und neuere Untersuchungen haben bestätigt, dass *cis*- und *trans*-4-Fluorprolin, Difluorprolin und Thiaprolin in rekombinante Proteine eingebaut werden können.^[143] Darüber hinaus wurde das Prolin-Analogon 3,4-Dehydroprolin in ein periodisches Protein mit lamellarer Morphologie eingebaut.^[144]

Serin- oder Threonin-derivatisierte Oxazolidine sowie von Cystein abgeleitete Thiazolidine sind aus der Peptidsynthese als Pseudoproline für peptidomimetische Untersuchungen bekannt.^[145] Mithilfe chemisch aminoacylierter Suppressor-tRNAs fand man heraus, dass auch verschiedene Prolin-Analoga und -Surrogate, die die Rückgratstruktur beeinflussen, in Proteine eingebaut werden können. Zu diesen Analoga zählen Pipecolinsäure, Homopipcolinsäure, Cyclopropylglycin, Azetidin-2-carbonsäure und Hydroxyprolin.^[146] Obwohl der In-vivo-Einbau dieser Analoga und Surrogate bisher nicht gelang, besteht kein Zweifel daran, dass das Engineering oder die Steigerung der intrazellulären Prolyl-tRNA-Synthetase (ProRS)-Konzentration in einem Selektionsdruckexperiment zur Translation dieser Substanzen führen wird.

4.8. Arginin

Canavanin, ein sehr wirksames Gift aus rohen Samen von *Canavalia ensiformis*, wurde bislang als einziges Arginin-Analogon bei der Proteinsynthese untersucht. Schon in den 50er und 60er Jahren wurde gezeigt, dass der Einbau von Canavanin in Proteine zu Konformationsänderungen und Funktionseinbußen führt.^[54] Die Produktion funktionell beeinträchtigter Canavanyl-haltiger Proteine wirkt sich inhibierend auf das Zellwachstum aus. Aus diesem Grund wurden die antiviralen Eigenschaften und die Antitumorwirkung dieser Substanz intensiv untersucht.^[51]

4.9. Lysin

Lysin-Reste spielen in Proteinen eine wichtige Rolle als Targets zur chemischen Derivatisierung oder für posttranskriptionale Modifikationen. Frühe Studien berichteten über einige Lysin-Analoga, die potenziell in Proteine eingebaut werden können (*S*-2-Aminoethylcystein, 6-C-Methyllysin, 5-Hydroxylysin, *trans*-4,5-Dehydrolysin, 2,6-Diamino-4-hexansäure, 4-Oxalysin, 4-Selenalysin^[145]), neuere Untersuchungen auf diesem Gebiet stehen jedoch aus.

Auch hier könnte die Substratspezifität der Lysyl-tRNA-Synthetase (LysRS) durch Engineering vollständig geändert oder gezielt erweitert werden. In vitro variiert die Spezifität

der Aminoacylierung (die Diskriminierung, ausgedrückt durch den *D*-Faktor) bezüglich der 20 kanonischen Aminosäuren für die unterschiedlichen aaRS deutlich.^[137] Den höchsten *D*-Faktor (zwischen 28000 und >500000) hat TyrRS, die niedrigsten Werte (zwischen 130 und 1700) werden für LysRS beobachtet. Zukünftige Experimente sollten klären, ob diese „intrinsisch relaxierte“ LysRS-Substratspezifität allgemeine Bedeutung für eine weitere chemische Diversifizierung von Proteinen hat, die Lysin-Analoga und -Surrogate einbauen. Darüber hinaus lässt sich die Existenz zweier unabhängiger Varianten von LysRS mit gleicher Affinität für Lysin, aber unterschiedlichen Präferenzen gegenüber nichtkanonischen Aminosäuren wie Thialysin^[147] nutzen, um das Repertoire Lysin-artiger Aminosäuren zu erweitern. Die Lys-Reste befinden sich hauptsächlich an der Oberfläche von Proteinen, weshalb LysRS-basierte orthogonale Systeme, die Template mit optimierten Lys-Codon-Verteilungen verwenden, komplizierte suppressionsbasierte Ansätze bei der chemischen Diversifizierung von Proteinoberflächen ersetzen könnten.^[117]

4.10. Stoffwechseltoxizität und der Einsatz von Zwischenstufen des Sekundärmetabolismus in der Proteinbiosynthese

Alle kanonischen Aminosäuren sind perfekt in das Zusammenspiel aus zellulärer Biosynthese, Stoffwechsel und Energiehaushalt integriert. Ihre Synthese und Aufnahme müssen reguliert werden, nicht nur, um die Translation in Proteine zu ermöglichen, sondern auch, um die Balance der Metaboliten in der Zelle zu gewährleisten. Kleine Menge toxischer Aminosäuren beeinträchtigen die Lebensfähigkeit einer Zelle gewöhnlich nicht, größere Mengen können hingegen zum Zelltod führen.

Diese Beobachtungen zeigen, dass isostere Aminosäuren auch insofern physiologisch „orthogonal“ zu kanonischen Aminosäuren sind, als sie in der Zelle als Antagonisten wirken. Daher muss man metabolische Auswirkungen stets berücksichtigen, wenn die Expressionswirtzelle hinsichtlich einer Erweiterung des Aminosäurereservoirs modifiziert werden soll. Der einfachste Ansatz für eine proteomumfassende Substitution wäre demnach ein Stoffwechsel-Engineering mikrobieller Stämme, bei dem nichtfunktionalisierte aliphatische Aminosäuren wie Alanin, Leucin und Valin global substituiert werden. Wegen ihres vergleichsweise einfachen Metabolismus wäre ein Austausch dieser Aminosäuren vermutlich am wenigsten schädlich, und sie sollten die besten Kandidaten für Translationen nichtkanonischer Aminosäuren in das gesamte zelluläre Proteom sein.

Mehr als 700 biogene Aminosäuren (darunter mindestens 300 pflanzliche)^[148] bilden ein reiches natürliches Reservoir an potenziellen Substraten für die Proteinbiosynthese. In Organismen aller Lebensreiche entstehen α -Aminosäuren als Endprodukte des Sekundärmetabolismus, als Zwischenstufen von Stoffwechselwegen oder bei der Entgiftung von Fremdstoffen.

Seit Jahren werden durch Stoffwechsel-Engineering für bestimmte Substanzen (Vitamine, Hormone, metabolische Zwischenstufen) neue endogene Versorgungswege konzi-

pert, und es sollte möglich sein, in *E. coli* Aminosäuren gezielt herzustellen. Mehl et al. kombinierten dieses Stoffwechsel-Engineering mit dem In-vivo-Einbau nichtkanonischer Aminosäuren.^[149] Sie bauten in *E. coli* die Genloci *papA*, *papB* und *papC* ein, die den Syntheseapparat von *p*-Aminophenylalanin (**57**) codieren, das in *Streptomyces venezuelae* als metabolische Zwischenstufe identifiziert wurde. Die Gene wurden auf einem Low-Copy-Plasmid in *E. coli* eingebracht, das die Synthese von *p*-Aminophenylalanin aus Chorismat ermöglichte. Mithilfe eines orthogonalen Paars wurde *p*-Aminophenylalanin ähnlich genau und effizient eingebaut wie kanonische Aminosäuren. Der intrazellulär erzeugte *p*-Aminophenylalanin-Vorrat beeinflusst die intrazellulären Vorräte an kanonischen Aminosäuren nur wenig. Dieser mit orthogonalen Komponenten, einem heterologen Target-Gen und einem neuen Stoffwechselweg ausgestattete Expressionswirt ist ein lehrreiches Beispiel für die Kombination von Komponenten aus unterschiedlichen Spezies in einem System.

Dem Stoffwechsel-Engineering bakterieller und anderer Expressionswirte stehen zwei gegensätzliche Ansätze zur Verfügung. Der erste Ansatz beruht auf der vollständigen oder teilweisen Einführung neuer Biosynthesewege, der zweite nutzt Knockout-Techniken sowie die Modulation oder Einschränkung bestehender Biosynthesewege. Für praktische Anwendungen ist ein In-vivo-Expressionssystem, bei dem die Zellen die gewünschten nichtkanonischen Aminosäuren direkt aus dem Wachstumsmedium beziehen, in vielen Fällen von Vorteil. Die Expression rekombinanter Proteine mit *p*-Aminophenylalanin in *E. coli* könnte jedoch interessant sein, um zu untersuchen, wie sich ein Selektionsdruck auf das Aminosäurereservoir lebender Zellen auswirkt. Eine engere Verbindung zwischen der Naturstoffchemie und dem Engineering des genetischen Codes könnte ein weitreichenderes Screening auf geeignete Aminosäuren ermöglichen. Auf diese Weise könnten Verbindungen aus dem Intermediärmetabolismus unterschiedlicher Spezies als Kandidaten für den Eintritt in den genetischen Code identifiziert werden.

4.11. Zelluläres Korrekturlesen

Unter Selektionsdruck entwickelten lebende Zellen Verbindungen, deren Moleküle die effizienteste Größe und Form haben, um eine gewünschte Funktion auszuführen. Die monomeren Grundbausteine der Proteine, die 20 kanonischen Aminosäuren, erfüllen diese Kriterien offenbar. Man kann darüber spekulieren, ob eine größere Zahl an Bausteinen zum gehäuften Auftreten von Fehlern in der Proteinsynthese führen und so die Vorteile einer größeren Vielfalt zunichte machen würde. Unter den codierten Aminosäuren trifft man jedoch auf bemerkenswerte Ähnlichkeiten: So sind einige isoster (Val/Thr, Cys/Ser), haben das gleiche Molekülvolumen (Ile/Val, Pro/Cys) oder sehr ähnliche chemische Eigenschaften (Ser/Thr). Um diese eng verwandten Strukturen praktisch unterscheiden zu können, bedarf es geeigneter Erkennungsmechanismen, – und viele biochemische Systeme zeichnen sich durch ein nahezu perfektes Unterscheidungsvermögen aus.^[150]

Dabei sollte man immer bedenken, dass die Aktivierung der Aminosäuren und die Beladung der tRNA nicht die einzigen Kontrollschrifte der Translation sind. Beispielsweise wurde bei Versuchen zur Erweiterung des Aminosäurerepertoires mit dem SPI-Ansatz gezeigt, dass es möglich ist, 4-Aminotryptophan in das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus *Aequorea* einzubauen, 5-Aminotryptophan sowie 4- oder 5-Hydroxytryptophan jedoch nicht.^[104] Dennoch sind alle diese Substrate translationsaktiv, da man sie in ein anderes Protein (Barstar) einbauen konnte.^[105] Ein weiteres Beispiel sind Thiaprolin und Selenoprolin: Beide wurden erkannt, selektiert und in der Aminoacylierung auf verwandte tRNAs übertragen, aber nur Thiaprolin konnte in Modellproteine eingebaut werden.^[14] Die Gründe für dieses Verhalten sind noch nicht geklärt, wahrscheinlich greifen bislang unbekannte Korrekturmecanismen bei den ribosomalen Synthesezyklen oder der cotranslationalen Faltung ein. Untersuchungen der cotranslationalen oder unterstützten (d.h. Chaperon-vermittelten) Proteinfaltung sind selten, ebenso wie Studien über die Genauigkeit der Ribosomen beim Einbau nichtkanonischer Aminosäuren.

Da Zellen viele weitere biogene Aminosäuren sowie Metaboliten enthalten, genügt es nicht, nur zwischen den 20 kanonischen Aminosäuren unterscheiden zu können. Darüber hinaus reagiert die Korrekturfunktion nicht auf spezifische Merkmale chemisch oder sterisch ähnlicher synthetischer Aminosäuren, da diese in der Evolution nicht aufraten. Dass aaRSs in vielen Systemen nicht absolut substratspezifisch reagieren, ist seit Jahrzehnten bekannt, und man erkannte früh, dass sich damit ein Weg zur Erweiterung des Aminosäurerepertoires in vivo auftut.

4.12. Proteinfaltung und der genetische Code: Gibt es allgemeine Regeln für Codonneuzuordnungen?

In Bezug auf den genetischen Code entspricht der Einbau von Aminosäure-Analoga in Proteine mithilfe des traditionellen Auxotrophie-Ansatzes einer Codonneuzuordnung, für die eine einfache Regel gilt: „Ähnliches ersetzt Ähnliches“.^[6] Eine experimentelle oder natürliche Codonneuzuordnung beruht immer auf der Ähnlichkeit der Aminosäuren: Beispielsweise konnte das Met-Codon AUG Ile oder Nle neu zugewiesen werden, jedoch nicht den Aminosäuren Arginin (nichtverwandt) oder Metoxinin (Abbildung 7), da diese Neuzuordnungen für die effiziente Faltung und damit für

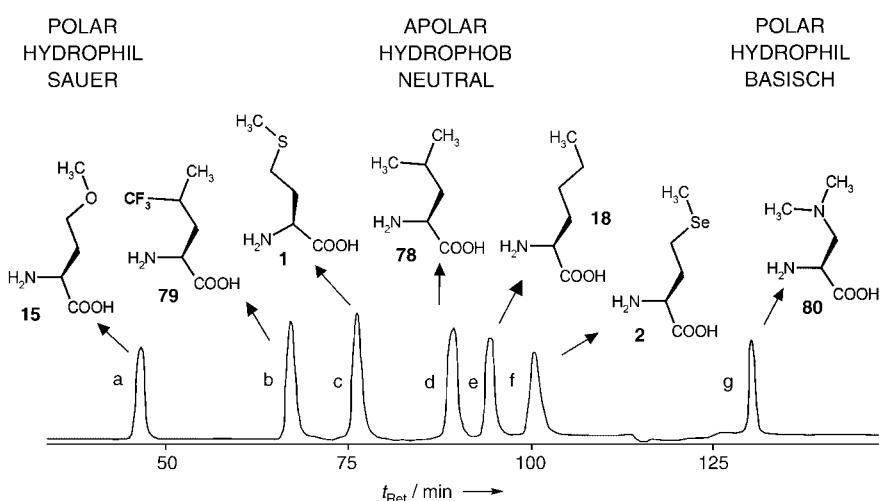


Abbildung 7. Die chromatographische Mobilität der Ninhydrin-Derivate kanonischer und nichtkanonischer Aminosäuren ist abhängig von Molekülgroße, Polarität, Hydrophobizität und pI-Wert.^[220] Die Elutionsprofile von Met (1, Signal c) und seinen isosteren Analoga Nle (18, e), SeMet (2, f) und Metoxinin (15, a) sowie von Leucin (78, d) und den isosteren Analoga 5',5',5'-Trifluorleucin (79, a) und Azaleucin (80, g) wurden auf den gleichen Retentionszeit (t_{Ret})-Maßstab projiziert. Da die Molekülform der kanonischen Aminosäuren und ihrer Gegenstücke nahezu identisch ist, beruht die Trennung auf Unterschieden in ihrer Polarität und ihren pI-Werten. Die zelluläre Translationsmaschinerie erkennt die hydrophoben Aminosäuren Leu und Met als native Substrate, deren Signale in der neutral-apolaren Region in der Mitte des Chromatogramms positioniert sind. Ihre isosteren Analoga Metoxinin (15) und Azaleucin (80), die keine Substrate für die Proteinbiosynthese sind, ergeben Signale in den sauren und basischen polaren Regionen. Hydrophobe, neutrale Aminosäuren aus der XUX-Codon-Familie (Val, Ile und Phe) können nicht durch diese polaren Aminosäuren ersetzt werden, da dies einen schwerwiegenden Effekt auf die Proteinfaltung hätte. Schon die Positionen der chromatographischen Signale geben also an, welche nichtkanonischen Analoga in den genetischen Code eintreten können.

die biologische Aktivität der codierten Proteinstruktur fatal wären.^[27] Durch die Codonneuzuordnung gemäß dieser einfachen Regel ist die Gefahr minimiert, dass die resultierende Proteinstruktur beeinträchtigt wird, denn die Änderungen in der Aminosäureseitenkette sind relativ geringfügig. In der Evolution der Proteine sind Substitutionen durch ähnliche Aminosäuren viel häufiger als solche durch unähnliche. Sonneborn erfasste diese Beobachtungen über Codierungsähnlichkeiten bei Aminosäuren mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften in einer „Theorie der Minimierung von Translationsfehlern“ durch den genetischen Code.^[151] Demnach liegt die Hauptaufgabe des genetischen Codes darin, die Strukturen von globulären Proteinen zu erhalten. Aus dieser Sicht ist die Struktur des genetischen Codes das direkte Produkt einer natürlichen Selektion für ein System, das phänotypische Auswirkungen genetischer Fehler minimiert.^[152,153]

Die einfachste allgemeine Regel für den Aufbau von Proteinen lautet: „apolar nach innen – polar nach außen“. Diesem Architekturprinzip folgend, falten sich Proteine zu kompakten Partikeln, deren hydrophober Kern vom umgebenden Lösungsmittel abgeschirmt ist. Die Einteilung in polare und nichtpolare Aminosäuren ist im genetischen Code verankert: Alle Codons mit einem zentralen „U“ codieren Aminosäuren mit chemisch relativ gleichartigen, hydrophoben Seitenketten („konvergente Typen“). Demgegenüber codieren Triplets mit einem zentralen „A“ Aminosäuren

mit chemisch unterschiedlichen, polaren Seitenketten („divergente Typen“).

Diese chemische Ordnung lässt sich durch chromatographische Experimente quantifizieren. Woese et al.^[154] bestimmten die Mobilität von Aminosäuren bei der Papierchromatographie mit unterschiedlichen Lösungsmitteln. Die beobachtete Mobilität korreliert mit der Zahl an Wassermolekülen, die für die Solvatation benötigt werden. Auf dieser Grundlage wurde der Hydrophobizitätsindex („Polar-Requirement“-Index) entwickelt^[155] der die bemerkenswerte Ordnung in der Codierungstabelle widerspiegelt: Aminosäuren mit ähnlicher Polarität/Hydrophobizität sind verwandte Triplets zugewiesen. Spätere Studien von Wolfenden und Mitarbeitern^[156,157] bestätigten, dass in der relativen Verteilung der Aminosäuren auf die Oberfläche und das Innere nativer globulärer Proteine ein Einfluss des genetischen Codes erkennbar ist.

Gleiches gilt für die Neuzuordnung oder die Substitution kanonischer Aminosäuren durch nichtkanonische. Der chromatographische Mobilitätstest für zwei Gruppen von isosteren kanonischen und nichtkanonischen Aminosäuren, Met und seine Analoga Nle, SeMet und Metoxinin (**15**) sowie Leu und seine Analoga 5'5'5'-Trifluorleucin und Azaleucin, ist in Abbildung 7 dargestellt. Die beobachtete Mobilität zeigt, dass es von der Polarität der Aminosäuren abhängt, ob sie in Proteine eingebaut werden können: Neutrale und hydrophobe (apolare) nichtkanonische Aminosäuren wie Nle, SeMet und Trifluorleucin eignen sich für die Substitution der kanonischen Aminosäuren Met und Leu. Demgegenüber konnten die isosteren, aber hydrophilen (polaren) Gegenstücke Azaleucin und Metoxinin nie erfolgreich in Target-Proteine eingebaut werden. Es überrascht nicht, dass Marlire und Mitarbeiter^[68] Azaleucin als funktionelles Analogon für Arginin verwendeten.

Die Hauptaussage dieser Beobachtung besteht darin, dass Neuzuordnungen codierender Triplets streng durch die biophysikalischen Eigenschaften sterisch ähnlicher Aminosäuren bestimmt werden. Die oben beschriebenen einfachen Experimente lehren uns auch, dass im genetischen Code zwischen „erlaubten“ und „verbotenen“ Aminosäuren eine feste Grenze gezogen ist, die auf Unterschieden in den physikochemischen Eigenschaften beruht. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, quantitativ durch einen Index abzuschätzen, ob eine synthetische Aminosäure in den genetischen Code aufgenommen werden kann. Zukünftige Arbeiten zum Code-Engineering werden zeigen, welche Kriterien (z.B. Polarität, Hydropathie, Molekülvolumen, isoelektrischer Punkt, Position in der Codetabelle und mutmaßliche Proteinstruktur) wichtig für die Entwicklung eines solchen Indexes sind.

5. Suppressionsbasierte Methoden

In der Natur sind solche Codonneuzuordnungen am häufigsten, bei denen ein und dasselbe Codon für unterschiedliche kanonische Aminosäuren codiert. Beispielsweise wird AUA in den Mitochondrien von Wirbeltierzellen mit Met übersetzt, im Cytosol ist dieses Codon jedoch Isoleucin

zugeordnet.^[158] Osawa und Mitarbeiter behaupteten abweichend davon, es sei ein zentrales Prinzip der Codonneuzuordnung, dass ein Codon nicht gleichzeitig zwei Aminosäuren zugeordnet sein darf, da sich dies für einen Organismus letal auswirken würde.^[159] Eine Ausnahme davon bildet das UGA-Codon, das Selenocystein (SeCys), Pyrrolysin, Trp und Cystein codiert und darüber hinaus als Stoppcodon dient.^[160] Als weiteres Beispiel ist das universelle Leucin-Codon CUG zu nennen, das in manchen *Candida*-Spezies mit Serin übersetzt wird.^[161] Diese Codierungseinheit, der unterschiedliche Aminosäuren zugeordnet sind, wurde als „Polysemous-Codon“ bezeichnet.^[162] Die Diversität bei der Zuordnung einzelner Codons des universellen Codes legt nahe, dass zusätzliche Aminosäuren experimentell in Proteine eingeführt werden können.^[9]

Traditionelle Auxotrophieansätze sind nur in Ausnahmefällen in der Lage, einzelne Aminosäuren in Proteinen so gezielt zu ersetzen, wie es durch positionsspezifische Mutation möglich ist. Beim Einbau von SeCys führte Selektionsdruck während der Evolution zu einer passablen Suppression von Nonsense-Interpretation. Dreidimensionale mRNA-Strukturelemente und ein spezieller Verlängerungsfaktor änderten dabei lokal die Bedeutung eines Codons. Solche lokalen Veränderungen „erweitern“ den genetischen Code,^[7] insofern als bei derartigen Experimenten zahlreiche Aminosäuren durch die Suppression von Stoppcodons oder durch Leserasterverschobene („frameshifted“) Codons in Proteinsequenzen eingeführt wurden.^[163] Die große Vielfalt chemisch oder enzymatisch aminoacylierter Suppressor-tRNAs, die sich an der ribosomalen Proteinsynthese beteiligen können, bildet die Basis für suppressionsbasierte Methoden, sowohl zum positionsspezifischen Einbau als auch zum Mehrfach-einbau von Aminosäuren.

5.1. Suppression bei der Proteintranslation

Tritt eine Nonsense(Stop)-Mutation in einer Gensequenz auf, so wird das unfertige Polypeptid vorzeitig aus dem Ribosom freigesetzt. Da viele dieser unfertigen Proteine nicht die gewünschte biologische Aktivität zeigen, sind die meisten Nonsense-Mutationen für Zellen schädlich. Solche Schäden können durch weitere Veränderungen (Suppressor-Mutationen) an verschiedenen Genen mutanter tRNAs rückgängig gemacht werden. Diese genetischen Veränderungen finden in tRNA-Anticodons statt, seltener auch in anderen tRNA-Identitätselementen. Suppressor-tRNAs können unterschiedliche kanonische Aminosäuren einbauen und damit auf Nonsense- (Stop-Codons in der mRNA), Missense-Codons (die Änderung eines Sense-Codons in ein weiteres, das für eine andere Aminosäure codiert) oder eine Frameshift-Mutation im Elterngen reagieren. Auf diese Weise werden die normalen Funktionen dieser Stop- oder Sense-Codons durch tRNAs mit veränderter Identität unterdrückt.^[158]

Die Entdeckung der Suppressor-tRNAs warf die Frage auf, wie sie mit den Freisetzungsfaktoren für Stoppcodons konkurrieren, besonders mit denjenigen für UAG und UGA, die regelmäßig am Ende von Genen auftreten. Darüber hinaus ist immer noch unklar, warum UGA- und UAG-

Suppressor-tRNAs nicht zur Bildung überlanger Proteine führen.^[164] Offensichtlich liegt für eine normale Zelle kein Vorteil darin, Suppressor-Mutationen zu beherbergen, auch wenn dadurch nur ein kleiner Anteil der Proteine funktionsunfähig wäre. Daher sollte man Nonsense- oder Missense-Suppressionen als Ausnahmefälle betrachten. Die Reaktion einer Suppressor-tRNA auf ein bestimmtes Nonsense-Codon (das Überlesen, „read-through“) kann, abhängig von dessen Position in der mRNA, um das Zehnfache variieren („Kontexteffekt“). Es sind auch Suppressor-tRNAs bekannt, die durch Insertion von Nucleotiden entstandene Frameshift-Mutationen aufheben und anschließend das Leseraster wiederherstellen.^[165]

5.2. Chemische tRNA-Misacylierungen und Amber(UAG)-Suppression *in vitro*

Lipmann und Mitarbeiter zeigten bereits früh, dass misacylierte tRNA chemisch synthetisiert werden kann; sie wandelten Cys-tRNA^{Cys} durch Desulfurierung mit Raney-Nickel in Ala-tRNA^{Cys} um.^[12] Mit misacylierter tRNA gelang es, im Modellprotein Hämoglobin alle Cys-Positionen durch Ala zu ersetzen. Dieses Ergebnis stützt die These, dass die Genauigkeit der Proteinsynthese großteils auf dem Niveau der Aminosäureaktivierung und der korrekten tRNA-Beladung durch aaRSs gesteuert wird. Später demonstrierten Hecht und Mitarbeiter^[166] den Nutzen misacylierter tRNAs bei der Aminosäuresubstitution an bestimmten Stellen in Polypeptiden. Zu diesem Zweck zeigten sie, dass Lysyl-tRNA an der ε-Aminogruppe acetyliertes Lysin annähernd gleich effizient in Kaninchen-Hämoglobin einbauen kann wie unmodifiziertes Lys.^[166] Die allgemeine Herstellungsmethode für misacylierte (Suppressor- oder normale) tRNAs von Hecht und Mitarbeitern war bereits Gegenstand von Übersichten.^[163, 167]

Eine Vielzahl chemisch acylierter Suppressor-tRNAs für das Stoppcodon UAG (Amber-Codon) beteiligt sich an der Knüpfung von Peptidbindungen am Ribosom. Suppressor-tRNA-Spezies mit dem Anticodon CUA können entweder durch chemische Modifikation kommerziell erhältlicher tRNAs (z. B. Hefe-tRNA^{Phe}) oder durch Runoff-Transkription eines Suppressor-tRNA-Gens hergestellt werden. Der Verlauf der chemischen Aminoacylierung dieser tRNAs ist in Abbildung 3 schematisch wiedergegeben. Solche tRNAs nehmen in passend programmierten In-vitro-Translationssystemen direkt an der ribosomalen Proteinsynthese teil, wodurch der Interpretationsschritt (die In-vivo-Selektion, Aktivierung und Aminoacylierung der gewünschten Aminosäure) im Fluss der genetischen Information vermieden wird. Daher überrascht es nicht, dass eine Vielzahl modifizierter Aminosäuren an der Proteinsynthese teilnehmen kann.^[168] Kürzlich erweiterten die Arbeitsgruppen von Schultz,^[169] Chamberlin^[170] und Sisido^[163] den Ansatz von Hecht durch eine Reihe von In-vitro-Experimenten mit Stop- oder Frameshift-Suppressor-tRNAs und zeigten, dass die Ribosomen bei der Translation über hundert verschiedene nichtkanonische Aminosäuren in Proteine einbauen können (Abbildung 8).

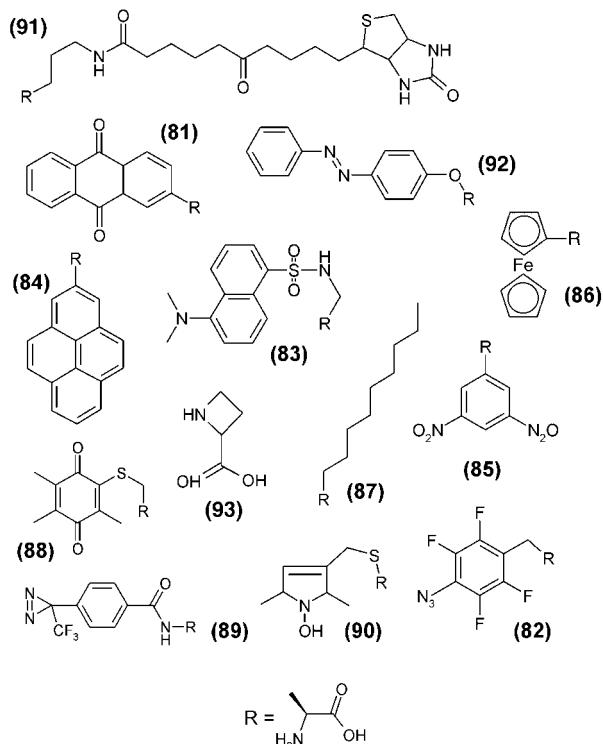


Abbildung 8. Einige translationsaktive Aminosäuren, die dem Ribosom durch chemische Aminoacylierung von Suppressor-tRNAs zugeführt werden können. Die Vielzahl synthetischer Aminosäuren, die mit diesen Ansätzen in Proteine eingebaut wurde, demonstriert die Möglichkeiten für chemische Diversifizierungen an Proteinoberflächen. Solche Verbindungen könnten als Marker für hydrophobe/polare Wechselwirkungen, als Spinmarkierungen oder als photoreaktive Seitenketten dienen, oder das Proteirückgrat fixieren. Die Aminosäuren werden jedoch nur in Ausnahmefällen ins Innere der Proteine eingebaut. (Siehe die Übersichten von Schultz et al.^[85, 167, 169, 174], Dougherty et al.^[179, 180] sowie Hohsaka und Sisido^[163]. Die IUPAC-Namen der Verbindungen sind in den Hintergrundinformationen aufgeführt.)

Die chemische Misacylierung von Suppressor- oder verwandten tRNAs vergrößerte die Einsatzmöglichkeiten von Missense- oder Nonsense-Suppressions-Phänomenen zur Erweiterung des Aminosäurererertoires durch In-vitro-Experimente. Die Zugabe dieser tRNAs zu einem Translationssystem, das mit einem Gen mit Nonsense-Suppressionsstellen programmiert war, führt zum Einbau nichtkanonischer Aminosäuren an den entsprechenden Positionen des Proteins. Chamberlin und Mitarbeiter beschrieben den positionsspezifischen Einbau von 3-Iodtyrosin in ein Peptid aus 16 Aminosäureeinheiten mithilfe eines Kaninchenretikulocyten-Systems *in vitro*.^[171]

Auf ähnliche Weise bauten Noren et al. mit einer Nonsense-Suppressor-tRNA aus Hefe mehrere Phe-Analoga ein.^[7] Diese positionsspezifische Austauschstrategie wurde erstmals durch Kwok und Wong postuliert,^[172] die zeigten konnten, dass *E. coli*-PheRS eine Hefe-tRNA^{Phe} mit weniger als 1 % der Effizienz für *E. coli*-tRNA^{Phe} aminoacyliert. Daher eignete sich die von Hefe-tRNA^{Phe} abgeleitete Amber-Suppressor-tRNA besonders gut für In-vitro-Einbauexperimente mit einem gekoppelten Transkriptions-Translations-System auf der Basis von *E. coli*. Diese tRNAs führten

die gewünschte Aminosäure effizient in das Target-Protein β -Lactamase ein; dabei wurden Positionen besetzt, die dem UAG-Codon auf der zugehörigen mRNA entsprechen. Die tRNAs wurden durch keine der anderen *E. coli*-aaRSs des Zelllysats acyliert oder desacyliert. Nach der Suppressionsreaktion wurden im Transkriptions-Translations-System von Zubay 2.8–7.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ der substituierten β -Lactamase hergestellt, was etwa 15–20 % der Produktion an nativem Protein (30–45 μg) entspricht.^[7]

Diese Erfolge waren nur möglich, weil vier Voraussetzungen für die Anwendung der Suppressionsmethode erfüllt wurden: 1) Die supprimierbare Amber(UAG)-Mutation wurde im betreffenden Gen durch konventionelle ortsgerichtete Mutagenese erzeugt, 2) das Design einer effizienten Suppressor-tRNA gelang, 3) die Suppressor-tRNA wurde chemisch acyliert und 4) man verfügte über ein geeignetes System zur In-vitro-Proteinsynthese.

5.3. Die Grenzen suppressionsbasierter Methoden

Durch den Einsatz misacylierter Suppressor-tRNAs erhielt man Proteine mit nichtkanonischen Aminosäuren an bestimmten Positionen. Bei den meisten dieser Untersuchungen wurde das UAG-Codon überlesen. Das größte Hindernis für alle suppressionsbasierten Ansätze ergibt sich daraus, dass chemisch misacylierte, synthetische Suppressor-tRNA, die mit nichtkanonischen Aminosäuren beladen ist, Nonsense-Codons (aus drei oder vier Basen) nur eingeschränkt decodieren kann. Dies überrascht nicht, denn Suppressionen sind kontextabhängige Phänomene, und nicht jede gewünschte Position einer Proteinsequenz kann beliebig supprimiert werden. Beispielsweise greifen Freisetzungsfaktoren an einigen Positionen derart effektiv ein, dass die natürliche Funktion des Amber-Stoppcodons, die Freisetzung des Proteins, nicht supprimiert wird, – selbst dann nicht, wenn die Suppressor-tRNA mit derjenigen Aminosäure beladen ist, die normalerweise im Wildtyp-Protein an dieser Stelle eingebaut wird.^[173] Weitere ungelöste Probleme sind die mangelnde Stabilität von mRNA mit Stoppcodons sowie die Stabilität von Proteinen mit nichtkanonischen Aminosäuren.

Diese Methode wird somit nicht durch die relativ niedrige Ausbeute an In-vitro-exprimierten Proteinen beschränkt,^[169] sondern durch die ineffiziente Suppression. Dieser Parameter hängt weitgehend von den Eigenschaften der Aminosäure ab, die in die Target-Proteine eingebaut werden soll. Beispielsweise kann Nle in T4-Lysozym mit 100 %, α -Methylleucin hingegen nur mit 14 % Suppressionseffizienz eingebaut werden.^[174] Zu den Suppressionseffizienzen gibt es bisher nur empirische Beobachtungen, z.B. dass das Überlesen für polare Aminosäuren nur schlecht funktioniert. Die „Nebenwirkungen“ der Suppression lassen sich zumindest teilweise umgehen, indem man für bestimmte aaRS-tRNA-Paare mit orthogonaler Funktion ein definiertes Quadruplett herstellt^[175] oder nichttoxische Analoga einsetzt (z.B. substituierte aromatische Aminosäuren). Kürzlich beschrieben Frankel und Roberts^[176] einen Selektionsansatz zur Identifizierung codierender Triplets, die für die Suppression besonders zugänglich sind. Die Einschränkungen kann man jedoch am

einfachsten umgehen, indem man Sense-Codons^[177,178] in Codon-optimierten Target-Gensequenzen verwendet (Abschnitt 5.7).

Die beeinträchtigte Lebensfähigkeit der Zelle ist nicht die einzige „Nebenwirkung“ der In-vivo-Einführung orthogonaler Translationskomponenten. Auch die Effizienz der Translation kann deutlich gemindert werden, was zu niedrigeren Ausbeuten der gewünschten Proteinvarianten führt. Beispielsweise exprimiert *E. coli* mit einem heterologen tRNA_{CUA}^{Tyr}/wtTyrRS-Paar in Vollmedien 67 mg L^{-1} Dihydrofolat-Reduktase, im Minimalmedium ist dieser Wert um mehr als 95 % auf 2.6 mg L^{-1} verringert.^[88] Dennoch könnte sich dieser Ansatz bewähren, wenn nur geringe Mengen an markierten Proteinen in lebenden Zellen benötigt werden.^[179,180]

Man sollte immer in Betracht ziehen, dass alle diese Experimente mit Modellproteinen durchgeführt wurden (z.B. Dehydrofolat-Reduktase, Streptavidin, Luziferase, kleinere Knäuelpeptide, Lactamase, Lysozym oder GFP). Bei komplizierteren Proteinen wie einkettigen Antikörpern gelingen solche Inkorporationen in aller Regel nicht. Außerdem könnten suppressionsbasierte Ansätze, mit denen Aminosäuren wie ϵ -(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-L-lysin oder Dansyllysin eingebaut werden, nur zu einer chemischen Diversifizierung der Proteinoberflächen dienen.^[181] Effiziente und einfachere Protokolle hierfür sind allerdings bereits weit verbreitet.^[117] Die derzeit verfügbare Einbaumethode muss daher entscheidend vereinfacht werden, um suppressionsbasierte In-vitro-Ansätze für Anwendungen in den Biowissenschaften attraktiv zu machen.

Die Eigenschaften der Aminosäuren korrelieren mit ihrer Suppressionseffizienz. Beispielsweise werden große hydrophobe Aminosäuren effizienter eingebaut als kleine und geladene: Zahlreiche Aminosäuren mit großen aromatischen Ringsystemen wurden in vitro eingebaut (Abbildung 8), und die meisten kürzlich durch In-vivo-Suppression eingebauten nichtkanonischen Aminosäuren waren substituierte Phe- und Tyr-Derivate (Abbildung 5). Polarität und Konfiguration der Aminosäure sowie die Stellung der Aminogruppe sind weitere Faktoren, die die Suppressionseffizienz drastisch beeinflussen. So eignen sich D-Aminosäuren oder β -Aminosäuren nicht als Substrate für die Translation mit Nonsense-Suppressionsmethoden.^[169,174] Eine interessante Frage gilt es noch zu klären: Besteht ein Zusammenhang zwischen der Suppressionseffizienz, den Eigenschaften der Aminosäuren und den allgemeinen Regeln für Codon-Neuzuordnungen?

5.4. Frameshift-Suppressionsmethoden in vitro

Bei der Translation wird das Leseraster nicht perfekt befolgt, möglicherweise resultierende Frameshift-Mutationen können aber von außen unterdrückt werden. Experimente in den 60er und 70er Jahren haben gezeigt, dass mutante *Salmonella*- und Hefe-tRNAs mit verlängerten Anticodons Nicht-Triplett-Codons zu lesen vermögen, ihre Überlesefähigkeit ist jedoch vergleichsweise gering.^[158] Kürzlich wurde nachgewiesen, dass die Effizienz einer tRNA^{Leu} mit eingebautem ³AUCU⁵-Anticodon bei der Decodierung von UAGA-Quadrupletts 20–40 % erreichen kann.^[182]

Ein auf der Frameshift-Suppression basierender In-vitro-Ansatz wurde im letzten Jahrzehnt durch die Arbeitsgruppe von Sisido entwickelt.^[183] Anhand der Kombinationen aus den Vier-Basen-Codons AGGN und ihren Anticodons NCCU wurden die Einsatzmöglichkeiten der In-vitro-Frameshift-Suppression für den Einbau bestimmter kanonischer Aminosäuren untersucht; die Einführung von 2-Anthranylalanin in Streptavidin gelang mit allen Quadrupletts (AGGG, AGGA, AGGC, AGGU).^[184] Die Target-Gensequenz wurde optimiert, indem in ihre mRNA strangabwärts zusätzliche Stoppcodons eingegliedert wurden: Nicht-leserasterverschobene Produkte wurden auf diese Weise terminiert, d.h. bei ausbleibender Frameshift-Suppression wurde die Proteinsynthese abgebrochen.^[175]

Sisido und Mitarbeiter beobachteten,^[185] dass der Einbau bestimmter nichtkanonischer aromatischer Aminosäuren davon abhängt, ob sie sich an das aktive Zentrum der ribosomalen A-Bindungsstelle anpassen können. Diese Experimente führten zu der Regel, dass nichtkanonische Aminosäuren mit großen linearen aromatischen Gruppen (z.B. 2-Naphthylalanin, *p*-Biphenylalanin, (*p*-Phenylazo)phenylalanin) günstiger sind als solche mit sehr großen oder gewinkelten aromatischen Gruppen (z.B. 9-Phenylanthrylalanin). Die Übertragung dieser Komponenten in ein zellfreies Kaninchenereticulocyten-System bestätigte die Ergebnisse im Wesentlichen.^[184]

Der Einsatz von Quadrupletts hat großes Interesse geweckt, da auf diese Weise zwei oder mehr unterschiedliche Aminosäuren in ein und dasselbe Protein eingebaut werden können. Beispielsweise wurde Streptavidin-mRNA mit CGGG- und AGGU-Quadrupletts in Gegenwart von Aminoacyl-tRNA_{CCCG} und Aminoacyl-tRNA_{ACCU} übersetzt, die mit ε-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)lysin (CGGG-Signal in der mRNA) bzw. 2-Naphthylalanin (AGGU-Signal in der mRNA) beladen waren. Sisido und Mitarbeiter haben gezeigt, dass der Einsatz von Quadrupletts bei der In-vitro-Proteinbiosynthese die Einführung nichtkanonischer Aminosäuren an mehreren Positionen eines einzelnen Proteins ermöglicht.^[186] Obwohl man den grundlegenden Vorteil dieser Strategie darin sah, die Konkurrenz mit den Freisetzungsfaktoren zu umgehen, ist es bislang noch ungeklärt, warum unterschiedliche Quadrupletts unterschiedliche Suppressionseffizienzen zeigen. Beispielsweise wurde vermutet, dass bestimmte Positionen in der mRNA eher Frameshifts verursachen als andere.^[187] Die Strategie wird daher durch zwei Aspekte eingeschränkt: durch die gesamte Überleseeffizienz der Suppressor-tRNAs und durch die gelegentlich auftretende Fehlfaltung naszierender Proteine mit modifizierten Aminosäuren.

Kürzlich wurde die Beschränkung der Größe von Anticodons untersucht,^[188,189] um zu prüfen, ob effiziente tRNA-Suppressoren für Codons aus zwei, drei, vier, fünf oder sogar sechs Basen abgeleitet werden können. Dabei zeigte sich, dass sich Fünf-Basen-Codons (Pentapletts) für den Einbau bestimmter kanonischer Aminosäuren in Proteine eignen.^[189] Ausgiebige Untersuchungen von Schultz et al. belegen, dass Codons mit drei bis fünf Basen vom Translationsapparat decodiert werden können und dass jeder Codon-Typ unterschiedliche tRNAs benötigt. Sechs-Basen-Codons sind mit

der Translationsmaschinerie nicht mehr kompatibel, und Pentapletts werden nicht mit der gleichen Effizienz supprimiert wie Quadrupletts. Wahrscheinlich bestimmt das Ribosom die Begrenzung der Codongröße, wohingegen die tRNA eine Art „molekulares Lineal“ ist, das die Codongröße während der Translation lediglich ausmisst.^[188]

5.5. Spezies-spezifische Merkmale der Aminoacylierung und orthogonale aaRS/tRNA-Paare

Auf dem Niveau der Interpretation des genetischen Codes, bei der Aminoacylierung, definiert man Orthogonalität als das Fehlen von Kreuzreaktivität zwischen heterologen aaRSs und tRNAs und den endogenen Synthetasen, tRNAs und Aminosäuren des Wirts. Die wichtigste Voraussetzung für die Herstellung orthogonaler Translationskomponenten ist der strikte Ausschluss von Kreuzreaktivitäten mit dem Proteinsyntheseapparat des Wirts. Die tRNA fungiert bei der Translation als Adapter und ist daher das interessanteste Target für das Orthogonalitäts-Engineering. Dies setzt voraus, dass die Identitätsregeln der tRNA genau bekannt sind. Ein rationales Design sowohl positiver als auch negativer Erkennungselemente der tRNAs ist schwierig, und experimentelle Ergebnisse beruhen häufig auf Zufallsentdeckungen. Manchmal ist es notwendig, außerhalb des Anticodons nach Identitätselementen zu suchen, die sich beim Design effizienter Suppressor-tRNA als Marker eignen. Die Suche nach orthogonalen Paaren mit In-vivo- und In-vitro-Suppressionsmethoden lässt sich wie folgt beschreiben: Erstens muss eine orthogonale Amber-Suppressor-tRNA_{CUA} hergestellt werden, die in der Lage ist, für ein UAG-Codon in der mRNA eine nichtkanonische Aminosäure in ein Protein einzubauen. Zweitens muss durch Mutagenese und Screening eine orthogonale Aminoacyl-tRNA-Synthetase entworfen werden. Diese orthogonale aaRS sollte ausschließlich die zugehörige orthogonale tRNA und keine der endogenen tRNAs erkennen. Schließlich muss eine Bibliothek von Mutanten der orthogonalen tRNAs und aaRSs durchgemustert werden, um orthogonale aaRS/tRNA-Paare zu finden, die die gewünschte nichtkanonische Aminosäure bevorzugt gegenüber den kanonischen Aminosäuren aktivieren und transferieren.^[190]

Bei den ersten systematischen Untersuchungen stellte man ausgehend von den dreidimensionalen Strukturen des GlnRS/tRNA_{Gln}-Paars aus *E. coli* mehrere mutante Suppressor-tRNAs her, die als Adapter bei der In-vivo-Proteinsynthese dienen sollten.^[191] Diese tRNAs wurden von endogenen aaRSs nicht als Substrate erkannt, auch nicht von der GlnRS, die eine wichtige orthogonale Komponente in einem nicht-toxischen System zur In-vivo-Aminoacylierung ist.^[192] Parallel Versuche, eine orthogonale GlnRS zu entwerfen, resultierten nicht in mutanten Enzymen, die die orthogonale tRNA besser beladen können als die nativen Enzyme.^[190] Auch Versuche, mit heterologer tRNA_{Gln} aus Hefe ein orthogonales *E. coli*-GlnRS/tRNA_{Gln}-Paar herzustellen, waren nur bedingt erfolgreich.

Der Erzeugung eines 21. aaRS/tRNA-Paars in lebenden Zellen stehen zwei grundsätzliche Hindernisse im Weg.

Erstens werden solche Enzyme wegen ihrer Redundanz von den lebenden Zellen selektiv abgebaut; sie können nur in Experimenten mit Selektionsdruck aufrechterhalten werden. Das zweite Problem besteht darin, herauszufinden, welche der übrigen tRNAs und Enzyme der Zelle direkt mit dem modifizierten Enzym interferieren.^[193] Beispielsweise entdeckten RajBhandary und Mitarbeiter ursprünglich, dass die Einführung von Hefe-TyrRS in *E. coli* letal ist, da dieses Enzym die *E. coli*-tRNA^{Pro} mit Tyr misacyliert.^[194] Daher wurde die Hefe-TyrRS derart modifiziert, dass sie die *E. coli*-tRNA^{Pro} nicht mehr falsch beladen konnte. Nur ein (durch „Error-prone-PCR“ hergestellter) Mutant mit sehr geringer Misacylierung für *E. coli*-tRNA^{Pro} war als orthogonale aaRS geeignet.

Die Entwicklung orthogonaler aaRS/tRNA-Paare war besonders erfolgreich, wenn beide Komponenten, Suppressor-tRNA und aaRS, aus einem anderen Organismus importiert wurden.^[195] Heute weiß man, dass die Nutzung der Spezies-Spezifität der Aminoacylierung am meisten für das Design orthogonaler Paare verspricht. Beispielsweise analysierten Wang et al. die biochemischen Daten der TyrRS/tRNA^{Tyr}-Paare einer Vielzahl von Organismen und folgerten, dass TyrRS/tRNA_{CUA}^{Tyr} aus *Methanococcus jannaschii* ein wertvolles orthogonales Paar für die Expression rekombinanter Target-Proteine in *E. coli* sein könnte.^[196] Die Ursache für die Orthogonalität in Tyr-Systemen liegt in den grundlegend unterschiedlichen Erkennungsmodi der tRNA^{Tyr} durch die TyrRS in Archaea/Eukarya und Eubakterien,^[197] die eine Kreuzaminoacylierung in einem derartigen Hybridtranslationssystem verhindert. Darüber sind bei der TyrRS aus *M. jannaschii* keine Korrekturmechanismen bekannt und ihre entsprechende tRNA^{Tyr} kann effizient in Suppressor-tRNA umgewandelt werden, ohne dass die Aminoacylierungseffizienz dabei entscheidend nachlässt.^[196] Weiterhin gelang der Transfer von Amber- und Ochre-Suppressor-tRNAs aus *E. coli*-Initiator-tRNAs in COS1-Säugetierzellen. Diese tRNAs fungieren nicht als Substrate für Säugetier-aaRS, und ihre Aminoacylierung mit Aminosäure-Analoga eröffnet eine Perspektive für deren positionsspezifischen Einbau in Säugetierzellen.^[198]

5.6. Orthogonale aaRS/tRNA-Paare in vivo

Chemische Aminoacylierungen sind komplexe Experimente, und In-vitro-Expressionssysteme versprechen nur niedrige Proteinproduktionen. Das war sicherlich Anreiz genug, die suppressionsbasierten Methoden auf In-vivo-Systeme zu übertragen. Auch wenn kein effizientes *E. coli*-basiertes orthogonales GlnRS/tRNA₂^{Gln}-Paar entworfen werden konnte,^[190] gelang mit diesen Experimenten doch ein methodischer Durchbruch bei der Entwicklung eines effizienten Systems für die positiv/negativ-Selektion mutanter aaRSs und tRNAs.^[43,88] Dabei rückten auch andere Aspekte ins Blickfeld, die beim Engineering des Wirtsstamms in Betracht gezogen werden sollten. Als entscheidend erwies sich beispielsweise, dass der Transport der Aminosäuren in die Zellen kein rein passiver Vorgang ist. Die meisten translationsaktiven nichtkanonischen Aminosäuren sind

etwa so groß wie kanonische Aminosäuren, und es überrascht nicht, dass „exotische“ Aminosäuren wie (*p*-Phenylazo)phenylalanin kaum als Substrate der zellulären Aminosäure-Permease-Systeme akzeptiert werden. Aus diesem Grund ist die systematische Herstellung von Bibliotheken zellpermeabler Aminosäuren ein wichtiges Forschungsfeld.^[199]

Extrachromosomal heterologe Expressionssysteme in Mikroorganismen sind besonders gut geeignet für die Erweiterung des Aminosäurererertoires, da sie sich schnell vermehren und leicht zu handhaben sind. Diese Systeme können sowohl für den positionsspezifischen als auch für den multiplen Einbau nichtkanonischer Aminosäuren programmiert werden, indem man sie mit zusätzlichen Translationskomponenten ausstattet. In lebenden Zellen kann dieses Ziel nur erreicht werden, wenn vier Voraussetzungen erfüllt sind: 1) Codierungseinheiten, die die Translation nichtkanonischer Aminosäuren programmieren, 2) tRNAs, die diese Einheiten decodieren, und 3) ein Enzym, das die tRNA belädt, müssen verfügbar sein. 4) Sowohl die aaRS als auch die entsprechende tRNA dürfen keinerlei Kreuzaminoacylierungen zulassen und müssen mit der Translationsmaschinerie und der Physiologie des Wirts kompatibel sein.^[87]

Fürster entwickelte als erster einen allgemeinen Ansatz für den positionsspezifischen In-vivo-Einbau nichtkanonischer Aminosäuren, der diese Kriterien berücksichtigte.^[200] Codiert durch ein UAG-Triplett in der mRNA, wurde das Phe-Analogon *p*-Fluorphenylalanin an Position 5 in rekombinant exprimierte Dehydrofolat-Reduktase eingebaut. Dies gelang durch die Einführung eines PheRS/Amber-Suppressor-tRNA^{Phe}-Paars aus Hefe in den Expressionswirt *E. coli*. Zwischen den PheRS aus Hefe und *E. coli* gibt es nahezu keine Kreuzreaktivität, da sich die Identitätselemente in ihren tRNAs auf vollkommen unterschiedliche Art und Weise entwickelt haben. Der verwendete *E. coli*-Stamm war Phe-auxotroph und resistent gegenüber *p*-Fluorphenylalanin, d.h. seine PheRS ließ nicht zu, dass die tRNA^{Phe} mit *p*-Fluorphenylalanin beladen wird. Für die Hefe-PheRS war *p*-Fluorphenylalanin hingegen ein fast genauso gutes Substrat wie Phe. Auf diese Weise wäre das System jedoch nicht ausreichend definiert, da das UAG-Triplett an Position 5 des Dehydrofolat-Reduktase-Gens sowohl mit Phe als auch mit *p*-Fluorphenylalanin übersetzt werden könnte. Dieses Problem wurde durch optimierte Fermentationsbedingungen umgangen, was zu 64–75 % Austausch an der Amber-codierten Position der Dehydrofolat-Reduktase führte. In diesem Beispiel wurden zum ersten Mal ein redundanter Aminoacylierungsweg und ein neues Hybridtranslationssystem eingeführt. Unter einem experimentellen Druck baut der Expressionswirt die nichtkanonische Aminosäure bevorzugt gegenüber der kanonischen ein.

Ein weiterer Fortschritt gelang mit dem orthogonalen TyrRS/tRNA_{CUA}^{Tyr}-Paar aus *M. jannaschii*^[196] im Expressionswirt *E. coli*. Beim positionsspezifischen Einbau von *O*-Methyltyrosin in die Dihydrofolat-Reduktase konnte eine Ausbeute von etwa 2 mg L⁻¹ erzielt werden.^[88] Auch den Chromophor von grün fluoreszierendem Protein (GFP)^[89] konnte eine Vielzahl Tyr-Analoga eingebaut werden. Das Hybridtranslationssystem mit TyrRS/tRNA_{CUA}^{Tyr}-Paar aus *M. jannaschii* in *E. coli* ist technisch viel ausgereifter als das

System von Furter.^[200] Die Orthogonalitätsbedingungen werden fast vollständig erfüllt, da Amber-Positionen auf der mRNA sehr genau in den Target-Proteinen wiedergegeben werden und suppressionsbedingt nur minimale toxische Effekte auftreten. Ein weiterer großer Vorteil dieses Systems besteht darin, dass Analoga aromatischer Aminosäuren eingesetzt werden können.

Es wird sich zeigen, ob diese In-vivo-Expressionssysteme für den Einsatz in Molekularbiologie und Biochemie weiterentwickelt werden können. Der eingeschränkte Erfolg bei Experimenten mit GlnRS/tRNA^{Gln}^[190] wirft die Frage auf, ob alle Synthetase/tRNA-Systeme für ein derartiges Design geeignet sind. Darüber hinaus muss für jede nichtkanonische Aminosäure durch eine Reihe komplizierter Mutagenese- und Selektionszyklen ein spezifisches orthogonales Synthetase/Suppressor-tRNA-Paar entwickelt werden. Es ist auch fraglich, ob der In-vivo-Transfer alle Probleme lösen kann, die kontextabhängige Suppressionsphänomene aufwerfen (Können alle Positionen in einer Proteinsequenz gleichermaßen supprimiert werden?). Außerdem bringt der In-vivo-Ansatz zusätzliche Schwierigkeiten mit sich, die mit der Toxizität der gewünschten Aminosäuren und ihrem Transport ins Cytoplasma in Zusammenhang stehen.

5.7. Sense-Codon-abhängige Methoden mit chemoenzymatisch beladenen tRNAs

Mithilfe von Sense-Codon-Neuzuordnungen durch chemisch oder enzymatisch beladene tRNAs könnten die Komplikationen umgangen werden, die aus Kontexteffekten in suppressionsbasierten Ansätzen resultieren. Takai et al.^[177] inaktivierten tRNA^{Asp} und tRNA^{Phe} in S30-Rohextrakten aus *E. coli* durch eine Antisense-Behandlung oder durch den Verdau eines Großteils der tRNA, ohne die Aktivität der Ribosomen wesentlich zu beeinflussen. In RNase-behandelten zellfreien S30-Extrakten nutzten sie HIV-1-Protease als Modellprotein und bereits mit Aminosäuren beladene tRNAs, um Asparaginsäure- und Phe-Reste durch 2-Naphthylalanin und (*p*-Phenylazo)phenylalanin zu ersetzen. Die Ausbeute an komplett substituiertem Protein konnten sie jedoch nicht bestimmen, vermutlich weil die Faltung der resultierenden Proteine gravierend gestört war.

Ein ähnlicher Ansatz von Sisido und Mitarbeitern^[175, 184] beruhte auf der Verwendung seltener Codons, die an jeder Position in einer mRNA-Sequenz eingebaut werden können. Eine solche Codonoptimierung der Target-Gensequenz ermöglicht den positionsspezifischen oder multiplen Einbau einer oder mehrerer unterschiedlicher Aminosäuren. Beispielsweise ist das höchst seltene Arginin-Codon AGG (das durchschnittlich weniger als 3 % zum Arg-Einbau beiträgt) ein guter Bindungspartner für chemisch acylierte tRNA_{CCU}, was für den Einbau photoaktiver Aminosäuren (*p*-Amino-phenylalanin, 2-Anthrylalanin, 1- und 2-Naphthylalanin, *p*-Biphenylalanin) genutzt wurde.^[201]

Sense-Codon-Neuzuordnungen durch extern beladene tRNAs könnten interessante Ansätze darstellen, da sie den Einsatz Codon-optimierter DNA mit In-vitro-Proteinsynthesen kombinieren. Beispielsweise wird die kanonische Ami-

nosäure Thr durch vier codierende Triplets repräsentiert (Abbildung 1), wobei ACA in *E. coli* das seltenste Codon ist. Durch die Verwendung ausgeklügelter In-vitro-Systeme wie PURE,^[202] bei dem die Zugabe aller Komponenten präzise kontrolliert werden kann, sollte es möglich sein, die gewünschte Aminosäure entweder ortsspezifisch oder multipositionell einzubauen. Durch ortsgerichtete Mutagenese kann man die Target-DNA-Sequenz derart optimieren, dass ACA nur einmal, zweimal, usw. vorkommt. Die entsprechende tRNA (tRNA^{Thr} (3'UGU^{5'})) wird enzymatisch mit der gewünschten nichtkanonischen Aminosäure beladen, die übrigen tRNA^{Thr}-Isoacceptoren werden mit Thr beladen. Wenn Probleme durch Desacylierung ausgeschlossen werden können, sollte die Zugabe dieser bereits acylierten tRNAs zu einem zellfreien System den gewünschten (positionsspezifischen oder multiplen) Einbau ermöglichen.^[255] In ähnlicher Weise kombinierten Forster et al.^[203] ein aaRS-freies Translationssystem mit chemoenzymatisch synthetisierten verwandten tRNAs, wodurch sie in vitro beliebige codierende Triplets komplett nichtkanonischen Aminosäuren zuordnen konnten.

Schließlich wurde über eine erfolgreiche Neuzuordnung codierender Triplets im Rahmen der Codonfamilien berichtet. Tirrell und Mitarbeiter^[178] verwendeten mutante HefetRNA^{Phe}, um der beiden Phe-Codons der nichtkanonischen Aminosäure 2-Naphthylalanin neu zuzuordnen. Dabei handelt es sich jedoch um einen Missense-suppressionsbasierten Ansatz, der noch an den „Kinderkrankheiten“ dieser Methoden leidet: Die Neuzuordnung war nicht vollständig. Als Antwort auf die „neuzugeordneten“ Codierungseinheiten wurden kanonische Aminosäuren bei der Translation oft bevorzugt eingebaut. Aus all diesen Gründen könnte ein Ansatz mit Codon-optimierten DNA/mRNA-Templaten am besten zur durchgehenden Translation nichtkanonischer Aminosäuren geeignet sein. Solche Template würden seltene Sense-Codierungseinheiten enthalten, die an spezifischen Positionen in einer Target-Gensequenz platziert wären. Daher wird die In-vitro- oder In-vivo-Translation dieser Codon-optimierten DNA/mRNA-Template mit nichtkanonischen Aminosäuren die suppressionsbasierten Methoden wahrscheinlich weitgehend ersetzen.

6. Weitere Aspekte eines erweiterten Aminosäurerepertoires

6.1. In-vitro- und In-vivo-Translation bei der Erweiterung des Aminosäurerepertoires im Vergleich

Die klassischen Experimente, in denen Chapeville et al. zeigten, dass misacylierte tRNA an der Proteinsynthese teilnehmen kann,^[112] wurden mit In-vitro-Translation durchgeführt. Die zellfreien Systeme mit chemisch aminoacylierten tRNAs verfügten über ein Ribosom, das erstaunlich flexibel war bezüglich der Anzahl sowie der strukturellen, sterischen und chemischen Eigenschaften der Aminosäuren, die in Proteine übertragen werden konnten. Diese chemische Vielfalt kann bei der Überführung in eine In-vivo-Methode zu einem Großteil verloren gehen. Ein neueres Beispiel zeigt,

dass ein aus dem orthogonalen TyrRS/tRNA_{CUA}^{Tyr}-System aus *M. jannaschii* abgeleitetes „orthogonales Paar“ in einem In-vivo-System hauptsächlich die Translation von Tyr- oder Phe-Analoga ermöglicht (Abbildung 5). Um ungewöhnliche Aminosäuren wie ϵ -(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-L-lysin, oder das Biotin-Derivat **91** (Abbildung 8) intrazellulär verfügbar zu machen, ist offensichtlich eine „rationale Umstrukturierung“ vieler Komponenten der lebenden Zelle notwendig. Dieser experimentelle Eingriff umfasst sowohl eine Umgestaltung, als auch nichtinvasive Veränderungen beim Transport der Aminosäure in die Zelle. Darüber hinaus müssen Wege gefunden werden, um die metabolische Aktivierung oder Modifikation zu verhindern und die Korrekturfunktionen der Translation einer intakten Zelle zu umgehen.

Man sollte sich immer bewusst sein, dass die Proteinsynthese durch In-vivo-Genexpression in einer Zelle abläuft, die wegen ihrer Zellwände und Membranen ein geschlossenen System bildet. Die Alternative stellt das offene System einer zellfreien In-vitro-Proteinsynthese dar. Daher könnte eine gekoppelte In-vitro-Transkription/Translation, die nicht von physiologischen Funktionen der Zelle behindert wird, zu einem System für das Engineering des genetischen Codes optimiert werden, das ein deutlich breiteres Substratspektrum zulässt als lebende Organismen.^[204] So erklärt sich das große Interesse an der Entwicklung zellfreier Translationssysteme mit hohen Ausbeuten. Verbesserungen werden in der aktuellen Literatur ausgiebig diskutiert, z.B. optimierte Batch-Reaktionen, die Zugabe von Chaperonen, Nachschub für verbrauchte Ausgangsstoffe, Continuous-Flow-Methoden oder die Optimierung der Anteile verschiedlicher Lysatkomponenten. Neue Generationen von hoch entwickelten In-vitro-Systemen mit besserer Kontrolle der Translationsbedingungen und höherer Proteinausbeute werden die Erweiterung des Aminosäurerepertoires sicherlich vorantreiben.

6.2. Ortsgerichteter und „statistischer“ Einbau

Für neue Forschungsgebiete kann man anfangs oft keine akkurate Definitionen festlegen, da nicht genügend Informationen zur Verfügung stehen. Es ist daher pragmatisch, eine Terminologie mit provisorischen Begriffe zu formulieren, die in der Folge verfeinert werden. Ein Beispiel aus dem Gebiet des Code-Engineerings zeigt, welche Verwirrungen auftreten können, wenn eine unausgereifte Terminologie verwendet wird: Die „Ortsspezifität“ ist eine äußerst wünschenswerte Eigenschaft eines Hybridtranslationssystems. Beispielsweise wurde oft behauptet, dass suppressionsbasierte Überlesemethoden einen „ortsspezifischen“ Einbau nicht-kanonischer Aminosäuren ermöglichen, weil ein supprimierbares Stoppcodon theoretisch so positioniert werden kann, dass die Aminosäure an jeder gewünschten Position in das Protein eingebaut werden kann. Dies trifft höchstwahrscheinlich nicht zu, da misacylierte tRNA mit Freisetzungsfaktoren konkurrieren muss, was oftmals zu einer niedrigen Suppressionseffizienz oder gar zu einem kompletten Ausbleiben der Suppression führt. Daher ist es notwendig, nach „zulässigen“ Positionen zu suchen, die eine effiziente Suppression möglich machen und so den Informationsverlust („leakage“) im

System möglichst gering halten. Im Sprachgebrauch von DNA-Mutagenese-Experimenten mit Oligonucleotiden kann ein solcher Ansatz allerdings schwerlich als „ortsspezifisch“ bezeichnet werden.

Der Begriff „statistischer“ Einbau (Markierung) ist aus den folgenden Gründen ebenfalls ungeeignet. Man ist sich noch nicht einig, ob der beschriebene Einbau einer bestimmten Aminosäure mithilfe von Überlesemethoden mit 10% Suppressionseffizienz als „statistisch“ oder „ortsspezifisch“ bezeichnet werden soll, oder ob eine 99%ige Neuordnung eines UGG-Codons (d.h. Trp-Substitution) in einer bestimmten Gensequenz „statistisch“, „multipositionell“ oder „ortsgerichtet“ ist. Derartige taxonomische Unklarheiten könnten zu Aussagen führen, wie jener, dass der Einbau mit Selektionsdruckmethoden „vergleichsweise geringen Einfluss auf dem Gebiet des Protein-Engineerings“ hat (zitiert in Lit. [104]). Dies ist irreführend, da beispielsweise der traditionelle SeMet-Einbau in Proteine mithilfe von auxotrophen Stämmen in der Strukturbioologie eine wichtige Rolle spielt. Beim Design therapeutischer Proteine für den Wirkstofftransport kann eine solche multipositionelle Ausrichtung sogar wünschenswert sein (siehe Abschnitt 7). Ob SeMet multipositionell, statistisch oder ortsgerichtet eingebaut wird, hängt letztlich von der Zahl der AUG-Codons ab, die durch rekombinante DNA-Technologie leicht experimentell manipuliert werden können.

Um derartige terminologische Mehrdeutigkeiten zu vermeiden, könnte man einfach akzeptieren, dass in natürlich vorkommenden Proteinen das Problem der „Ortsspezifität“ durch das evolutionär optimierte Auftreten der Codons in bestimmten Sequenzen gelöst wurde (Häufigkeit). Dies gilt besonders für seltene Aminosäuren wie Trp, Cys und Met. Ob eine Aminosäure ortsgerichtet oder multipositionell eingebaut ist, ist dann in erster Linie eine Frage der Codonzusammensetzung des Templaats. In der Praxis können bei Einbauexperimenten mit nichtkanonischen Aminosäuren Codon-optimierte Gensequenzen, d.h. Target-Gensequenzen mit gesteuerter Codonzusammensetzung, verwendet werden. Als Austauschtargets kann man selten in natürlichen Proteinen vertretene Aminosäuren wie Trp (1.1%) oder Met (1.5%) wählen, die oft eine entscheidende Rolle für die Funktion des Proteins spielen. Schließlich sollte es zahlreiche Proteinsequenzen geben, bei denen das Problem des multipositionellen Austauschs durch die Kombination von ortsgerechter Mutagenese mit einem erweiterten Aminosäurerepertoire elegant umgangen werden kann.

6.3. Weitere Ansätze

Beim Engineering des genetischen Codes sind experimentelle Eingriffe auf allen wichtigen Stufen der Übertragung von genetischer Information denkbar, um die Zahl der als Proteingrundbausteine dienenden Aminosäuren zu erhöhen. In der DNA/RNA-Sequenz können die Zusammensetzung und die Länge der grundlegenden Codierungs- und Decodierungseinheiten, der Codons und Anticodons, manipuliert werden. Die Aminoacylierung ist das Interpretationsniveau des genetischen Codes und daher der wichtigste

Ansatzpunkt für experimentelle Eingriffe. Da Codon-Anticodon-Wechselwirkungen unabhängig davon sind, welche Aminosäure an den Acceptorstamm der tRNA angehängt ist, bietet sich der Teilschritt der Aminosäurebeladung an, um neue Aminosäuren in den genetischen Code einzuführen. Schließlich kann man das Ribosom selbst verändern, um die Interpretation des genetischen Codes zu beeinflussen. Die Verwendung nichtkanonischer Nucleotide zur Bildung eines neuen Watson-Crick-Basenpaares wird bereits ausführlich diskutiert.^[205–207]

Um die Probleme zu umgehen, die mit der Konkurrenz durch Freisetzungsfaktoren in suppressionsbasierten Methoden einhergehen, erforschten Kowal und Oliver^[173] die Verwendung nicht zugeordneter Codons in *Micrococcus luteus*. In diesem Mikroorganismus sind sechs Codons nicht (oder nur sehr selten) zugeordnet; diese Codons könnte man in das DNA-Templat einfügen und beim positionsspezifischen oder multipositionellen Einbau nichtkanonischer Aminosäuren einsetzen. Eine komplette Translation gelang bei einer In-vitro-Reaktion in einem Lysat aus *M. luteus*, das mit einem plasmidcodierten Target-Gen und *E. coli*-tRNAs für nicht zugewiesene oder seltene Codons angereichert war.

Außer durch aaRS-Engineering könnten aminoacylierte tRNAs mit nichtkanonischen Aminosäuren auch mit speziellen Ribozymen hergestellt werden, die Aminosäuren an das 3'-Ende spezifischer tRNAs transferieren.^[208,209] Diese Methode hat jedoch noch schwerwiegende Schwächen, z.B. einen ineffizienten Aminosäuretransfer, den komplizierten Aufbau des Ribozyms (der zumindest teilweise den Einsatz chemischer Methoden verlangt) sowie hohe Konzentrationen an aminoacyliertem Ribozym.

Ein anderer Weg zur Erweiterung des genetischen Codes könnte die Manipulation der Ribosomenstruktur sein. Man weiß nur wenig über die Erkennungselemente, die es zu verändern gilt, um chemische Funktionalitäten in Proteine einzuführen. Beispielsweise zeigten Dedkova et al.,^[210] dass Mutationen der 23S-rRNA in der Region für das Peptidyl-Transferase-Zentrum und die Helix 89 zu einer Konformationsänderung führen, die die normalen Mechanismen für eine Unterscheidung zwischen D- und L-Aminosäuren in der A-Bindungsstelle des Ribosoms herunterregulierten. Solche modifizierten Ribosomen verfügen möglicherweise über veränderte Translationseigenschaften, die für die Erweiterung des Aminosäurereservoirs nützlich sein können. Die Zugabe von Suppressor-tRNA_{CUA} zu einem zellfreien System mit derartigen Ribosomen ermöglichte die Synthese von Lysinase mit D-Met und D-Phe.

Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob diese Ansätze an die Effizienz der derzeit verfügbaren Methoden zur Erweiterung des genetischen Codes heranreichen.

6.4. Zukunftsvisionen: Orthogonale Shuttle-Paar- und Hybridtranslationssysteme mit Codon-Einfang

Praktische Anwendungen in Forschung und Industrie werden die Erweiterung des genetischen Codes maßgeblich mitbestimmen. Der Schwerpunkt wird dabei auf der Entwicklung effizienter In-vitro- oder In-vivo-Hybridtransla-

tionssysteme liegen, mit denen sich maßgeschneiderte Proteine in größeren Mengen herstellen lassen. Für die Produktion therapeutischer Proteine oder neuer Materialien bietet sich das experimentelle Design spezialisierter prokaryotischer oder eukaryotischer Zellen an, die Proteinvarianten mit hoher Genauigkeit synthetisieren können. Stoffwechsel, Bioenergetik, Synthese- und Versorgungswege sowie Aminosäurevorräte solcher Zellen sollten genau regulierbar sein. Der Kombination von Stoffwechsel- und Code-Engineering steht daher eine große Zukunft bevor.

Auch die In-vivo-Expression maßgeschneidelter Proteine als Markierung in Säugetierzellen ist erstrebenswert. Dabei genügen bereits minimale Mengen der markierten Proteine, da diese leicht detektierbar sind (beispielsweise durch Fluoreszenz).^[180,211] Schließlich wäre es sehr vorteilhaft, wenn man derartige Systeme zwischen Zellen von Vertretern der unterschiedlichen Lebensreiche (Archaea-Bakterien, Eubakterien, Eukaryoten) transferieren könnte. Der aktuelle Beitrag über das orthogonale TyrRS/tRNA_{CUA}^{Tyr}-System aus *M. jannaschii* in Hefe schildert einen ersten Schritt in diese Richtung.^[212]

Die Anfänge des Engineering des genetischen Codes belegen, dass neue Aminosäuren in das existierende Repertoire eingeführt werden können. In den meisten Fällen war dies deshalb leicht möglich, weil nicht beabsichtigt wurde, „unnatürliche Organismen“ zu produzieren, sondern Systeme, die mit einem erweiterten Aminosäurereservoir arbeiten können. Das System ist mit der Translationsmaschinerie des Wirts kompatibel, die als Plattform für die Codonneuzuordnung dient. Für die derzeit verfügbaren Methoden zur Erweiterung des Aminosäurereservoirs sind vorübergehende Veränderungen charakteristisch, die durch Änderungen des Genotyps und der Physiologie lebender Zellen sowie durch Steuerung der experimentellen Bedingungen möglich werden: Überlesen, Suppression, Codonneuzuordnungen und andere. Das Ziel ist jedoch eine permanente Neuzuordnung oder die Zuordnung neuer Codierungseinheiten, d.h. der Einfang von Codons in einem Expressionssystem oder einer lebenden Zelle (Abbildung 9). Der Codon-Einfang sollte 1) nichtletal und 2) eine intrinsische Eigenschaft des Systems sein. Expressionswirtszellen, deren Lebensfähigkeit durch die Einführung einer neuen Aminosäure nicht zu stark beeinträchtigt wird, wären das am weitesten entwickelte System, um die Codierungskapazitäten des universellen genetischen Codes in vivo zu erweitern. Eine umfassendere Aufgabe besteht darin, neue Codierungseinheiten durch die Entwicklung neuer Nucleinsäure-Basenpaare einzuführen. In beiden Fällen würde die Proteintranslation um neue kanonische Aminosäuren bereichert. Der Codoneinfang in einem Organismus mit maßgeschneidertem (oder Target-verändertem) genetischem Code und einem intrinsisch erweiterten Aminosäurereservoir ist die größte Herausforderung für das Code-Engineering der Zukunft.

6.5. Kann eine „autonome synthetische Lebensform“ erschaffen werden?

Wie bereits ausgeführt, sollte der Codoneinfang nichtletal sein und als intrinsische Eigenschaft eines „unnatürlichen“

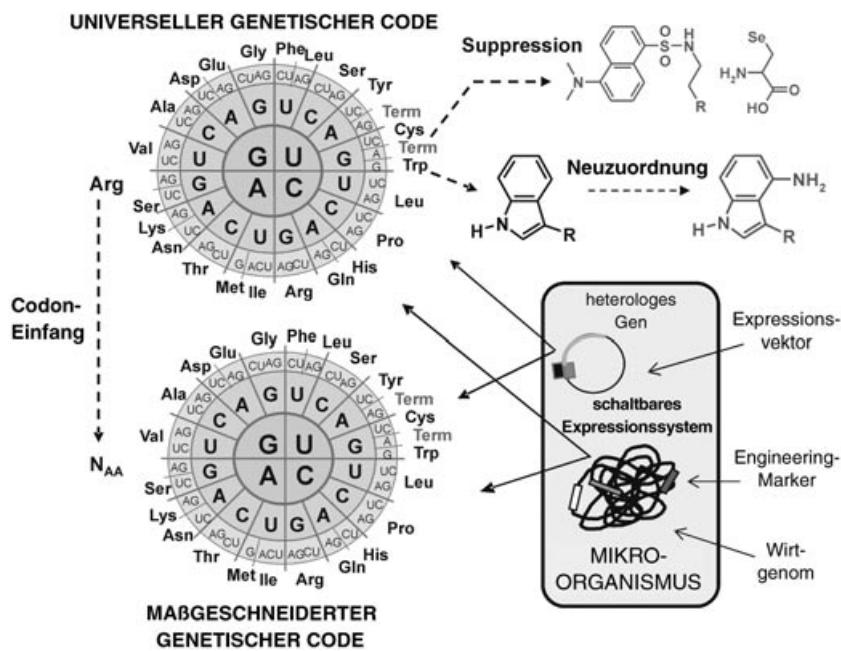


Abbildung 9. Codoneinfang als Möglichkeit, die Codierungskapazitäten des universellen genetischen Codes zu erweitern. Bei der Erweiterung des genetischen Codes bisher eingesetzte Mikroorganismen mussten Sense-, Nonsense- und Nicht-Triplett-Codierungseinheiten überleben können, die neu zugeordnet oder supprimiert wurden. Dabei ging es hauptsächlich um einzelne Proteine und selten um das gesamte Proteom. Alternativ zu diesen temporären Neucodierungen kann der genetische Code durch einen Codoneinfang maßgeschneidert werden. Dabei werden bestimmte Codierungseinheiten permanent zugeordnet, entweder im Expressionssystem oder proteomumfassend in der ganzen Zelle. Die Arg-codierenden Triplets AGA und AGG wurden im Beispiel einer hypothetischen neuen Aminosäure (N_{AA}) permanent neu zugeordnet; andere Kombinationen sind ebenfalls denkbar.

Mikroorganismus auftreten, dessen maßgeschneiderter genetischer Code über eine erweiterte Codierungskapazität verfügt. Die kürzlich beschriebene „erste synthetische Lebensform“^[213] mit rekombinant exprimiertem Protein, das infolge der Suppression des Amber-Stoppcodons *p*-Aminophenylalaninrest enthält,^[149] erfüllt diese Kriterien nur teilweise. Auch wenn *p*-Aminophenylalanin ins Proteom eines *E. coli*-Expressionswirts aufgenommen wurde, der mit einem Hybridtranslationssystem, d. h. mit orthogonalen Komponenten, ausgestattet ist, sich teilweise importierter Stoffwechselwege bedient und dessen Stoppcodon annektiert wurde, so geschieht alles nur mithilfe eines extrachromosomalen Expressionssystems (Abbildung 9). Daher ist dieser „wahrhaft unnatürliche Organismus“^[213] das, was er taxonomisch schon immer war: *Escherichia coli*. Es bleibt abzuwarten, ob *p*-Aminophenylalanin als „Codon-Fänger“ der UAG-Terminationssignale in das Genom und das Proteom eindringen kann, ohne die Lebensfähigkeit dieses Mikroorganismus zu beeinträchtigen.

Der erste Schritt in diese Richtung wäre das Eindringen einer neuen Aminosäure in das bestehende Repertoire durch Codoneinfang. Solche Zellen würden extrachromosomal oder kompartimentiert mit maßgeschneiderten genetischen Codes versorgt werden. Dabei sollte man jedoch immer an die immensen Komplikationen denken, die in der komplexen biologischen Maschinerie einer lebenden Zelle durch die Veränderung einer Schlüsselkomponente hervorgerufen

werden: Da die Komponenten auf so vielen Wegen wechselwirken, werden kompensatorische Veränderungen in anderen Komponenten die Folge sein. Beispielsweise erfordern nichtkanonische Basenpaare für eine In-vivo-Erweiterung des Codes eine experimentelle Neustrukturierung von DNA-Replikation, Transkription und Korrekturmecanismen sowie das Design neuer tRNA-Gene; außerdem müssen die neuen Basen sowie die Codierungseinheiten, die diese Basen enthalten, erkannt werden. Ähnlich könnte ein rational entworfenes orthogonales aaRS/tRNA-Paar eine umfassende Mutagenese auslösen und schließlich zum Zelltod führen. Das altbewährte Prinzip der Kontinuität von Lucretius trifft auch auf lebende Organismen zu: „*Natura non saltus fecit*“ („Die Natur macht keine Sprünge“).

Änderungen in der Struktur des genetischen Codes sind heute für fast alle Lebewesen bekannt. Beispielsweise sind alle eukaryotischen Zellen mit zwei leicht unterschiedlichen Codezuordnungs-Arrangements ausgerüstet, sie verwenden jedoch dabei das gleiche Standard-Aminosäurerepertoire. Dies bedeutet, dass eine Zelle trotz ihres komplexen Genoms und Proteoms eine der 20 kanonischen Aminosäuren unterschiedlichen Codons zuordnen kann. Die Möglichkeit, alternative Repertoires in

die bestehende Code-Struktur einzuführen, wurde als eine „Kopernikanische Wende“ bezeichnet.^[27] Das Aminosäurerepertoire des genetischen Codes aller Lebewesen ist universell, kleinere Abweichungen bei Codonneuzuordnungen werden allerdings toleriert. Auch wenn Lebewesen Codonneuzuordnungen (innerhalb des Standard-Aminosäurerepotroits) überleben können, ist die Einführung einer neuen Aminosäure schädlich. Und gerade darin liegt das Hauptziel des beschriebenen Forschungsgebiets: Es sollen Zellen mit nichtletalnen Codoneinfängen gefunden werden, die den Einbau einer neuen Aminosäure in ihr Repertoire überleben. Auf diese Weise wäre der Übergang vom Standard-Aminosäurerepertoire zu einem alternativen Aminosäurerepertoire im genetischen Code experimentell durchführbar. Inwieweit man Zellen mit nichtletalnen Codoneinfängen und maßgeschneiderten genetischen Codes, die von natürlichen Elternzellen abgeleitet sind, taxonomisch als neue Spezies oder Subspezies werten kann, muss noch geklärt werden.

7. Einige praktische Anwendungen nichtkanonischer Monomere

7.1. Proteinchemie und Engineering des genetischen Codes

Viele interessante nichtkanonische Aminosäuren enthalten wünschenswerte funktionelle Gruppen wie Halogen-

stituenten, Keto- und Silylgruppen, C=C- oder C≡C-Bindungen und könnten Proteinen bemerkenswerte Vorteile bringen. Wären wir in der Lage, diese chemische Vielfalt genetisch zu codieren, so sollten wir lebende Zellen wie Bakterien dahingehend programmieren können, dass sie aus Wasser, Salzen und einfachen Kohlenstoffquellen anspruchsvolle Produkte synthetisieren. Es ist daher unvermeidbar, Wege zur Erweiterung des genetischen Codes zu untersuchen. Die Übertragung der Fortschritte in der Chemie von Polymeren, Peptiden und Peptidmimetika auf die Proteine wird deren chemische Vielfalt bedeutend vergrößern.^[214] Es ist abzusehen, dass die Nachfrage nach Proteinen mit neuen Eigenschaften oder Funktionen sowie nach therapeutisch wirksamen Proteinen steigen wird. Daher wird die Produktion maßgeschneiderter Proteine (Alloproteine, Abbildung 6) mit programmierten Templayen in Wirtszellen mit verändertem Stoffwechsel sicherlich eine Triebkraft für das Engineering des genetischen Codes durch die Erweiterung des Aminosäurereservoirs sein.

7.2. Der isomorphe Austausch in der Biochemie

Vor mehr als zwei Jahrzehnten beschrieben Wilson und Hatfield,^[51] dass Analoga kanonischer Aminosäuren vorhersehbare Störungen in der Proteinstruktur induzieren. Dies entspricht dem isomorphen Austausch in der Protein-Röntgenkristallographie: Ein schweratomhaltiges Analogon kann in ein Protein eingebaut werden, ohne dass es zu großen Veränderungen bezüglich der Konformation der Moleküle im Kristall kommt. Dieser Einbau beeinflusst auf eine vorhersehbare Art die Beugungsmuster der Proteinkristalle, wodurch es möglich wird, die Proteinstruktur zu verfeinern. Das bekannteste Beispiel ist der routinemäßig durchgeführte SeMet-Einbau in Proteine, bei dem Selen als Markierung für die Strukturaufklärung genutzt wird.^[13, 63, 215] Im Laufe der Zeit wurden zu diesem Zweck weitere selenhaltige Aminosäure-Analoga oder -Surrogates entwickelt (Abbildung 10).^[70, 76, 103, 216, 217]

Ähnlich nutzt man bei ¹⁹F-NMR-spektroskopischen Untersuchungen die hohe Empfindlichkeit der chemischen Verschiebung von ¹⁹F bezüglich lokaler Veränderungen. Mithilfe dieser wirkungsvollen Technik können kleinste Konformationsänderungen und dynamische Prozesse in Proteinen analysiert werden.^[75] Weiterhin sind fluorierte Proteine wegen ihrer Biokompatibilität sicherlich interessant für medizinische In-vivo-Diagnosemethoden wie ¹⁹F-NMR-Kernspintomographie und -Spektroskopie. Das Potenzial von Aminosäure-Analoga in der Spektroskopie, bei der Proteinfaltung und bei Stabilitätsuntersuchungen, in den Materialwissenschaften und der Enzymologie wird an anderer Stelle ausgiebig diskutiert.^[6, 15]

Für einen Biophysiker repräsentiert der Austausch einzelner Atome oder kleiner Gruppen, etwa H/F oder CH₂/S/Se/Te, eine „atomare Mutation“.^[134, 218–220] Diese Austausche verursachen minimale Veränderungen in der lokalen Struktur, die oft weit unter dem Auflösungsvermögen der Röntgen- und NMR-Proteinanalysen liegen, und verändern dennoch wenig stabile Proteinstrukturen signifikant. Dadurch verlei-

hen sie den Proteinen neue Eigenschaften (z. B. erhöhte/verringerte Polarität) und zeigen, wie diese Eigenschaften in der kooperativ gefalteten Proteinstruktur integriert, vermehrt und moduliert werden.

Das Konzept der vorhersagbaren Störungen und des isomorphen Austausches kann man von der Strukturbioologie und der Biophysik auf die Biomedizin ausdehnen. Einige mögliche Anwendungen werden in den folgenden Abschnitten detailliert besprochen.

7.3. DNA-Nucleotid-Analoga

Analoga werden nicht nur in der Proteinchemie erforscht. Das bekannteste Beispiel ist der enzymatische Einbau von Didesoxynucleotid-Analoga (dNTPs) in einen wachsenden DNA-Strang. Auf der Grundlage dieser Experimente entwickelten Sanger und Mitarbeiter eine Methode, die das Kernstück fast aller aktueller DNA-Sequenzierungstechnologien ist. Die modifizierten dNTPs mit detektierbaren, kovalent an die Base angefügten Reportergruppen wie Digoxigenin oder Biotin, Fluorochromen oder aliphatischen Seitenketten sind in der Lage, die durch eine Reihe von DNA-Polymerasen vermittelte DNA-Synthese abzubrechen.^[158]

Der gleiche Ansatz lässt sich auch in der Biomedizin anwenden. Beispielsweise codieren der Humane Immundefizienzvirus (HIV) und andere Retroviren nicht die spezifischen Enzyme, die für den Metabolismus der Purin- oder Pyrimidin-Nucleoside benötigt werden. Viele der antimetabolischen oder antiviralen Wirkstoffe, die derzeit für die Behandlung von HIV-Infektionen verwendet werden oder sich in fortgeschrittenen klinischen Studien befinden, gehören zu unterschiedlichen Klassen von Nucleosid/Nucleotid-Analoga, die die reverse Transkriptase inhibieren, z. B. Zidovudin (AZT), Didanosin (ddI), Zalcitabin (ddC) und Stavudin (d4T).^[221]

Schließlich versucht man mithilfe ähnlicher Ansätze, den genetischen Code durch die Bildung eines 65. Codon-Anticodon-Paares aus nichtkanonischen Nucleosid-Basen zu erweitern. Die Basen sollen über Nicht-Standard-Wasserstoffbrücken oder sogar über hydrophobe Wechselwirkungen miteinander verbunden sein. Ein solches neues DNA-Basenpaar würde den Informationsgehalt der DNA vergrößern, indem es das genetische Alphabet um ein drittes Basenpaar bereichert.^[205, 206, 222]

7.4. Proteinbasierte Sensoren und goldene Fluoreszenz

Absorption im nahen UV-Bereich und Fluoreszenz sind intrinsische Eigenschaften von Proteinen, die auf aromatischen Aminosäureresten beruhen; die Beiträge der Reste zu diesen Spektraleigenschaften sind additiv. Die Aminosäure Tryptophan ist seit langem ein Ziel von Substitutionsuntersuchungen, da die UV-Absorption der Proteine hauptsächlich durch ihren Beitrag bestimmt wird.^[120] Eine Übersicht von Szabo, Ross und Hogue beschreibt ausführlich das Anwendungspotenzial von 5-Hydroxytryptophan, 7-Azatryptophan

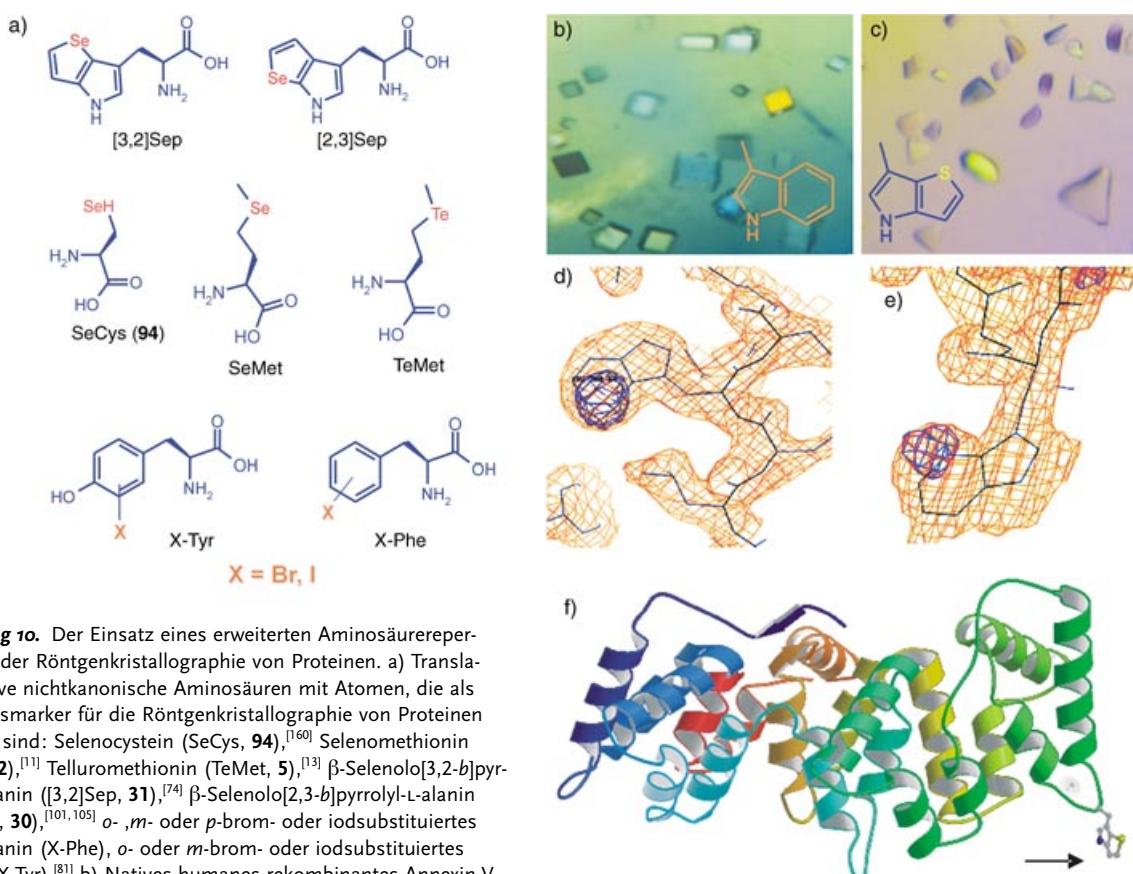


Abbildung 10. Der Einsatz eines erweiterten Aminosäurerepertoires in der Röntgenkristallographie von Proteinen. a) Translationsaktive nichtkanonische Aminosäuren mit Atomen, die als Beugungsmarker für die Röntgenkristallographie von Proteinen geeignet sind: Selenocystein (SeCys, 94),^[160] Selenomethionin (SeMet, 2),^[11] Telluromethionin (TeMet, 5),^[13] β -Selenolo[3,2-*b*]pyrrolyl-L-alanin ([3,2]Sep, 31),^[74] β -Selenolo[2,3-*b*]pyrrolyl-L-alanin ([2,3]Sep, 30),^[101,105] *o*-, *m*- oder *p*-brom- oder iodsubstituiertes Phenylalanin (X-Phe), *o*- oder *m*-brom- oder iodsubstituiertes Tyrosin (X-Tyr).^[81] b) Natives humanes rekombinantes Annexin V mit einem einzelnen Trp an Position 157 kristallisiert in der Raumgruppe R3. c) Isomorphe Kristalle von Thieno[3,2-*b*]pyrrolyl-alanin-Annexin V. Die Aminosäure ist pharmakologisch aktiv. d) Experimentell bestimmte Elektronenverteilungen bestätigen den kompletten Austausch der Benzylgruppen von Trp durch Selenophen-Einheiten von [3,2]Sep in Position 53 des Proteins Barstar (Abbildung 11). Für diesen Rest sind die Differenz-Fourier-Karten (Fo–Fc) mit 3.5 σ (blau) und die 2Fo–Fc-Elektronendichtheckarte bei 1 σ (orange) überlagert. e) Darstellung analog zu d) für den Austausch von Trp gegen [3,2]Sep an Position 157 in rekombinantem humanem Annexin V (Fo–Fc bei 3.0 σ und 2Fo–Fc bei 1 σ). f) Die Struktur von humanem rekombinantem Annexin V mit [3,2]Sep an Position 157. Für beide Proteine (Annexin V und Barstar) verlief der Einbau des Analogons isomorph: Faltungseigenschaften und Strukturen sind praktisch identisch mit denen der Elternproteine.

und fluorierten Trp-Analoga in der Fluoreszenz-Spektroskopie.^[17] Zu den neuesten Fortschritten zählen der Einbau von selenhaltigen Trp-Surrogaten (für die Strukturbioologie), pharmakologisch aktiven Schwefel-Surrogaten (Abbildung 10) sowie pH-empfindlichen Aminotryptophan-Analoga, die Perspektiven für ein einfaches allgemeines Design von Sensoren auf der Basis von Proteinen eröffnen (Abbildung 11).^[105]

Ein weiterer Schritt hin zu einer Verwendung von Amiinoindolen war ihre Integration in den Chromophor des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus der Qualle *Aequoria victoria* (*av*), das seit kurzem als Standardreporter in der Zell- und Molekularbiologie sowie als Modell für Untersuchungen zur Photophysik von Chromophoren eingesetzt wird.^[223] Der *av*GFP-Chromophor (4-(*p*-Hydroxybenzyliden)imidazolid-5-on) wird autokatalytisch in einer posttranslationalen Reaktion der Reste Ser65, Tyr66 und Gly67 gebildet.^[224] Diese Reste sind ideale Ziele für Substitutionen, da ein Effekt anhand der optischen Eigenschaften direkt erkennbar ist. Dabei ist zu beachten, dass jede beliebige aromatische Aminosäure an Position 66 den Aufbau eines fluoreszenzaktiven *av*GFP-Chromophors bewirken kann.^[225] Da im Standardrepertoire

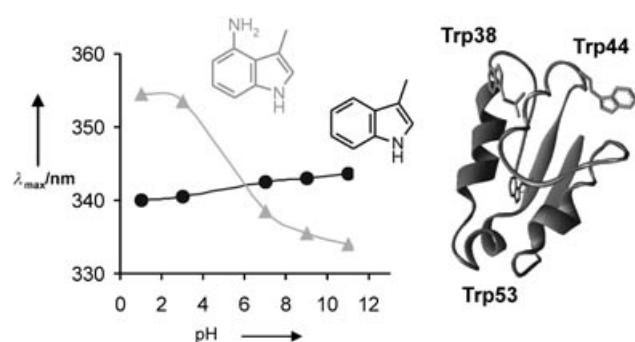


Abbildung 11. Der Austausch von Trp gegen 4-Aminotryptophan macht das pH-unempfindliche Protein Barstar zu einem pH-empfindlichen fluoreszierenden Protein. Die Lagen der Fluoreszenz-Emissionsmaxima (λ_{max}) sind nur in (4-NH₂)Trp-Barstar pH-abhängig.^[103]

nur vier aromatische Aminosäuren zur Verfügung stehen (Phe, His, Tyr und Trp), kann das spektrale Fenster durch direktes Neudesign des *av*GFP-Chromophors nur begrenzt verändert werden, und es überrascht nicht, dass in jahrelan-

gen Bemühungen mit klassischem Protein-Engineering keine signifikant rotverschobenen Varianten des GFP aus *A. victoria* erhalten wurden ($\lambda_{\text{max}} < 530 \text{ nm}$). Offensichtlich ist für eine grundlegende Modifikation des *av*GFP-Chromophors ein erweitertes Aminosäurerepertoire unentbehrlich.

Die Mutation Tyr66Trp (z.B. Ser65Thr/Tyr66Trp) führt zu den verstärkt cyan fluoreszierenden Proteinen (enhanced cyan fluorescent proteins, ECFPs) mit einer charakteristischen blaugrünen Emission und einem Indolring als Bestandteil des Chromophors. Der Austausch des Wasserstoffatoms an der 4-Position des Indolrings gegen eine elektronenliefernde Aminogruppe führt zu einem gold fluoreszierenden Protein GdFP. Mit einer Stokes-Verschiebung von etwa 100 nm ist dies die *Aequoria*-GFP-Variante mit der größten Rotverschiebung (Abbildung 12).^[104] GdFP zeichnet sich außerdem durch eine deutlich höhere Thermostabilität und höhere Stabilität als Monomer aus. Es wurde mit einem Trp-auxotrophen *E. coli*-Stamm exprimiert und gereinigt. Die Ausbeute war ähnlich hoch wie für das Elternprotein ECFP ($\approx 30 \text{ mg L}^{-1}$ Kultur), sodass es möglich war, das Protein zu kristallisieren, seine Struktur zu bestimmen sowie biochemi-

sche und biophysikalische Parameter zur Dynamik des Chromophors zu ermitteln.

Unter den verfügbaren *av*GFP-Varianten ist nur ein Paar von Proteinen, die bei derselben Wellenlänge angeregt, aber bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen detektiert werden können. Das Design von GdFP eröffnet weitere Möglichkeiten, da drei Populationen Trp-auxotroper *E. coli*-Zellen cyan, grün und gold fluoreszierende Proteine exprimieren, die getrennt detektiert werden können, nachdem sie mit Licht einer Wellenlänge angeregt wurden (Abbildung 12). Dieses außerordentlich gelungene Beispiel für das Maßschneidern von Proteinen ist wegweisend für vielfältige Markierungsanwendungen.

Die Einsatzmöglichkeiten der maßgeschneiderten *av*GFPs als Markierung in Säugetierzellen sind jedoch begrenzt, da sie auf auxotrophe Bakterienstämme oder Bakterienstämme mit geeigneten orthogonalen Paaren angewiesen sind. Es wäre ideal, Säugetierzellen mit geeigneten orthogonalen Paaren oder orthogonalen Translationskomponenten auszurüsten, um die Expression von mehreren *av*GFP-Fusionsproteinen simultan zu untersuchen. Dies setzt jedoch die

Entwicklung exprimierbarer Reportersysteme für die Verwendung in Säugetierzellen voraus.^[198, 211, 180]

7.5. Analoga, Isostere und Surrogate für die Biomedizin

Bioisostere Verbindungen mit nahezu identischen Strukturen, Formen und Volumina sowie ähnlichen Elektronenverteilungen könnten in biochemisch ähnlichen Systemen als Agonisten oder Antagonisten wirken und dadurch besondere biologische Eigenschaften hervorrufen. Richmond,^[52] Hortin und Boime,^[50] Wilson und Hatfield^[51] sowie Kirk^[58] haben frühe Studien über nichtkanonische Aminosäuren als Antimetaboliten ausführlich zusammengefasst und deren herausragende antimikrobielle, antimykotische und Antitumorwirkungen gezeigt. Diese pharmakologischen Eigenschaften, die möglicherweise großes Potential für biomedizinische Anwendungen haben, wurde jedoch nur wenig Aufmerksamkeit gewidmet.^[15] Außer der Beteiligung an der Proteinsynthese spielen nichtkanonische Aminosäuren weitere Rollen, indem sie spezifisch mit metabolischen und katabolischen Enzymen (Inhibition, Aktivierung, Modulation) wechselwirken und Biosynthese, Umwandlung, Transport und Speicherung von Aminosäuren beeinflussen.

Die Toxizität der nichtkanonischen Aminosäuren resultiert häufig aus ihrer Umwandlung in Giftstoffe auf einem komplexen Stoffwechselweg. Mikroorganismen

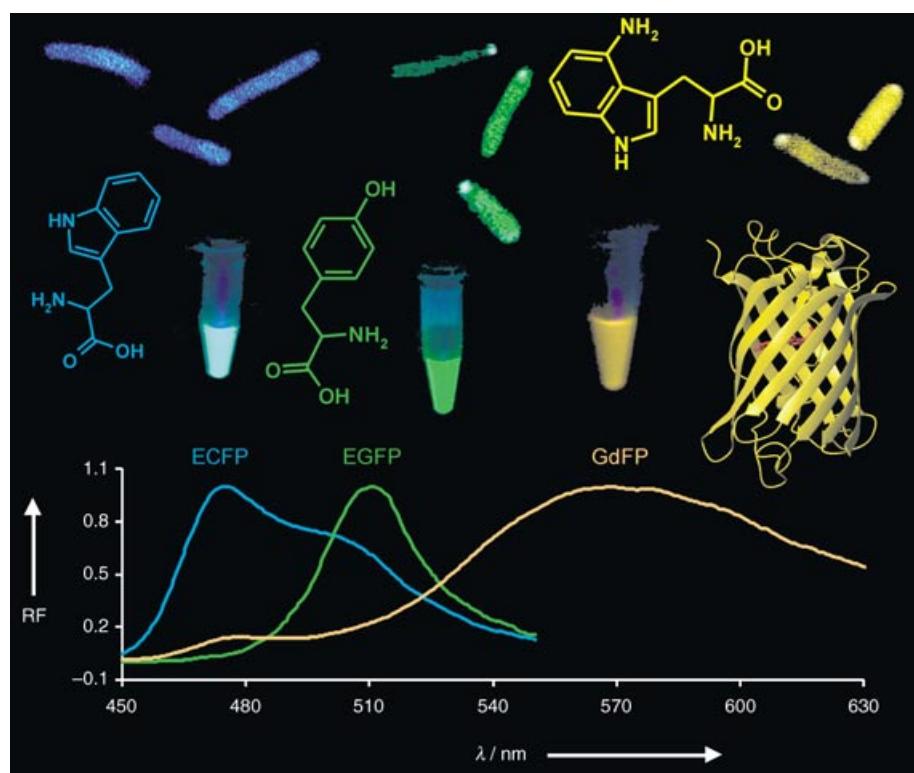


Abbildung 12. Oben: Anregung unterschiedlich emittierender *av*GFP-Mutanten und Varianten, die in Bakterienzellen exprimiert wurden, bei einer Wellenlänge und Aufnahme durch ein konfokales Standardmikroskop mit verschiedenen Emissionsfiltern. Die Fluorophore werden bei einer Wellenlänge angeregt und anhand ihrer Emissionswellenlängen unterschieden. Das gezeigte Experiment ist ein Beispiel für eine nichtinvasive multiple In-vivo-Markierung: Trp-auxotrophe *E. coli*-ATCC49980-Zellen^[102] mit cyan (ECFP, Ser65Thr/Tyr66Trp), grün (EGFP, Phe64Leu/Ser65Thr) und gold fluoreszierendem Protein (GdFP) sind nach simultaner Anregung bei $\lambda = 457 \text{ nm}$ klar voneinander zu unterscheiden. Unten: Die normalisierten Fluoreszenz-Emissionspektren dieser *av*GFP-Klassen. Die Fluoreszenz von ECFP zeigt zwei Emissionsmaxima ($\lambda_{\text{max1}} = 475 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max2}} = 506 \text{ nm}$). Das Emissionsmaximum des „klassischen“ Mutanten EGFP (mit Tyr66 im Chromophor) ist weiter rotverschoben ($\lambda_{\text{max}} = 508 \text{ nm}$).^[223] Das maßgeschneiderte GdFP (mit (4-NH₂)Trp66 im Chromophor) zeigt die größte Rotverschiebung ($\lambda_{\text{max2}} = 576 \text{ nm}$). RF = normalisierte Fluoreszenzintensität.

und Pilze wie Cephalosporine oder Penicilline produzieren ungewöhnliche aminosäurehaltige Toxine, die in Säugetieren oder anderen Mikroorganismen physiologisch hochgradig schädlich wirken. Pflanzen sind unter den lebenden Organismen die besten Chemiker: Sie produzieren eine bemerkenswerte Vielfalt von Sekundärmetaboliten wie Alkaloide, Terpene und Tannine, um sich vor Fressfeinden, Parasiten und Viren zu schützen. Viele pflanzliche Aminosäuren sind den kanonischen strukturell sehr ähnlich und können den Stoffwechsel anderer Organismen schwer schädigen. Beispielsweise verursacht die nichtkanonische Aminosäure Mimosin Haarausfall bei Weidevieh und Schafen, wenn diese auf Flächen grasen, die mit *Leucaena leucocephala* oder *Mimosa pudica* bewachsen sind. Viele Pflanzen, die für Weidetiere giftig sind, enthalten selen- oder schwefelhaltige Aminosäuren.^[148]

Die Toxizität von 3-Fluortyrosin, 3-Fluorphenylalanin und 5-Fluortryptophan ist besonders gut erforscht; sie resultiert aus der Bildung von Fluoracetat über den dominanten Tyr-Stoffwechselweg, der bereits vor über 30 Jahren entdeckt wurde.^[226–228] Das giftige Fluoracetat ist die am weitesten verbreitete natürliche Fluorkohlenstoffverbindung. Es wurde in mehr als 40 tropischen und subtropischen Pflanzenspezies gefunden. Außerdem produzieren es einige Mikroorganismen, wenn sie auf fluoridhaltigen Medien kultiviert werden. Bislang ist unbekannt, ob man solche Strategien von der Natur übernehmen kann, um gezielt Tumorzellen zu töten. In der Chemotherapie erlangt man die beste Wirkspesifität und Transportselektivität, indem man Proteine als Transporter einsetzt (Protein-Shuttle; Abbildung 13). Beispielsweise ist bekannt, dass 3-Fluortyrosin in Säugetiergebenen in letale Stoffwechselprodukte wie Fluorcitrat und Fluoracetat umgewandelt wird,^[58] das gleiche geschieht in Tumorzellen. Folglich besteht die Aufgabe darin, den Transport der cytotoxischen Aminosäuren in die Tumorzellen zu gewährleisten (Abbildung 14). Nach der Einschleusung freigesetzte cytotoxische Aminosäuren haben zwei Möglichkeiten: 1) den Einbau in andere Proteine (d.h. Wiedereintritt in die Proteintranslation) und 2) den Eintritt in den intrazellulären

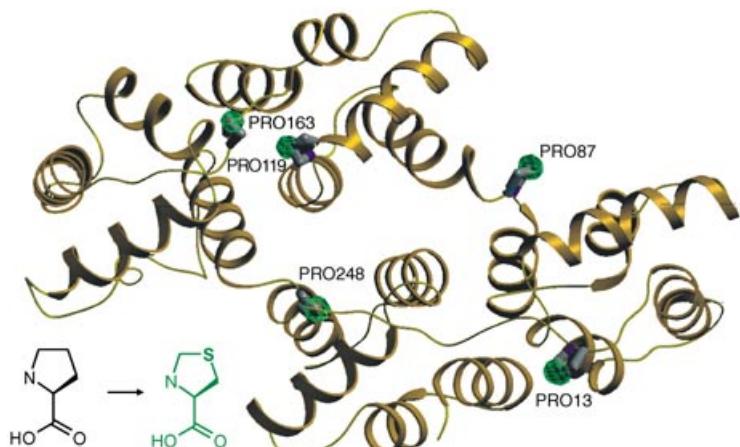


Abbildung 14. Humanes rekombinantes Annexin V, isomorph substituiert mit der nichtkanonischen Aminosäure Thiaprolin.^[14] Die Struktur des Proteins wird durch den Austausch nicht verändert. Cytotoxische Aminosäuren wie Thiaprolin können als diagnostische Marker dienen. Sie sind kovalent in das Polypeptid integriert, das eine inaktive Wirkstoffvorstufe darstellt, und sollten während des Transports nicht giftig wirken. Die strukturellen, funktionellen und immunogenen Eigenschaften des transportierenden Proteins (z.B. eines Antikörpers, Cytokins, Wachstumsfaktors oder gewebespezifischen Proteins) sollen so wenig wie möglich verändert werden.

Stoffwechsel. Die cytotoxische Wirkung folgt wahrscheinlich einem von Pattison formulierten allgemeinen Prinzip: „Jede Verbindung ist giftig, die in einfachen biochemischen Prozessen Fluoresigsäure bilden kann“.^[229]

7.6. Nichtkanonische Aminosäure-Surrogate im Gehirn?

Viele Surrogat sind aktiver als ihre Elternmoleküle. Ein bekanntes Beispiel ist das Lactose-Surrogat Isopropyl-β-thiogalactosid (IPTG), das ein viel stärkerer Induktor des lac-Operons ist als Lactose selbst. Neuroregulatorische Aminosäuren und ihre Derivate erfüllen nicht nur im Gehirn, sondern im gesamten Nervensystem entscheidende bioche-

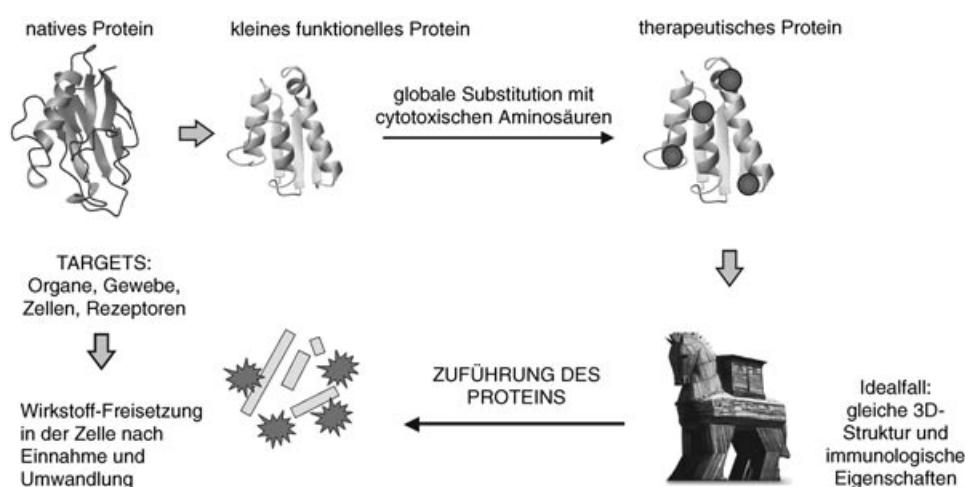


Abbildung 13. Proteine mit cytotoxischen Aminosäuren als mögliche nichtinvasive Wirkstofftransporter.^[15] Antibiotische Aminosäuren wie Penicillamin, Azaleucin, Azatyrosin, Thiaprolin, Furanomycin oder starke Antimetaboliten wie fluorierte Aminosäuren oder Canavanin können in Proteine eingebaut werden. Von rekombinanten Proteinen mit derartigen pharmazeutisch aktiven Aminosäuren erwartet man, dass sie Targets im menschlichen Körper spezifisch ansteuern und als „Shuttles“, „Trojanische Pferde“ oder „Magic Bullets“ wirken können.

mische Aufgaben. Zahlreiche neurologisch aktive Substanzen entstehen aus Aminosäuren, und die Aufnahme von Aminosäuren ins Gehirn ist außerordentlich wichtig für die Steuerung der Hirnfunktionen. Die Zusammensetzung des Vorrats an freien Aminosäuren im Gehirn unterscheidet sich stark von derjenigen anderer Gewebe. Aufnahme und Umwandlung solcher Aminosäuren bestimmen oft die Geschwindigkeit der neurologischen Prozesse ihrer Derivate. Beispielsweise führt die Verabreichung großer Mengen von Trp in Ratten zu einer verstärkten Synthese des Neurohormons 5-Hydroxytryptamin (Serotonin).^[230]

Die neurologische Aktivität einiger nichtkanonischer Aminosäure-Analoga und -Surrogate sowie ihrer Derivate ist seit langer Zeit bekannt.^[231,232] Der Transport dieser Substrate über die Blut-Hirn-Schranke, frei oder durch einen Peptid- oder Protein-Carrier, könnte das Gehirn mit neuen, synthetischen Substanzen versorgen.

Die gelockerte Substratspezifität der Gehirnenzyme lässt sich an den Beispielen der unspezifischen aromatischen Aminosäure-Decarboxylase sowie der Dopamin-β-Hydroxylase beschreiben. Die Enzyme sind für die Umwandlung einer Reihe von Tyr-Derivaten in Analoga von Norepinephrin sowie die Umwandlung der von 5-Hydroxytryptophan abgeleiteten Serotonin verantwortlich. Auch die Speichermechanismen sind wenig selektiv: Sie unterscheiden nicht zwischen prozessierten (decarboxylierten) kanonischen Aminosäuren und ihren Aminosäure-Surrogaten.^[233] Diese Merkmale könnten dabei helfen, die synaptische Aktivität mithilfe von nichtkanonischen Aminosäure-Analoga oder -Surrogaten zu modulieren, da diese in einige Stoffwechselwege ihrer kanonischen Gegenstücke eintreten und Metaboliten bilden könnten, die natürliche Neurotransmitter ersetzen würden.

Aminosäurebasierte Neurohormone sind an vielen neurologischen Prozessen und Gehirnfunktionen beteiligt. Daher ist es denkbar, dass Surrogate und Analoga den Hormonhaushalt des Gehirns stören und sogar den Bewusstseinszustand ändern könnten. Aminosäure-Surrogate sollten die Untersuchung der Chemie des Gehirns, der molekularen Grundlagen des Denkens, des Gedächtnisses und der Sinneswahrnehmung erleichtern und die Entwicklung wirksamer Medikamente unterstützen.^[234]

8. Die Zukunft des Engineerings des genetischen Codes

8.1. Proteinchemie und Genetik: Vergangenheit und Gegenwart

Gegen Ende des 19. Jahrhunderts hatten Proteinchemiker die meisten Aminosäuren identifiziert, die heute als die Grundbausteine aller Proteine bekannt sind. Zur gleichen Zeit erklärten Fischer^[235] und Hofmeister^[236] die Verknüpfung von Aminosäuren in Proteinen durch die „Peptid-Hypothese“ (Konzept der Peptidbindung). Fast ein halbes Jahrhundert dauerte die Entwicklung von Analysetechniken, bis die Hypothese mit der Sequenzierung von Insulin durch Sanger endgültig bestätigt wurde.^[237] Wie die Aminosäuren zu den Polypeptidketten verknüpft werden, wurde erst klar, als experimentell nachgewiesen wurde, dass RNA-Template die

Synthese aller Proteine steuern. Erst an diesem Punkt war die direkte Verbindung zwischen der Proteinsynthese in Organismen und ihrem genetischen Programm offensichtlich.

Nach ihrer eindeutigen Identifizierung als Trägerin des Erbguts durch Avery, Hershey und Chase^[238,239] richteten Biologen, Chemiker und Physiker ihr Interesse auf die DNA. Sicherlich ebnete das „Ein-Gen-ein-Protein“-Konzept von Beadle^[240,241] den Weg für die Entdeckung der Regulation der Genexpression durch Jacob und Monod.^[242] Nach der Entschlüsselung des genetischen Codes^[3,4] war die Entwicklung nicht mehr aufzuhalten. In den frühen 70er Jahren waren fast alle entscheidenden Konzepte der Genetik etabliert, die heute zum biochemischen Grundwissen zählen. Das „Ein-Gen-ein-Protein“-Konzept passt sicherlich nicht in das heutige Bild eines vielschichtigen Proteoms, seine historische Bedeutung als eine Arbeitshypothese, die zu wichtigen Entdeckungen und Entwicklungen geführt hat, ist jedoch unbestritten.

Ansätze zum Einbau nichtkanonischer Aminosäuren in Proteine entwickelten sich bereits in den 50er Jahren,^[52] an einer Erweiterung des Aminosäurerepertoires konnte jedoch erst nach der Einführung der rekombinanten DNA-Technologie gearbeitet werden. Wie bei der Entschlüsselung des genetischen Tripletts-Codes, müssen auch hierbei Organische Chemie und Genetik Hand in Hand zusammenarbeiten. Die neuen Vorhaben zielen über die Herstellung von Proteinen mit synthetischen Aminosäuren hinaus auf eine Veränderung des universellen genetischen Codes und eine mögliche künstliche Evolution.

8.2. Theorien zum genetischen Code und zum Code-Engineering

Untersuchungen zu Natur und Entwicklungsgeschichte des genetischen Codes waren seit jeher eine Domäne der Theoretischen Biologie, die Suche nach den Möglichkeiten zur Erweiterung des Aminosäurerepertoires fiel jedoch der Proteinchemie zu. Das Gebiet der molekularen Evolution wurde in den letzten Jahrzehnten durch Untersuchungen an unterschiedlichen Evolutionsmodellen für den genetischen Code geprägt, die das experimentelle Engineering des genetischen Codes allerdings nur wenig beeinflussten.

Mit den klassischen Experimenten von Miller^[25] über die spontane präbiotische Synthese von Aminosäuren begann die Suche nach dem Ursprung des Lebens mithilfe von experimentellen Ansätzen. Hinsichtlich des genetischen Codes beschränkt sich die große Mehrheit der Beiträge auf theoretische Aussagen; nur wenige Autoren haben sowohl theoretische als auch praktische Forschungen angestellt. Yarus bemerkte dazu kürzlich: „the immediate future of the code origin appears to be in hands of experimentalists“.^[243] Wong et al. lieferten historisch wichtige Beiträge zur Erweiterung des Aminosäurerepertoires,^[66,172] darüber hinaus postulierte die Coevolutionstheorie für den Ursprung des genetischen Codes, dass bei der Erweiterung des genetischen Codes Vorläufer-Aminosäuren aus sich entwickelnden Biosynthesewegen einbezogen wurden.^[244] Demnach sollte eine Erweiterung der Codierungskapazitäten des bestehenden genetischen Codes möglich sein, wenn Mikroorganismen zusätzlich mit

neuen Biosynthesewegen für Aminosäuren ausgestattet werden, die mit der Physiologie und dem Stoffwechsel der Zellen kompatibel sind. Das Aminosäurerepertoire kann somit nicht frei erweitert werden, indem man die Effizienz einer einzelnen Funktion maximiert, sondern diese Entwicklung ist mit einem Ausbau weiterer Stoffwechsel- und Biosynthesewege der Zelle verbunden. Neuere Experimente von Mehl et al. scheinen dies zu bestätigen.^[149]

Weitere Aspekte der Evolution des genetischen Codes, z.B. seine Prägung durch Selektionsdrücke, die Fähigkeit zur Minimierung von Translationsfehlern und seine Flexibilität, könnten dem experimentellen Code-Engineering den Weg weisen. Wenn man die immense Komplexität der betrachteten biologischen Systeme berücksichtigt, sollte es nicht überraschen, dass trotz der Menge an Untersuchungen zur Evolution des genetischen Codes keine allgemein anerkannten Konzepte vorliegen.

Wahrscheinlich werden wir den Ursprung und die Entwicklung des Codes nie exakt entschlüsseln. Der genetische Code ist ein Produkt der Darwinistischen Evolution,^[144,245] und Darwinismus ist per se ein historisches Konzept. Daher bleibt das Experiment beim Engineering des genetischen Codes der Prüfstein für Vorhersagen, Hypothesen und Erwartungen. Und selbst damit sind unlösbare Komplikationen und Kontroversen schwer zu vermeiden: Ein Beispiel ist das „U“ in der zweiten Position von Triplets, die hydrophobe Aminosäuren codieren. Auf diese Weise konserviert der genetische Code die Hydrophobizität gegenüber zufälligen Nucleotid-Mutationen. Das überrascht nicht, denn diese Eigenschaft ist eine wichtige Triebkraft für die Proteinfaltung. Demgegenüber ist es bekanntermaßen häufig schwer, eine einzelne Eigenschaft von Aminosäuren des Standardrepertoires zu charakterisieren. Beispielsweise ist nicht geklärt, ob Trp als hydrophob einzustufen ist:^[246,247] Mehr als vierzig Hydrophobizitätsskalen sind beschrieben worden, und viele widersprechen sich bezüglich der hydrophoben/hydrophilen Natur von Trp.^[248]

8.3. Code-Engineering und De-novo-Protein-Design

Die Begriffe „Protein-Engineering“ und „Protein-Design“, die in zahlreichen zeitgenössischen Forschungsberichten verwendet werden, beziehen sich gewöhnlich auf Modifikation oder Neugestaltung programmierten Proteinmoduls. Diese werden in der Regel durch Mustererkennung oder Austausch (Permutation) unter den 20 kanonischen Aminosäuren identifiziert. Beide Wege wurden in der Evolution über mehrere Milliarden Jahre durch vielfältige Selektionsdrücke optimiert. In den vergangenen zwanzig Jahren haben sich zwei grundlegend unterschiedliche Ansätze entwickelt: 1) eine „rationale“ Neugestaltung durch ortsgerichtete Mutagenese. Diese Methode setzt voraus, dass die dreidimensionale Struktur des Proteins bekannt ist. Außerdem muss vorhersagbar sein, welchen Effekt ein Austausch unter den 20 kanonischen Aminosäuren hat, und 2) Zufallsmutationstechniken wie das „DNA-Shuffling“, das auf einem Mutations/Selektions-Ansatz beruht und den natürlichen Selektionsprozess imitiert.

Obwohl zahlreiche Untersuchungen und experimentelle Beobachtungen über die Faltungseigenschaften von Proteinen veröffentlicht worden sind, gibt es immer noch keine allgemeinen Regeln für ein erfolgreiches De-novo-Protein-Design.^[249] Der schnelle Fortschritt der Strukturbioologie, der sich im drastischen Anstieg der Zahl bekannter dreidimensionaler Strukturen widerspiegelt, trug überraschenderweise nur wenig dazu bei, die Probleme des rationalen Designs zu lösen. Trotz des Aufsehens, das ihre Veröffentlichung erregte, hat die Aufklärung der Strukturen aller Translationskomponenten, einschließlich des Ribosoms,^[250] die experimentelle Erweiterung des genetischen Codes nur marginal vorangebracht. Die kürzlich ermittelte Struktur des TyrRS/tRNA_{CUA}_{Tyr}-Paars aus *Methanococcus jannaschii*^[251] erklärt beispielsweise die strukturelle Grundlage der Orthogonalität – allerdings a posteriori, nachdem die neue aaRS-Substratspezifität bereits etabliert war! Auch wenn dreidimensionale Strukturen wertvolle Ausgangspunkte für Designversuche sind, so wird doch deutlich, dass diese vorwiegend mechanistischen und beschreibenden Methoden den Anforderungen an ein rationales Proteindesign und Code-Engineering nicht gerecht werden. Man kann hoffen, dass die Proteinchemie durch das Code-Engineering der biochemischen Forschung künftig eine andere Richtung geben kann – weg von den vorherrschenden, beschreibenden Ansätzen, hin zu einer Forschung, die durch Intuition, neue Konzepte und Erfindergeist geprägt ist.

Das Problem des De-novo-Designs von Proteinen wird nicht alleine durch die Erweiterung des Aminosäurerepertoires gelöst. Schon auf dem jetzigen Entwicklungsstand sind viele Fälle bekannt, in denen sich translationsaktive Aminosäuren ungünstig auf die Faltung und die strukturelle Integrität der Target-Proteine auswirken. Viele interessante nicht-kanonische Aminosäuren können also nicht einfach ohne Neugestaltung oder De-novo-Design in ein natürliches Proteingerüst eingebaut werden. Bildlich gesprochen sind wir in der gleichen Situation wie die Baumeister im frühen Mittelalter, die sich ihr Material aus griechischen und römischen Prunkbauten beschafften.

8.4. Perspektiven des Code-Engineerings

Alle Fortschritte in den Naturwissenschaften, auch Entwicklungen zur künstlichen Erweiterung des genetischen Codes, beeinflussen die Gesellschaft, indem sie neue Technologien bereitstellen und Perspektiven eröffnen. Oft werfen Fortschritte jedoch auch zahlreiche philosophische, religiöse und ethische Fragen auf. Sie können einschneidende Neubewertungen bewirken, Obsoletes verdrängen, oder sogar dazu führen, dass sich in einer Gesellschaft neue ideologische, religiöse oder ethische Standpunkte herausbilden.

In der Sichtweise des Darwinismus würde man den genetischen Code als denjenigen Bestandteil der Zellchemie verstehen, der die Überlebensfähigkeit in einer bestimmten Umgebung zu sichern hat.^[45] Diesem Konzept zufolge entwickeln sich biologisch aktive natürliche Proteine und lebende Organismen ohne Beteiligung bewusster Steuerelemente.^[252] Demgegenüber wäre das Engineering neuer Funktionen in künstlichen Proteinen oder sogar Zellen mit einem erweiter-

ten Aminosäurerepertoire ein Beispiel für bewusstes, vom Menschen gesteuertes Design.

Vom praktischen Standpunkt betrachtet, wird sich die experimentelle Forschung in den kommenden Jahrzehnten hauptsächlich darauf konzentrieren, das vorhandene Wissen über die grundlegenden Faktoren hinter der Organisation des genetischen Codes zu nutzen, um weitergehende Manipulationen durchzuführen. Dabei wird man sich in einem weitaus größeren Maß als heute der Evolutionsstrategie der Natur bedienen. Die natürliche Selektion ist kein zufälliger Prozess, sondern sie wird durch die Umgebung geprägt. Sie ist ein statistisches Ereignis, das andernfalls extrem unwahrscheinliche, aber anpassungsfähige genetische und phänotypische Kombinationen bevorzugt. Dieser Prozess ist hochgradig innovativ und teleonomisch, da er eine Funktion in einer bestimmten Umgebung verbessert.

Die Entwicklung maßgeschneiderter Proteine, die in spezialisierten Zellen (mit einem gezielt veränderten genetischen Code) hergestellt werden, um in einer definierten Umgebung eine bestimmte Aufgabe zu erfüllen, leitet die „Post-Proteom-Ära“ ein. Dennoch sollte man Fortschritte auf diesem Gebiet auch in Zukunft nicht als „revolutionär“ bezeichnen – auch Intuition und Forscherglück sind wichtige Faktoren für bahnbrechende Entdeckungen. Ein weiterer Grund dafür, immer skeptisch gegenüber als „revolutionär“ Bezeichnetem zu sein, liegt in der Tatsache, dass letztlich nur geschicktes und engagiertes Experimentieren solche Entwicklungen ermöglichen kann. Weiterhin ist es schwer vorstellbar, dass ein gefeierter Fortschritt zu einem „Paradigmenprung“ führt. – Vielmehr sollte man an ein graduelles Anpassen der Konzepte und experimentellen Möglichkeiten denken, die in der Tradition von Mendel und Darwin stets kritisch geprüft und verbessert werden müssen.

Addendum

Seit Einreichen dieses Aufsatzes wurde eine Reihe wichtiger Beiträge zu diesem aufstrebenden Forschungsgebiet veröffentlicht.

Prolin- und Phenylalanin-Analoga und -Surrogate: Die Erwartung, dass Prolin-Analoga und -Surrogate wie *cis*- und *trans*-4-Hydroxyprolin, Piperidin-2-carbonsäure und Azetidin-2-carbonsäure durch Engineering oder eine einfache Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Prolyl-tRNA-Synthetase (ProRS) translationsaktiv werden können (Abschnitt 4.7), wurde von Conticello und Mitarbeitern bestätigt.^[256] Sie bauten diese Aminosäuren effizient in rekombinantes Elastin ein, indem sie Pro-auxotrophe Stämme mit nativer genomicscher Hintergrundaktivität von ProRS verwendeten oder Pro-defiziente Stämme, die mit erhöhten Mengen nativer oder mutanter ProRS ausgerüstet waren, deren Expression durch ein orthogonales Promotorsystem kontrolliert wurde. Bentin et al. gelang auf ähnliche Weise, durch Verwendung der PheRS-Mutanten PheRS- α Ala294Gly mit gelockerter Substratspezifität, der Einbau größerer Mengen der photoreaktiven bicyclischen Aminosäure Benzofurylalanin in ein Modellprotein.^[257]

Identitätsproblem: Ein wichtiger Beitrag zur „Identität“ von Aminosäuren (Abschnitt 2.3) mit Bezug auf die Protein-Translationsmaschinerie kommt von Tirrell und Kumar.^[258] Darin bestätigen sie die Hypothese, dass dieselbe Aminosäure das Substrat für zwei Synthetasen ist und folglich auf zwei verschiedenen tRNAs geladen werden kann, die dann dieselbe „Identität“ hätten. Es ist bekannt (siehe z. B. Lit. [259] und [260]), dass der Anteil der tRNA-Misacylierungen mit der Erhöhung der aaRS-Konzentration im Cytosol steigt. In dieser Arbeit wird explizit gezeigt, wie Änderungen der Cytosol-Konzentrationen von aaRS in bakteriellen Expressionswirten dazu führen, dass ein und dieselbe RNA-Information unterschiedlich interpretiert wird. Tirrell, Kumar und Mitarbeiter zeigten dies am Beispiel der nichtkanonischen Aminosäure (2S,3R)-4,4,4-Trifluorvalin, deren Identität in der Proteintranslation dadurch verändert werden kann, dass sie entweder Isoleucin- oder Valin-Codons zugeordnet wird. Die Zuordnung richtet sich nach den intrazellulären Konzentrationen von Isoleucyl- und Valyl-tRNA-Synthetase im Expressionswirt. Dieses hervorragende Beispiel zeigt, wie das Wissen um kinetische Größen, speziell um die relativen Geschwindigkeiten konkurrierender Aminoacylierungen, die Erweiterung des Aminosäurerepertoires fördern kann.

Verbindung zwischen Theorie und Experiment: Die Ergebnisse in Lit. [254] erwiesen sich als maßgeblich für das Verständnis des Ursprungs eines alternativen genetischen Codes, wobei die Hypothese einer mehrdeutigen Zwischenstufe (ambiguous intermediate) von Schultz und Yarus bevorzugt wird.^[261,262] Zwei jüngere Veröffentlichungen zeigen, dass auch Forscher, die sich vom Standpunkt der Theoretischen Biologie aus mit der Evolution des genetischen Codes beschäftigen, eine alte Tradition wieder aufnehmen (siehe auch Abschnitt 2.2, Lit. [27]) und Experimenten zum Code-Engineering zunehmend Aufmerksamkeit schenken. Erwähnenswert sind eine Übersicht von Bacher, Hughes, Wong und Ellington^[263] sowie ein Kommentar von Cavalcanti und Landweber,^[264] die verschiedene Hypothesen zu Entstehung und Entwicklungsmöglichkeiten des genetischen Codes im Licht der Ergebnisse neuer Code-Engineering-Experimente betrachten.

Weitere Beiträge und Übersichten zum Thema: In der Zwischenzeit hat die Arbeitsgruppe von Schultz über die Verwendung orthogonaler TrpRS/tRNA^{Trp} berichtet, die das Opal-Codon effizient supprimiert und den selektiven Einbau von (5-OH)Trp in Proteine von Säugetierzellen ermöglicht.^[265] Einen weiteren Erfolg erzielten sie bei Design und Herstellung eines orthogonalen Synthetase/tRNA-Paares auf der Grundlage der tRNA^{Lys}-Sequenzen von Archaea. Dieses Paar erwies sich als wirksam bei der Frameshift-Suppression des Quadruplettcodons AGGA.^[266] Außerdem war es mit einem Amber-orthogonalen System kompatibel, sodass der simultane Einbau von Homoglutamin und O-Methyltyrosin an definierten Positionen in Myoglobin gelang. Die neuesten Übersichten von Link et al.,^[267] Hahn et al.,^[268] sowie Anthony-Cahill und Maglierly^[269], bieten einen ausgewogenen Überblick über das gesamte Gebiet, spezialisierte Übersichten beschäftigen sich eingehender mit der stellungsspezifischen Markierung durch chemoenzymatisch acylierte

tRNAs^[270,271] und die posttranskriptionale Chemie der entstehenden Proteine.^[272]

Nichtkanonische DNA-Basenpaare: Den Ansatz von Benner und Mitarbeitern (1989), mithilfe komplementärer Nucleotide ein neue Watson-Crick-Basenpaare zu erzeugen, machten sich Yokoyama und Mitarbeiter kürzlich zunutze.^[273] Sie zeigten, dass auch DNA mit unüblichen Basenpaaren in RNA transkribiert wird. Der schnelle Fortschritt bei Design und Konstruktion nichtkanonischer Basenpaare durch die Gruppen um Benner, Eaton, Kool, Hirao, Rombesberg, Yokoyama und Schultz wurde kürzlich von Bergstrom zusammengefasst.^[274]

Neben experimentellen Ergebnissen und kritischen Beobachtungen präsentiert dieser Aufsatz einige Themen und Erkenntnisse, die mich schon lange beschäftigt haben. Neue Ideen, Konzepte und innovative Arbeiten gedeihen dort am besten, wo ihnen die Freiheit zur Entfaltung geboten wird, dort, wo Gruppenleiter ihren Kollegen ermöglichen, ab und an die Grenzen ihrer Projekte zu überschreiten. In den vergangenen elf Jahren durfte ich in einem solchen Umfeld forschen. Daher möchte ich meinen Mentoren Robert Huber und Luis Moroder meine Dankbarkeit und tiefste Anerkennung ausdrücken, die mir die Infrastruktur ihrer Laboratorien und die Unterstützung durch ihre Belegschaft zur Verfügung stellten, mich in meiner Arbeit immer wieder ermutigten und mir allem voran Freiheiten einräumten. Ich danke auch Waltraud Wenger, Tatjana Krywun und Petra Birle für ihre hervorragende technische Unterstützung, Freundlichkeit und die angenehme kreative Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, besonders meiner Frau Monika für ihre Liebe und ihr Verständnis für meinen „wissenschaftlichen“ Lebensstil.

Eingegangen am 29. Dezember 2003,
veränderte Fassung am 5. April 2004
Übersetzt von Dr. Thomas Fritzsch, Heidelberg

- [15] C. Minks, S. Alefelder, L. Moroder, R. Huber, N. Budisa, *Tetrahedron* **2000**, 56, 9431.
- [16] K. L. Kiick, D. A. Tirrell, *Tetrahedron* **2000**, 56, 9487.
- [17] J. B. A. Ross, A. G. Szabo, C. W. V. Hogue, *Fluoresc. Spectrosc.* **1997**, 278, 151.
- [18] C. Tanford, J. Reynolds, *Nature's Robots: A History of Proteins*, Oxford University Press, New York, **2001**.
- [19] D. N. Wheatley, M. S. Inglis, P. C. Malone, *Curr. Top. Cell. Regul.* **1986**, 28, 107.
- [20] D. M. Kipnis, E. Helmreich, E. Reiss, *Biochim. Biophys. Acta* **1961**, 51, 519.
- [21] K. L. Kirk, J. Y. Nie, *Biomed. Front. Fluorine Chem.* **1996**, 639, 312.
- [22] P. Schuster, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, 97, 7678.
- [23] I. Prigogine, *Cell Biophys.* **1986**, 9, 217.
- [24] A. L. Weber, S. L. Miller, *J. Mol. Evol.* **1981**, 17, 273.
- [25] S. L. Miller, *Science* **1953**, 117, 528.
- [26] D. H. Ardell, G. Sella, *J. Mol. Evol.* **2001**, 53, 269.
- [27] N. Budisa, L. Moroder, R. Huber, *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, 55, 1626.
- [28] P. Forterre, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1997**, 7, 764.
- [29] C. Woese, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95, 6854.
- [30] M. B. Hoagland, P. C. Zamecnik, *Fed. Proc.* **1957**, 16, 197.
- [31] F. H. C. Crick, *Science* **1963**, 139, 461.
- [32] M. Ibba, H. D. Becker, C. Stathopoulos, D. L. Tumbula, D. Soll, *Trends Biochem. Sci.* **2000**, 25, 311.
- [33] R. W. Holley, J. Apgar, G. A. Everett, J. T. Madison, S. H. Merrill, J. R. Penswick, A. Zamir, *Fed. Proc.* **1965**, 24, 216.
- [34] S. H. Kim, F. L. Suddath, G. J. Quigley, A. McPherson, J. L. Sussman, A. H. J. Wang, N. C. Seeman, A. Rich, *Science* **1974**, 185, 435.
- [35] C. Stathopoulos, T. Li, R. Longman, U. C. Vothknecht, H. D. Becker, M. Ibba, D. Soll, *Science* **2000**, 287, 479.
- [36] A. R. Fersht, *Proc. R. Soc. London Ser. B* **1981**, 212, 351.
- [37] G. D. Gay, H. W. Duckworth, A. R. Fersht, *FEBS Lett.* **1993**, 318, 167.
- [38] M. Ibba, D. Soll, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, 69, 617.
- [39] L. H. Schulman, J. Abelson, *Science* **1988**, 240, 1591.
- [40] W. H. McClain, *FASEB J.* **1993**, 7, 72.
- [41] Y. Tang, D. A. Tirrell, *Biochemistry* **2002**, 41, 10635.
- [42] M. Ibba, P. Kast, H. Hennecke, *Biochemistry* **1994**, 33, 7107.
- [43] S. W. Santoro, L. Wang, B. Herberich, D. S. King, P. G. Schultz, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 1044.
- [44] C. Darwin, *On the Origin of Species*, John Murray, London, **1859**.
- [45] F. J. Ayala, *Sci. Am.* **1978**, 239, 56.
- [46] F. C. Neidhardt, *Escherichia coli & Salmonella typhimurium: Cellular & Molecular Biology*, American Society for Microbiology, Washington, DC, **1987**.
- [47] S. Schlesinger, *J. Biol. Chem.* **1968**, 243, 3877.
- [48] S. Schlesinger, M. J. Schlesinger, *J. Biol. Chem.* **1967**, 242, 3369.
- [49] C. B. Anfinsen, L. G. Corley, *J. Biol. Chem.* **1969**, 244, 5149.
- [50] G. Hortin, I. Boime, *Methods Enzymol.* **1983**, 96, 777.
- [51] M. J. Wilson, D. L. Hatfield, *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, 781, 205.
- [52] M. H. Richmond, *Bacteriol. Rev.* **1962**, 26, 398.
- [53] M. Levine, H. Tarver, *J. Biol. Chem.* **1951**, 192, 835.
- [54] M. H. Richmond, *Biochem. J.* **1959**, 73, 261.
- [55] P. Fildes, *Br. J. Exp. Pathol.* **1945**, 26, 416.
- [56] G. N. Cohen, R. Munier, *Biochim. Biophys. Acta* **1959**, 31, 347.
- [57] R. Munier, G. N. Cohen, *Biochim. Biophys. Acta* **1959**, 31, 378.
- [58] K. L. Kirk, *Biochemistry of Halogenated Organic Compounds*, Plenum, New York, **1991**.
- [59] M. B. Hoagland, *The Relationship of Nucleic Acid and Protein Synthesis as Revealed by Cell-free Systems*, Academic Press, New York, **1960**.

- [60] J. H. Matthaei, M. W. Nirenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1961**, *47*, 1580.
- [61] G. L. Igloi, F. Von der Haar, F. Cramer, *Biochemistry* **1977**, *16*, 1696.
- [62] W. A. Hendrickson, *Science* **1991**, *254*, 51.
- [63] W. A. Hendrickson, C. M. Ogata, *Macromol. Crystallogr. Part B* **1997**, *276*, 494.
- [64] W. A. Hendrickson, *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25*, 637.
- [65] J. T. F. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1983**, *80*, 6303.
- [66] P. M. Bronskill, J. T. F. Wong, *Biochem. J.* **1988**, *249*, 305.
- [67] V. Doring, H. D. Mootz, L. A. Nangle, T. L. Hendrickson, V. de Crecy-Lagard, P. Schimmel, P. Marliere, *Science* **2001**, *292*, 501.
- [68] B. Lemeignan, P. Sonigo, P. Marliere, *J. Mol. Biol.* **1993**, *231*, 161.
- [69] V. Doring, P. Marliere, *Genetics* **1998**, *150*, 543.
- [70] N. Budisa, W. Karnbrock, S. Steinbacher, A. Humm, L. Prade, T. Neufeld, L. Moroder, R. Huber, *J. Mol. Biol.* **1997**, *270*, 616.
- [71] A. M. Gilles, P. Marliere, T. Rose, R. Sarfati, R. Longin, A. Meier, S. Fermandjian, M. Monnot, G. N. Cohen, O. Barzu, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 8204.
- [72] G. Bogosian, B. N. Violand, E. J. Dorwardking, W. E. Workman, P. E. Jung, J. F. Kane, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 531.
- [73] B. D. Sykes, H. Weingart, M. J. Schlesinger, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1974**, *71*, 469.
- [74] S. N. Cohen, A. C. Y. Chang, H. W. Boyer, R. B. Helling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1973**, *70*, 3240.
- [75] M. H. Seifert, D. Ksiazek, M. K. Azim, P. Smialowski, N. Budisa, T. A. Holak, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7932.
- [76] J. H. Bae, S. Alefelder, J. T. Kaiser, R. Friedrich, L. Moroder, R. Huber, N. Budisa, *J. Mol. Biol.* **2001**, *309*, 925.
- [77] N. Budisa, S. Alefelder, J. H. Bae, R. Golbik, C. Minks, R. Huber, L. Moroder, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1281.
- [78] K. L. Kiick, R. Weberskirch, D. A. Tirrell, *FEBS Lett.* **2001**, *505*, 465.
- [79] Y. Tang, G. Ghirlanda, W. A. Petka, T. Nakajima, W. F. DeGrado, D. A. Tirrell, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1494; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1494.
- [80] Y. Tang, D. A. Tirrell, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **1999**, *218*, 416.
- [81] Y. Tang, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11089.
- [82] P. Kast, H. Hennecke, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 99.
- [83] K. Kirshenbaum, I. S. Carrico, D. A. Tirrell, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 235.
- [84] D. Datta, P. Wang, I. S. Carrico, S. L. Mayo, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5652.
- [85] F. Hamano-Takaku, T. Iwama, S. Saito-Yano, K. Takaku, Y. Monden, M. Kitabatake, D. Soll, S. Nishimura, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 40324.
- [86] D. Kiga, K. Sakamoto, K. Kodama, T. Kigawa, T. Matsuda, T. Yabuki, M. Shirouzu, Y. Harada, H. Nakayama, K. Takio, Y. Hasegawa, Y. Endo, I. Hirao, S. Yokoyama, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 9715.
- [87] L. Wang, P. G. Schultz, *Chem. Commun.* **2002**, 1.
- [88] L. Wang, A. Brock, B. Herberich, P. G. Schultz, *Science* **2001**, *292*, 498.
- [89] L. Wang, J. M. Xie, A. A. Deniz, P. G. Schultz, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 174.
- [90] Z. W. Zhang, L. Wang, A. Brock, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2840; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2840.
- [91] L. Wang, Z. W. Zhang, A. Brock, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 56.
- [92] J. W. Chin, S. W. Santoro, A. B. Martin, D. S. King, L. Wang, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9026.
- [93] L. Wang, A. Brock, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1836.
- [94] J. W. Chin, A. B. Martin, D. S. King, L. Wang, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 11020.
- [95] R. S. Mursinna, S. A. Martinis, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7286.
- [96] P. Wang, N. Vaidehi, D. A. Tirrell, W. A. Goddard III, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14442.
- [97] D. Q. Zhang, N. Vaidehi, W. A. Goddard III, J. F. Danzer, D. Debe, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 6579.
- [98] A. B. Pardee, V. G. Shore, L. S. Prestidge, *Biochim. Biophys. Acta* **1956**, *21*, 406.
- [99] G. Brawerman, M. Ycas, *Arch. Biochem. Biophys.* **1957**, *68*, 112.
- [100] E. A. Pratt, C. Ho, *Fed. Proc.* **1974**, *33*, 1463.
- [101] D. F. Senear, R. A. Mendelson, D. B. Stone, L. A. Luck, E. Rusinova, J. B. A. Ross, *Anal. Biochem.* **2002**, *300*, 77.
- [102] S. M. Twine, A. G. Szabo, *Biophotonics Part A* **2003**, *360*, 104.
- [103] J. O. Boles, J. Henderson, D. Hatch, L. A. Silks, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *298*, 257.
- [104] J. H. Bae, M. Rubini, G. Jung, G. Wiegand, M. H. J. Seifert, M. K. Azim, J. S. Kim, A. Zumbusch, T. A. Holak, L. Moroder, R. Huber, N. Budisa, *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 1071.
- [105] N. Budisa, M. Rubini, J. H. Bae, E. Weyher, W. Wenger, R. Golbik, R. Huber, L. Moroder, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4238; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4066.
- [106] S. Barlati, O. Ciferri, *J. Bacteriol.* **1970**, *101*, 166.
- [107] N. Budisa, P. P. Pal, S. Alefelder, P. Birle, T. Krywcun, M. Rubini, W. Wenger, J. H. Bae, T. Steiner, *Biol. Chem.* **2004**, *385*, 191.
- [108] G. Loidl, H. J. Musiol, N. Budisa, R. Huber, S. Poirat, D. Fourmy, L. Moroder, *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*, 139.
- [109] Z. J. Xu, M. L. Love, L. Y. Y. Ma, M. Blum, P. M. Bronskill, J. Bernstein, A. A. Grey, T. Hofmann, N. Camerman, J. T. F. Wong, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 4304.
- [110] R. L. Munier, G. Sarrazin, *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.* **1963**, *256*, 3376.
- [111] P. Lu, M. Jarema, K. Mosser, *Fed. Proc.* **1976**, *35*, 1456.
- [112] M. Ring, I. M. Armitage, R. E. Huber, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, *131*, 675.
- [113] M. Ring, R. E. Huber, *Biochem. Cell Biol.* **1993**, *71*, 127.
- [114] B. Brooks, R. S. Phillips, W. F. Benisek, *Biochemistry* **1998**, *37*, 9738.
- [115] R. Calendar, P. Berg, *Biochemistry* **1966**, *5*, 1690.
- [116] C. Minks, Dissertation, Technische Universität München, **1999**.
- [117] Z. W. Zhang, B. A. C. Smith, L. Wang, A. Brock, C. Cho, P. G. Schultz, *Biochemistry* **2003**, *42*, 6735.
- [118] A. Yoshida, *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, *41*, 98.
- [119] E. Yoshikawa, M. J. Fournier, T. L. Mason, D. A. Tirrell, *Macromolecules* **1994**, *27*, 5471.
- [120] C. Minks, R. Huber, L. Moroder, N. Budisa, *Anal. Biochem.* **2000**, *284*, 29.
- [121] J. Janecek, H. V. Rickenberg, *Biochim. Biophys. Acta* **1964**, *81*, 108.
- [122] S. Kothakota, T. L. Mason, D. A. Tirrell, M. J. Fournier, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 536.
- [123] H. Koide, S. Yokoyama, Y. Katayama, Y. Muto, T. Kigawa, T. Kohno, H. Takusari, M. Oishi, S. Takahashi, K. Tsukumo, T. Sasaki, T. Miyake, T. Fuwa, G. Kawai, T. Miyazawa, *Biochemistry* **1994**, *33*, 7470.
- [124] N. Sharma, R. Furter, P. Kast, D. A. Tirrell, *FEBS Lett.* **2000**, *467*, 37.
- [125] S. H. W. Beiboer, B. van den Berg, N. Dekker, R. C. Cox, H. M. Verheij, *Protein Eng.* **1996**, *9*, 345.
- [126] P. Soumillion, J. Fastrez, *Protein Eng.* **1998**, *11*, 213.
- [127] D. C. Klein, J. L. Weller, K. L. Kirk, R. W. Hartley, *Mol. Pharmacol.* **1977**, *13*, 1105.
- [128] B. M. Dunn, C. Dibello, K. L. Kirk, L. A. Cohen, I. M. Chaiken, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 6295.

- [129] Y. Ikeda, S. Kawahara, M. Taki, A. Kuno, T. Hasegawa, K. Taira, *Protein Eng.* **2003**, *16*, 699.
- [130] J. Feeney, J. E. McCormick, C. J. Bauer, B. Birdsall, C. M. Moody, B. A. Starkmann, D. W. Young, P. Francis, R. H. Havlin, W. D. Arnold, E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8700.
- [131] I. Apostol, J. Levine, J. Lippincott, J. Leach, E. Hess, C. B. Glascock, M. J. Weickert, R. Blackmore, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 28980.
- [132] T. H. Porter, S. C. Smith, W. Shive, *Arch. Biochem. Biophys.* **1977**, *179*, 266.
- [133] P. Wang, Y. Tang, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6900.
- [134] N. Budisa, R. Huber, R. Golbik, C. Minks, E. Weyher, L. Moroder, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *253*, 1.
- [135] J. O. Boles, K. Lewinski, M. Kunkle, J. D. Odom, R. B. Dunlap, L. Lebioda, M. Hatada, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 283.
- [136] H. Duewel, E. Daub, V. Robinson, J. F. Honek, *Biochemistry* **1997**, *36*, 3404.
- [137] H. Jakubowski, E. Goldman, *Microbiol. Rev.* **1992**, *56*, 412.
- [138] A. R. Fersht, C. Dingwall, *Biochemistry* **1979**, *18*, 1250.
- [139] H. Jakubowski, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21813.
- [140] J. C. M. van Hest, K. L. Kiick, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1282.
- [141] K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 19.
- [142] U. Reimer, G. Scherer, M. Drewello, S. Kruber, M. Schutkowski, G. Fischer, *J. Mol. Biol.* **1998**, *279*, 449.
- [143] C. Renner, S. Alefelder, J. H. Bae, N. Budisa, R. Huber, L. Moroder, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 923; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 923.
- [144] T. J. Deming, M. J. Fournier, T. L. Mason, D. A. Tirrell, *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.* **1997**, *34*, 2143.
- [145] J. F. Guichou, L. Patiny, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4389.
- [146] T. J. Deming, M. J. Fournier, T. L. Mason, D. A. Tirrell, *Macromolecules* **1996**, *29*, 1442.
- [147] B. C. Jester, J. D. Levengood, H. Roy, M. Ibba, K. M. Devine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 14351.
- [148] G. Rosenthal, *Plant Nonprotein Amino and Imino acids. Biological, Biochemical, and Toxicological Properties*, Academic Press, New York, **1982**.
- [149] R. A. Mehl, J. C. Anderson, S. W. Santoro, L. Wang, A. B. Martin, D. S. King, D. M. Horn, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 935.
- [150] M. Ibba, D. Soll, *Science* **1999**, *286*, 1893.
- [151] T. M. Sonneborn, *Degeneracy of the Genetic Code: Extent, Nature, and Genetic Implications*, Academic Press, New York, **1965**.
- [152] S. J. Freeland, R. D. Knight, L. F. Landweber, L. D. Hurst, *Mol. Biol. Evol.* **2000**, *17*, 511.
- [153] S. J. Freeland, T. Wu, N. Keulmann, *Origins Life Evol. Biosphere* **2003**, *33*, 457.
- [154] C. R. Woese, D. H. Dugre, S. A. Dugre, M. Kondo, W. C. SAXINGER, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1966**, *31*, 723.
- [155] D. Haig, L. D. Hurst, *J. Mol. Evol.* **1991**, *33*, 412.
- [156] A. Radzicka, R. Wolfenden, *Biochemistry* **1988**, *27*, 1664.
- [157] G. D. Rose, R. Wolfenden, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1993**, *22*, 381.
- [158] J. D. Watson, N. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steitz, A. M. Weiner, *Molecular Biology of the Gene*, Benjamin/Cummings Publishing, Amsterdam, **1988**.
- [159] S. Osawa, T. H. Jukes, K. Watanabe, A. Muto, *Microbiol. Rev.* **1992**, *56*, 229.
- [160] A. Bock, K. Forchhammer, J. Heider, W. Leinfelder, G. Sawers, B. Veprek, F. Zinoni, *Mol. Microbiol.* **1991**, *5*, 515.
- [161] M. F. Tuite, M. A. S. Santos, *Biochimie* **1996**, *78*, 993.
- [162] T. Suzuki, T. Ueda, K. Watanabe, *EMBO J.* **1997**, *16*, 1122.
- [163] T. Hohsaka, M. Sisido, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 809.
- [164] G. Eggertsson, D. Soll, *Microbiol. Rev.* **1988**, *52*, 354.
- [165] J. R. Roth, *Cell* **1981**, *24*, 601.
- [166] T. G. Heckler, L. H. Chang, Y. Zama, T. Naka, M. S. Chorghade, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1984**, *23*, 1468.
- [167] V. W. Cornish, D. Mendel, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 677; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 621.
- [168] T. Arslan, S. V. Mamaev, N. V. Mamaeva, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10877.
- [169] D. Mendel, V. W. Cornish, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, *24*, 435.
- [170] L. E. Steward, A. R. Chamberlin in *Protein Synthesis – Methods and Protocols*, Vol. 77 (Hrsg.: R. Martin), Humana, Totowa, New Jersey, **1998**, S. 325.
- [171] J. D. Bain, C. G. Glabe, T. A. Dix, A. R. Chamberlin, E. S. Diala, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8013.
- [172] Y. Kwok, J. T. F. Wong, *Can. J. Biochem.* **1980**, *58*, 213.
- [173] A. K. Kowal, J. S. Oliver, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4685.
- [174] J. Ellman, D. Mendel, S. Anthony-Cahill, C. J. Noren, P. G. Schultz, *Methods Enzymol.* **1991**, *202*, 301.
- [175] T. Hohsaka, Y. Ashizuka, H. Murakami, M. Sisido, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9778.
- [176] A. Frankel, R. W. Roberts, *RNA* **2003**, *9*, 780.
- [177] T. Kanda, K. Takai, T. Hohsaka, M. Sisido, H. Takaku, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *270*, 1136.
- [178] I. Kwon, K. Kirshenbaum, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7512.
- [179] M. W. Nowak, J. P. Gallivan, S. K. Silverman, C. G. Labarca, D. A. Dougherty, H. A. Lester, *Methods Enzymol.* **1998**, *293*, 504.
- [180] S. L. Monahan, H. A. Lester, D. A. Dougherty, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 573.
- [181] L. E. Steward, C. S. Collins, M. A. Gilmore, J. E. Carlson, J. B. A. Ross, A. R. Chamberlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6.
- [182] B. Moore, B. C. Persson, C. C. Nelson, R. F. Gesteland, J. F. Atkins, *J. Mol. Biol.* **2000**, *298*, 195.
- [183] T. Hohsaka, Y. Ashizuka, H. Taira, H. Murakami, M. Sisido, *Biochemistry* **2001**, *40*, 11060.
- [184] T. Hohsaka, D. Kajihara, Y. Ashizuka, H. Murakami, M. Sisido, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 34.
- [185] T. Hohsaka, K. Sato, M. Sisido, K. Takai, S. Yokoyama, *FEBS Lett.* **1993**, *335*, 47.
- [186] T. Hohsaka, Y. Ashizuka, H. Sasaki, H. Murakami, M. Sisido, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 12194.
- [187] T. J. Magliery, J. C. Anderson, P. G. Schultz, *J. Mol. Biol.* **2001**, *307*, 755.
- [188] J. C. Anderson, T. J. Magliery, P. G. Schultz, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 237.
- [189] T. Hohsaka, Y. Ashizuka, H. Murakami, M. Sisido, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 3646.
- [190] D. R. Liu, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 4780.
- [191] D. R. Liu, T. J. Magliery, P. G. Schultz, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 685.
- [192] D. R. Liu, T. J. Magliery, M. Pasternak, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 10092.
- [193] P. Schimmel, D. Soll, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 10007.
- [194] A. K. Kowal, C. Kohrer, U. L. RajBhandary, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 2268.
- [195] L. Wang, P. G. Schultz, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 883.
- [196] L. Wang, T. J. Magliery, D. R. Liu, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5010.
- [197] M. Pastrnak, T. J. Magliery, P. G. Schultz, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2277.
- [198] C. Kohrer, L. Xie, S. Kellerer, U. Varshney, U. L. RajBhandary, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 14310.

- [199] K. Koide, J. M. Finkelstein, Z. Ball, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 398.
- [200] R. Furter, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 419.
- [201] T. Hohsaka, K. Sato, M. Sisido, K. Takai, S. Yokoyama, *FEBS Lett.* **1994**, *344*, 171.
- [202] Y. Shimizu, A. Inoue, Y. Tomari, T. Suzuki, T. Yokogawa, K. Nishikawa, T. Ueda, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 751.
- [203] 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. U.S.A.* **2003**, *100*, 6353.
- [204] N. Budisa in *Cell Free Protein Expression* (Hrsg.: J. R. Swartz), Springer, Berlin, **2003**, S. 89.
- [205] Y. Q. Wu, A. K. Ogawa, M. Berger, D. L. McMinn, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7621.
- [206] T. Mitsui, A. Kitamura, M. Kimoto, T. To, A. Sato, I. Hirao, S. Yokoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5298.
- [207] I. Hirao, T. Ohtsuki, T. Fujiwara, T. Mitsui, T. Yokogawa, T. Okuni, H. Nakayama, K. Takio, T. Yabuki, T. Kigawa, K. Kodama, K. Nishikawa, S. Yokoyama, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 177.
- [208] K. Tamura, P. Schimmel, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 669.
- [209] Y. Bessho, D. R. W. Hodgson, H. Suga, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 723.
- [210] L. M. Dedkova, N. E. Fahmi, S. Y. Golovine, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6616.
- [211] K. Sakamoto, A. Hayashi, A. Sakamoto, D. Kiga, H. Nakayama, A. Soma, T. Kobayashi, M. Kitabatake, K. Takio, K. Saito, M. Shirouzu, I. Hirao, S. Yokoyama, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4692.
- [212] J. W. Chin, T. A. Cropp, J. C. Anderson, M. Mukherji, Z. W. Zhang, P. G. Schultz, *Science* **2003**, *301*, 964.
- [213] R. F. Service, *Science* **2003**, *299*, 640.
- [214] M. J. Dougherty, S. Kothakota, M. T. Krejchi, G. H. Zhang, T. L. Mason, D. A. Tirrell, M. J. Fournier, *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* **1992**, *62*, 225.
- [215] J. O. Boles, R. J. Cisneros, M. S. Weir, J. D. Odom, J. E. Villafranca, R. B. Dunlap, *Biochemistry* **1991**, *30*, 11073.
- [216] W. Karnbrock, E. Weyher, N. Budisa, R. Huber, L. Moroder, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 913.
- [217] D. Besse, N. Budisa, W. Karnbrock, C. Minks, H. J. Musiol, S. Pegoraro, F. Siedler, E. Weyher, L. Moroder, *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 211.
- [218] N. Budisa, G. Pifat, *Croat. Chem. Acta* **1998**, *71*, 179.
- [219] M. Pieper, M. Betz, N. Budisa, F.-X. Gomis-Rüth, W. Bode, H. Tschesche, *J. Protein Chem.* **1997**, *16*, 637.
- [220] C. Minks, R. Huber, L. Moroder, N. Budisa, *Biochemistry* **1999**, *38*, 10649.
- [221] R. M. W. Hoetelmans, *Antiviral Ther.* **1999**, *4*, 29.
- [222] J. D. Bain, C. Switzer, A. R. Chamberlin, S. A. Benner, *Nature* **1992**, *356*, 537.
- [223] M. Zimmer, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 759.
- [224] O. Shimomura, *FEBS Lett.* **1979**, *104*, 220.
- [225] G. J. Palm, A. Wlodawer, *Green Fluoresc. Protein* **1999**, *302*, 378.
- [226] B. K. Koe, A. Weissman, *Biochem. Pharmacol.* **1966**, *15*, 2134.
- [227] B. K. Koe, A. Weissman, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1967**, *157*, 565.
- [228] A. Weissman, B. K. Koe, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1967**, *155*, 135.
- [229] F. L. M. Pattison, *Nature* **1953**, *172*, 1139.
- [230] C. S. Evans, E. A. Bell, *Trends Neurosci.* **1980**, *3*, 70.
- [231] B. K. Koe, A. Weissman, *Fed. Proc.* **1966**, *25*, 452.
- [232] P. Stark, R. W. Fuller, *Fed. Proc.* **1971**, *30*, A504.
- [233] L. Stryer, *Biochemistry*, New York, **2001**.
- [234] D. A. Dougherty, *J. Phys. Org. Chem.* **1998**, *11*, 334.
- [235] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1906**, *39*, 530.
- [236] F. Hofmeister, *Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exp. Pharmakol.* **1902**, *1*, 759.
- [237] F. Sanger, E. O. P. Thompson, *Biochem. J.* **1952**, *52*, R3.
- [238] A. D. Hershey, M. Chase, *J. Gen. Physiol.* **1952**, *36*, 39.
- [239] O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1944**, *79*, 137.
- [240] G. W. Beadle, *J. Allergy* **1957**, *28*, 392.
- [241] G. W. Beadle, *Harvey Lect.* **1945**, *40*, 179.
- [242] F. Jacob, J. Monod, *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, 318.
- [243] M. Yarus, *RNA* **2000**, *6*, 475.
- [244] J. T. F. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1975**, *72*, 1909.
- [245] R. Dawkins, *The Selfish Gene*, Oxford University Press, **1976**.
- [246] R. Wolfenden, A. Radzicka, *Trends Biochem. Sci.* **1986**, *11*, 69.
- [247] J. L. Fauchere, V. Pliska, *Eur. J. Med. Chem.* **1983**, *18*, 369.
- [248] G. Trinquier, Y. H. Sanejouand, *Prot. Eng.* **1998**, *24*, 153.
- [249] W. F. DeGrado, C. M. Summa, V. Pavone, F. Nastri, A. Lombardi, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 779.
- [250] D. N. Wilson, K. H. Nierhaus, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3464; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3464.
- [251] T. Kobayashi, O. Nureki, R. Ishitani, A. Yaremcuk, M. Tukalo, S. Cusack, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 425.
- [252] E. O. Wilson, *On Human Nature*, Harvard University Press, Cambridge, MA, **1978**.
- [253] J. M. Bacher, A. D. Ellington, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 5414.
- [254] J. M. Bacher, J. J. Bull, A. D. Ellington, *BMC Evol. Biol.* **2003**, *3*.
- [255] P. Hess, N. Budisa, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [256] W. Y. Kim, A. George, M. Evans, V. P. Conticello, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 928.
- [257] T. Bentin, R. Hamzavi, J. Salomonsson, H. Roy, M. Ibba, P. E. Nielsen, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 19839.
- [258] P. Wang, A. Fichera, K. Kumar, D. A. Tirrell, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3750; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3664.
- [259] H. Putzer, M. Grunberg-Manago, M. Springer in *tRNA: Structure, Biosynthesis and Function* (Hrsg.: D. Söll, U. RajBhandary), American Society for Microbiology, Washington, DC, **1995**, S. 293.
- [260] T. Meinel, Y. Mechulam, S. Blanquet in *tRNA: Structure, Biosynthesis and Function* (Hrsg.: D. Söll, U. RajBhandary), American Society for Microbiology, Washington DC, **1995**, S. 251.
- [261] D. W. Schultz, M. Yarus, *J. Mol. Evol.* **1996**, *42*, 597.
- [262] M. Yarus, D. W. Schultz, *J. Mol. Evol.* **1997**, *45*, 3.
- [263] J. M. Bacher, R. A. Hughes, J. T. F. Wong, A. D. Ellington, *Trends Ecol. Evol.* **2004**, *19*, 69.
- [264] A. R. O. Cavalcanti, L. F. Landweber, *Curr. Biol.* **2003**, *13*, R884.
- [265] Z. W. Zhang, L. Alfanta, F. Tian, B. Bursulaya, S. Uryu, D. S. King, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 8882.
- [266] J. C. Anderson, N. Wu, S. W. Santoro, V. Lakshman, D. S. King, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 7566.
- [267] A. J. Link, M. L. Mock, D. A. Tirrell, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 603.
- [268] U. Hahn, G. J. Palm, W. Hinrichs, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1210; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1190.
- [269] J. S. Anthony-Cahill, T. J. Magliery, *Curr. Pharm. Res.* **2002**, *3*, 299.
- [270] J. H. van Maarseveen, J. W. Back, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6106; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5926.
- [271] T. Hohsaka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2004**, *77*, 1041.
- [272] A. Stromgaard, A. A. Jensen, K. Stromgaard, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 909.
- [273] M. Kimoto, M. Endo, T. Mitsui, T. Okuni, I. Hirao, S. Yokoyama, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 47.
- [274] D. E. Bergstrom, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 18.