

## Biochemie 2012

*Synthetische Todesküsse: Chemischer Zugang zu ubiquitinierten Proteinen – Erweiterung des genetischen Codes – Massenspektrometrie von modifizierten Nukleinsäuren*

### Ubiquitinierte Proteine

◆ Der hohe Stellenwert der Proteinregulierung durch Ubiquitin in der eukaryotischen Biologie ist unangefochten. Ubiquitinierung ist längst nicht mehr Gegenstand allein der biologischen Forschung, sondern hat Einzug in die chemische Proteinsynthese gehalten, wie mehrere Arbeiten im letzten Jahr zeigten.

#### Nichts ist für die Ewigkeit

◆ Unsere Zellen produzieren unentwegt Proteine, doch wie können die Zellen solche Proteine erkennen, die abgebaut werden sollen? Nahezu alle Proteine, die das Proteasom abbaut, werden zuvor gebrandmarkt. Diese Markierung erfolgt in Eukaryoten durch Konjugation an Ubiquitin (Ub), einem hochkonservierten Protein aus 76 Aminosäuren und einer Molekülmasse von 8,5 kDa. Fundamentale Errungenschaften zum Ub-induzierten Proteinabbau wurden mit dem Chemienobelpreis im Jahr 2004 an Avram Hershko, Aaron Ciechanover und Irwine Rose gewürdigt.<sup>1–3)</sup>

Die Ubiquitinierung ist eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen (PTM), die erhebliche Auswirkungen auf Regulierung und Stabilität von Proteinen, Zellzyklus, Transkription, DNS-Reparatur und Proliferation hat. Die drei Enzyme E1 (aktivierendes Enzym), E2 (konjugierendes Enzym) und E3 (Ligase) spielen bei dem Prozess der Ubiquitinierung eine herausragende Rolle (Abbildung 1), wobei

30 bis 40 E2- und mehrere hundert E3-, jedoch nur zwei E1-Varianten diese enzymatische Maschinerie ausmachen. Gemeinsam vermögen diese Enzyme, C-terminales Glycin von Ub in Abhängigkeit von ATP mit einer  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe der Lysinseitenkette eines Substrates durch eine Isopeptidbindung zu verknüpfen. Ein Zielprotein lässt sich einfach (mono-Ub) oder mehrfach (multi-mono-Ub) modifizieren. Darüber hinaus besitzt Ub selbst sieben Lysine (an den Positionen K6, K11, K27, K29, K33, K48 und K63) und die Bildung von linearen und verzweigten Ub-Ketten unterschiedlicher Länge und Konnektivität ist möglich (poly-Ub). Daraus ergibt sich eine ungeheure Komplexität zellulärer Signale, deren Fehlregulierung mit vielen Krankheiten wie Krebs, Herz- und neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht wird.<sup>4–6)</sup>

Die Interpretation der durch Ubiquitinierung hervorgerufenen Signale und deren Übersetzung in zelluläre Funktionen erfolgt durch Ub-Bindungsdomänen (UBD). Diese reagieren empfindlich auf unterschiedliche Substrat-Ub- und Ub-Ub-Verknüpfungen. Isopeptidasen oder Deubiquitinasen (DUBs) garantieren letztendlich die Reversibilität dieser PTM. UBDs und DUBs sind somit attraktive pharmazeutische Targets.<sup>7)</sup> Die Erforschung spezifisch ubiquitiniertes Proteine ist jedoch nicht trivial, da insbesondere die Identifikation, Isolati-

on und Charakterisierung von E2/E3-Enzymen und deren effizienter Gebrauch in vitro äußerst schwierig sind. So sind zurzeit drei E2-Enzyme bekannt, deren Bindungsspezifität und Aktivität mit freiem Ub ausreichen, um ubiquitinierte Verbindungen zu synthetisieren. Trotz signifikanter Erkenntnisse in der enzymatischen Ubiquitinierung – die unter anderem zur Identifikation der K11-spezifischen DUB Cezanne führten<sup>8)</sup> – ist die Synthese von Designer-Ub-Konjugaten und poly-Ub-Ketten unterschiedlicher Längen und Verzweigungen entscheidend, um mechanistische Aspekte der Ubiquitinierung aufzuklären und gerade den atypischen Ub-Ketten (K6, K11, K27, K29, K33 Verknüpfung) biologische Aufgaben zuzuweisen.

#### Was kann die Chemie leisten?

◆ Die Einführung chemischer Modifikationen und ungewöhnlicher Verknüpfungen von Ub und seinen Konjugaten ist durch chemische Synthese oder Semisynthese möglich. Dabei kommen sowohl chemische als auch biochemische Methoden zur Geltung, wobei ein hohes Maß an Kontrolle gewährleistet ist. Die Verknüpfung durch eine Isopeptidbindung und die Größe von Ubiquitin sind jedoch synthetisch schwierig.

In den vergangenen Jahren gab es bei der chemischen Synthese von Ub-Verbindungen enorme Fort-

schritte, wobei zwei sich unterscheidende, letztendlich sich jedoch ergänzende Teilgebiete herausstechen: Zum einen gelang es, native Isopeptidbindungen elegant darzustellen, zum anderen wurden verschiedenartige Isopeptid-Mimetika mit teils neuartigen und nützlichen Eigenschaften generiert. Letztere sollen die Synthese vereinfachen und stabile Analoga für verschiedenartige Studien und Strukturaufklärung liefern.

### Native Ub-Konjugate

◆ Eine häufig verwendete Methode, um Ub-Protein-Konjugate darzustellen, ist die Protein-Semisynthese, wobei die Expressed Protein Ligation (EPL) hervorzuheben ist.<sup>9,10</sup> Dabei handelt es sich um eine chemoselektive Ligation, die synthetische Peptide mit rekombinanten Proteinen verknüpft. So gelang es Tom W. Muir, K120-ubiquitiniertes Histon H2B durch zwei orthogonale Ligationen, photolytische Entschützung und Raney-Nickel-Desulfurisierung herzustellen (Abbildung 2a). Zudem war eine

Korrelation zwischen Ubiquitinierung und verstärkter Methylierung in Position K79 des Histons H3 durch die K79-spezifische Methyltransferase hDot1L nachweisbar.<sup>11</sup> Da für diese Methode jedoch Ligationen und selektive Entschützungen benötigt werden, waren die erzielten Ausbeuten gering.

Nur wenig später gelang die Synthese K6- und K27-verbundener Ub-Dimere durch Erweiterung des genetischen Codes und chemoselektiver Proteinchemie (genetically encoded orthogonal protection and activated ligation, GOPAL).<sup>12</sup> Statt eines genetisch codierten Lysins in Ub wurde an entsprechender Stelle analoges H-Lys(Boc)-OH mutagenetisch eingebaut (Abbildung 2b). Nach orthogonaler Schützung aller freien Amine in Ub steht nach Boc-Entschützung lediglich ein Lysin zur weiteren Modifikation zur Verfügung und kann per Ligation mit einem Ub-Thioester zusammengefügt werden. Anschließend globale Entschützung liefert natives konjugiertes Produkt. Mit ihren K6- und K27-Di-Ub-Konjugaten

zeigten Chin und Komander unter anderem, dass TRABID, eine DUB aus der Familie der Eierstocktumore, eine 40-fach höhere Selektivität gegenüber K29-verbundenen Di-Ub hat im Vergleich zu häufiger auftretendem K63-Di-Ub.

Die Arbeitsgruppen von Ashraf Brik und Hilal A. Lashuel untersuchten die Rolle von  $\alpha$ -Synuclein( $\alpha$ -Syn)-K6-Monoubiquitinierung.<sup>13</sup> Der Schlüsselschritt zur Darstellung von mono-Ub- $\alpha$ -Syn war eine EPL zwischen rekombinant exprimiertem  $\alpha$ -Syn (19–140) mit einer A19C-Mutation und einem synthetischen Peptid-Thioester- $\alpha$ -Syn (1–18), der ein Acm-geschütztes  $\delta$ -Mercaptolysin in Position 6 aufweist (Abbildung 2c). Im Anschluss an die Ligation wurde die Acm-Gruppe entfernt, so dass dann K6-spezifische Ubiquitinierung durch eine Isopeptid-chemische-Ligation (IPL) möglich wurde. Letztlich entstand natives K6-ubiquitiniertes  $\alpha$ -Syn durch Desulfurisierung in guten Ausbeuten. Mit dem so gewonnenen Derivat wurde gezeigt, dass N-terminale Ubi-

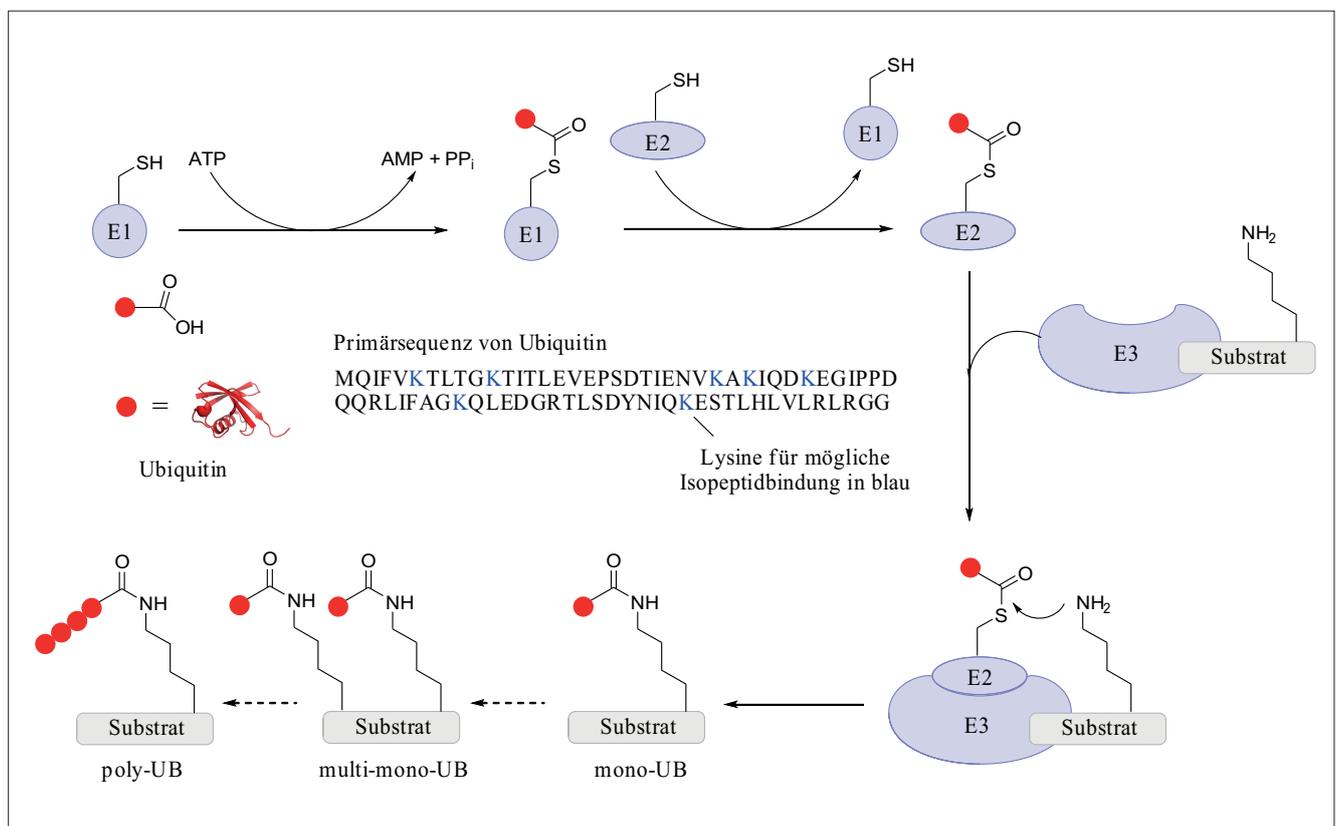


Abb. 1. Ubiquitinierung eines Proteinsubstrats durch die Enzyme E1, E2 und E3.

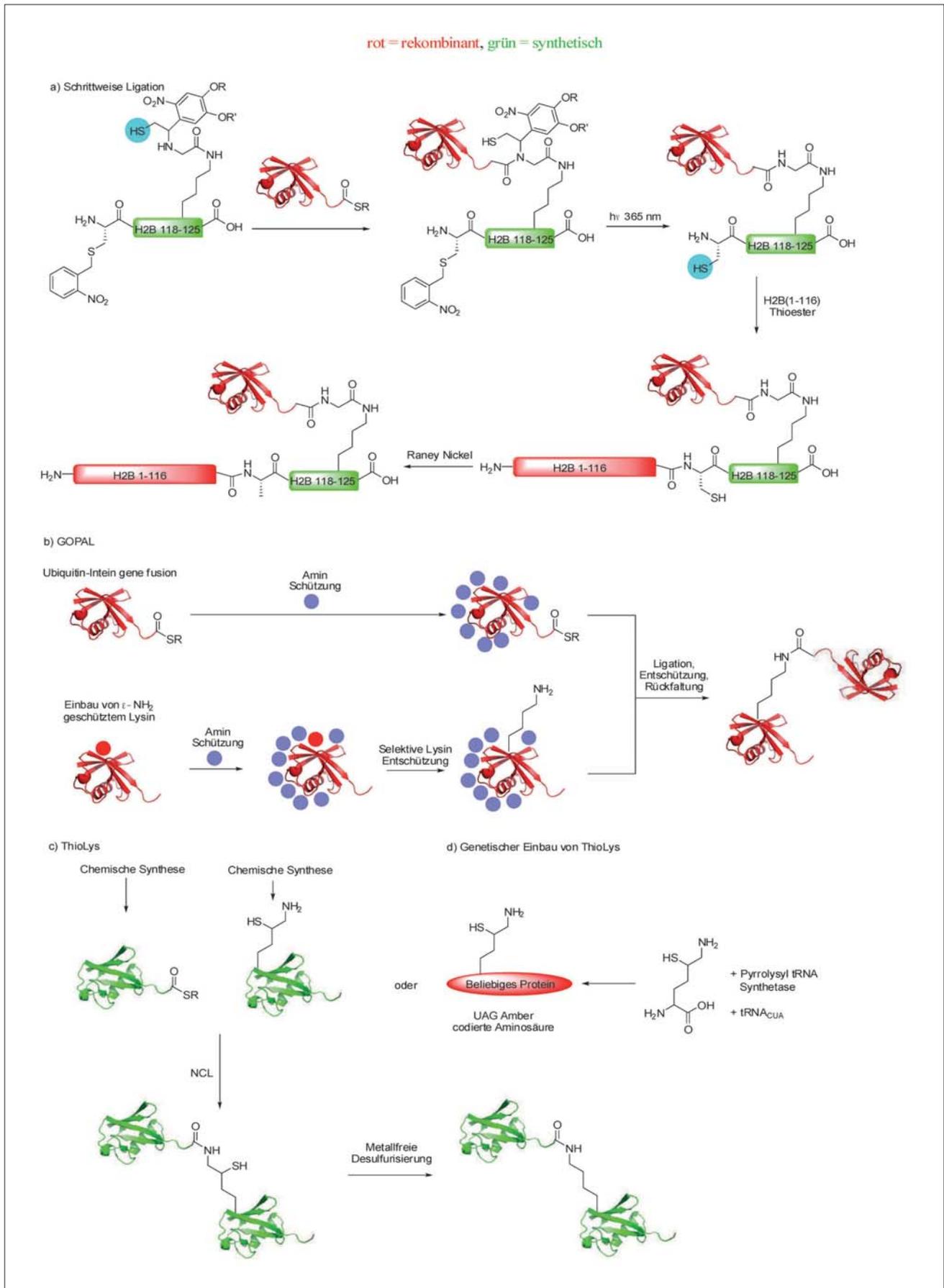


Abb. 2. Synthetische und semisynthetische Methoden zur Darstellung ortsspezifisch ubiquitinerter Proteine. Synthetisches Ubiquitin: grün; rekombinantes Ubiquitin: rot.

quintinierung von  $\alpha$ -Syn seine monomere Form stabilisiert und keinerlei Effekte auf Phosphorylierungen in den Positionen S87 und S129 mit einigen getesteten häufigen Kinasen aufweist.

Jüngst gelang es Brik ebenfalls auf chemischem Weg, Ub-Peptid-Konjugate mit Ub-Ketten verschiedener Länge und Verknüpfung zu synthetisieren.<sup>14</sup> Durch elaborierte Festphasenpeptidsynthese und IPL/Desulfurisierung wurde der Einfluss der Kettenlänge und der Verknüpfung auf die Erkennung durch DUBs studiert.

Der genetische Einbau von  $\delta$ -Mercaptolysin in Proteine kann dazu beitragen, mechanistische und strukturelle Fragen der Protein-Ubiquitinierung zu beantworten (Abbildung 2d).<sup>15</sup> Es ist jedoch festzuhalten, dass NCL- oder IPL-Reaktionen meist stark denaturierende Bedingungen benötigen und somit nur auf rückfaltbare Protein anwendbar sind.

### Isopeptidmimetika

◆ Den Grundstein für die Darstellung unnatürlicher Ub-Isopeptid-Konjugate legte die Entwicklung unnatürlicher Ub-Isopeptid-Konjugate legte die Entwicklung erster Di-Ub-Verbindungen.<sup>16</sup> Dazu wurden zwei Cysteine verknüpft, die selektiv durch einen 1,3-Dichloraceton-Linker verbrückt sind (Abbildung 3a). Studien mit diesen unhydrolysierbaren Verbindungen zeigten selektive Inhibition von DUBs wie UCH-L3 und Isopeptidase T bei der Spaltung von Ub-AMC, einem fluorogenen Substrat für viele DUBs.

Chan und seine Mitarbeiter codierten genetisch den Einbau des Pyrrolysin-Analogons D-Cys- $\epsilon$ -Lys in Calmodulin (CaM) (Abbildung 3b).<sup>17</sup> Dazu nutzten sie die Maschinerie für den Pyrrolysin einbau in Anwesenheit eines UAG-Stop-Codons. So fügten sie zwei exprimierte Produkte durch einen einzigen Ligationsschritt zusammen. Letztendlich unterschied sich das

so gewonnene modifizierte Ub\*-CaM lediglich durch eine Gly76(D)-Cys-Mutation von Wildtyp(WT)-Ub-CaM und ermöglichte Studien der Modulation von Kinasen und Phosphatasen.

Unabhängig voneinander entwickelten Tom Muir und Zhihao Zhuang eine Methode zur Darstellung von Disulfid-verbundenen Protein-(S-S)Ub Konjugaten (Schema 3c).<sup>18, 19</sup> Ein Nachteil solcher Konjugate ist jedoch die Reduktionsempfindlichkeit der Disulfidbrücken, was viele biologische Assays undurchführbar macht. Desweiteren ist diese Methode nur spezifisch auf solche Proteine mit einem einzigen Cystein anwendbar.

Eine robustere Variante der unnatürlichen Ub-Isopeptid-Darstellung, die auch denaturierenden Bedingungen standhält, war die chemoselektive Kondensation zwischen einer Aminoxy-Gruppe und einem Aldehyd zu einem Oxim (Abbildung 3d).<sup>20</sup> Mit einem Spa-

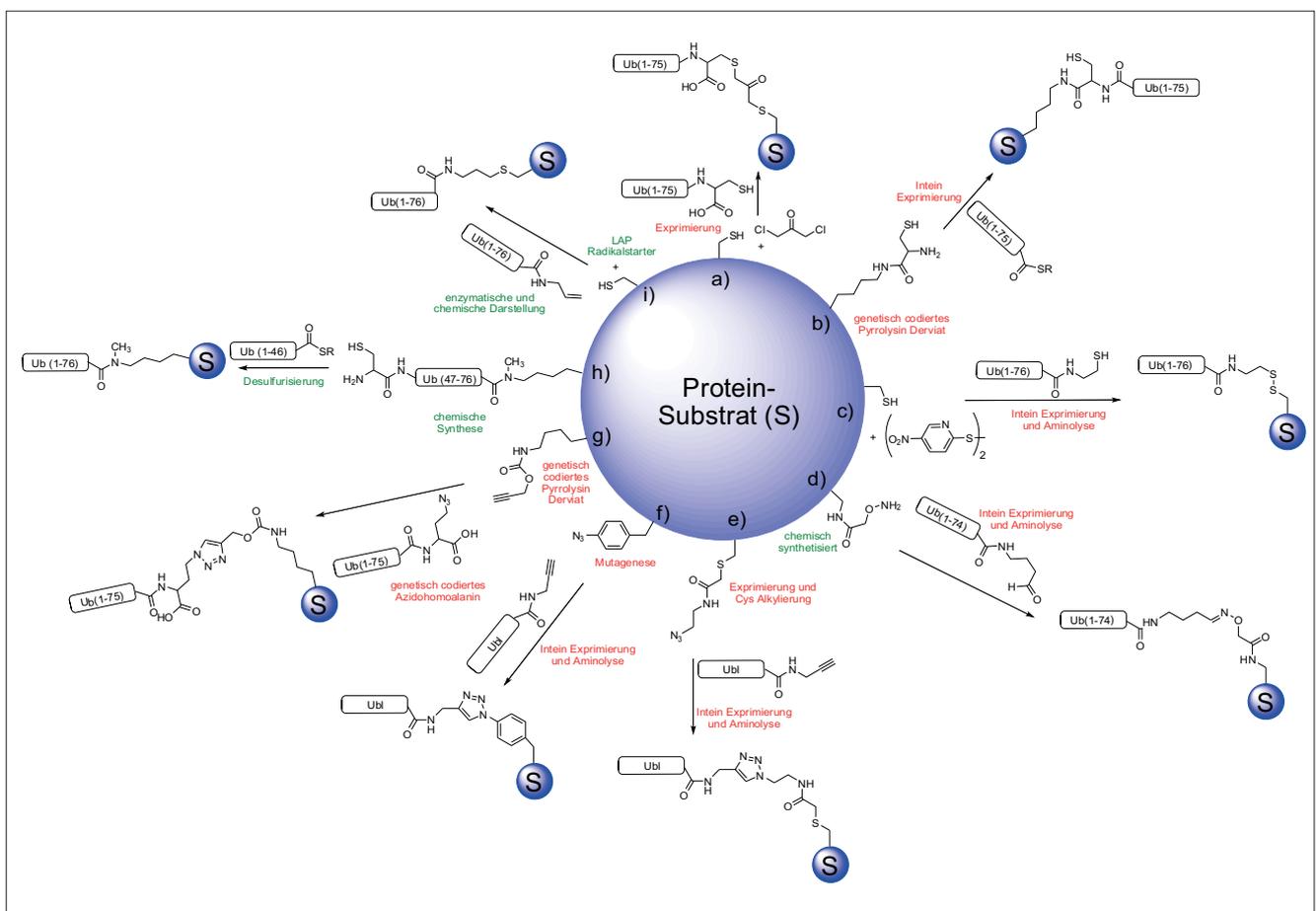


Abb. 3. Chemoselektive Konjugationsstrategien zur Darstellung von unnatürlichen Ub- oder Ubl-Konjugaten.

cer wurde ein zur nativen Isopeptidbindung isosterisches Analogon generiert, um einen ähnlichen Raumanspruch zu gewährleisten. Der Effekt der Peptidsequenz nahe der Isopeptidbindung wurde in Bezug auf Spezifität für einige DUBs wie USP7, USP4 und USP21 durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) untersucht.

Henning D. Mootz und seine Mitarbeiter nutzten die Cu<sup>I</sup>-katalysierte Huisgen-Cycloaddition (Klick-Chemie), um Ub und kleine Ub-ähnliche Proteine (Ub-like, Ubl) mit Zielproteinen zu verbinden<sup>21,22</sup> – zu diesem Zeitpunkt eine neue Technik zur Verbindung zweier Proteine. Chemisch (Abbildung 3e) oder mutagenetisch (Abbildung 3f) erzeugtes Azid an den Zielproteinen wurde mit Ubl-Alkin-Derivaten durch Klick-Chemie verbunden, wobei sich die neuen Triazol-Konjugate als hydrolysestabil erwiesen. So wurde auch erstmals ein aktives Enzym mit einer chemischen Ubl-Modifikation synthetisiert.<sup>22</sup> In einer weiteren Studie diente Klick-Chemie dazu, triazolkonjugierte Analoga aller sieben verschiedenartig verknüpfter di-Ubs zu synthetisieren.

Zeitgleich berichteten die Arbeitsgruppen von Andreas Marx und Marina Rubini von einer Synthese definierter di-Ub-Ketten durch Klick-Chemie.<sup>23</sup> Dafür ersetzen sie in einem Ub mutagenetisch C-terminales Glycin mit Azidohomoalanin (Aha) und in einem anderen Ub das Akzeptorlysin durch das propargylgeschützte Lysinderivat Plk (Abbildung 3g). Dieses Verfahren ermöglichte die Expressierung von sieben Alkin funktionalisierten Ub-Plk-Derivaten in guten Ausbeuten. In ihrer Annahme bestätigt, dass eine Triazolbindung ein gutes Isopeptidanalogen ist, erweiterten sie ihre Herangehensweise auf die Monoubiquitinierung von PCNA durch Klick-Chemie.<sup>24</sup>

Einen weiteren Ansatz zur Darstellung hydrolyseunempfindlicher Ub-Verbindungen bietet die Synthese N-methylierter Isopeptidbindungen (Abbildung 3h).<sup>25</sup> Nach dieser Methode wurden stabile

Peptide und Proteine in ubiquitinierten Form synthetisiert, wobei die Modifikation durch eine Methylgruppe die native Isopeptidbindung nur minimal verändert.

Während eine Cu<sup>I</sup>-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition oder die chemische N-Methylierung der Isopeptidbindung hydrolysestabile Derivate liefern, wurden im Arbeitskreis von Eric Strieter Thioether-Konjugate synthetisiert, die durch DUBs hydrolysierbar sind (Abbildung 3i).<sup>26</sup> Durch radikalisch initiierte Thiol-En-Kupplung (TEC) ließen sich spezifische Isopeptidanaloga (Nε-Gly-L-homothiaLys) generieren, deren Aktivität gegenüber DUBs denen nativer Nε-Gly-L-Lys-Derivate ähnelt. Zu diesem Zweck wurde genetisch das Akzeptorlysin durch Cystein ersetzt, womit eine TEC-Reaktion mit einer Allylgruppe am C-Terminus eines zweiten Ubs ermöglicht wurde. Es ließen sich jedoch nur sechs der sieben K-C-verbundenen Dimere gewinnen, da mit dem UbK27C/Ub-AA-Paar auf Grund sterischer Unzugänglichkeit von K27 keine TEC-Reaktion durchführbar war. Bedingt durch die Einfachheit und die guten Ausbeuten dieser Strategie wurden drei spezifisch verzweigte Ub-Trimere generiert (K6C, K48C; K11C, K48C und K48C, K63C), mit denen sich systematisch der Einfluss von weiterem Ub auf die Hydrolyse durch DUBs an der K48-Verbindung untersuchen ließ. Diese Studie legte nahe, dass Verzweigungen in Trimeren ein Regulationsmechanismus für bindungsspezifische Interaktionen sind.

### Fazit und Ausblick

◆ Fortschritte in der chemischen Biologie haben ein neues Zeitalter in der Untersuchung funktionaler Proteine eingeläutet. Die hier präsentierten Ansätze ermöglichen die Synthese von natürlichen und unnatürlichen Ub-Verbindungen unterschiedlicher Zusammensetzungen.<sup>27,28</sup>

Es ist jedoch von Fall zu Fall zu unterscheiden, welcher Ansatz sich

zur Untersuchung eines bestimmten Sachverhaltes am besten eignet. Es wurden beispielsweise Aspekte der Aktivität und Spezifität diverser DUBs und UBDs oder des Crosstalks zwischen Ub und anderen PTMs beleuchtet, die zur Entwicklung neuer Medikamente beitragen können. In Zukunft können nun auch gemischte Ub-Ubl-Konjugate synthetisiert und untersucht werden.

Bei diesen Aufgaben ist die Synthese von unnatürlichen Isopeptidanaloga oft eine leichter zugängliche Alternative zur Synthese nativer Bindungen. Es ist dabei jedoch stets kritisch zu hinterfragen, ob neuartige unnatürliche Konjugate Veränderungen dynamischer oder struktureller Eigenschaften nach sich ziehen. Technische Fortschritte wie Ub-AQUA-(absolute quantification)-Massenspektrometrie (MS), zweidimensionale Gelelektrophorese-MS, bindungsspezifische Antikörperentwicklung, Ub-Sensoren und synthetische UBDs werden dazu beitragen, neuartige biologisch relevante Ub-Konjugate zu identifizieren.<sup>29</sup>

### Literatur

- 1) A. Ciechanover, *Angew. Chem* 2005, 117, 6095–6119.
- 2) A. Hershko, *Angew. Chem* 2005, 117, 6082–6094.
- 3) I. Rose, *Angew. Chem* 2005, 117, 6076–6081.
- 4) D. Hoeller, I. Dikic, *Nature* 2009, 458, 438–444.
- 5) C. Patterson, C. Ike, P. W. Willis IV, G. A. Stouffer, M. S. Willis, *Circulation* 2007, 115, 1456–1463.
- 6) H.-C. Tai, E. M. Schuman, *Nat. Rev. Neurosci.* 2008, 9, 826–838.
- 7) L. Bedford, J. Lowe, L. R. Dick, R. J. Mayer, J. E. Brownell, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2011, 10, 29–46.
- 8) A. Bremm, S. M. Freund, D. Komander, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010, 17, 939–947.
- 9) H.-D. Arndt, C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Chem. Unserer Zeit* 2010, 44, 130–137.
- 10) C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem* 2008, 120, 10182–10228.
- 11) R. K. McGinty, J. Kim, C. Chatterjee, R. G. Roeder, T. W. Muir, *Nature* 2008, 453, 812–816.
- 12) S. Virdee, Y. Ye, D. P. Nguyen, D. Komander, J. W. Chin, *Nat. Chem. Biol.* 2010, 426, 1–8.
- 13) M. Hejjaoui, M. Haj-Yahya, K. S. A. Kumar, A. Briki, H. A. Lashuel, *Angew. Chem* 2011, 123, 425–429.

- 14) S. N. Bavikar, L. Spasser, M. Haj-Yahya, S. V. Karthikeyan, T. Moyal, K. S. A. Kumar, A. Brik, *Angew. Chem.* 2012, 124, 782–787.
- 15) S. Virdee, P. B. Kapadnis, T. Elliot, K. Lang, J. Madrzak, D. P. Nguyen, L. Riechmann, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 10708–10711.
- 16) L. Yin, B. Krantz, N. S. Russel, S. Desphande, K. D. Wilkinson, *Biochemistry* 2000, 39, 10001–10010.
- 17) X. Li, T. Fekner, J. J. Ottesen, M. K. Chan, *Angew. Chem.Int. Ed.* 2009, 48, 9184–9187.
- 18) C. Chatterjee, R. K. McGinty, B. Fierz, T. W. Muir, *Nat. Chem. Biol.* 2010, 6, 267–269.
- 19) J. Chen, Y. Ai, J. Wang, L. Haracska, Z. Zhuang, *Nat. Chem. Biol.* 2010, 6, 270–272.
- 20) A. Shanmugham, A. Fish, M. P. A. Luna-Vargas, A. C. Faesen, F. El Oualid, T. K. Sixma, H. Ovaa, *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 8834–8835.
- 21) N. D. Weikart, H. D. Mootz, *ChemBioChem* 2010, 11, 774–777.
- 22) S. Sommer, N. D. Weikart, A. Brockmeyer, P. Janning, H. D. Mootz, *Angew. Chem.* 2011, 123, 10062–10066.
- 23) S. Eger, M. Scheffner, A. Marx, M. Rubini, *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 16337–16339.
- 24) S. Eger, B. Castrec, U. Hübscher, M. Scheffner, M. Rubini, A. Marx, *ChemBioChem*, 2011, 12, 2807–2812.
- 25) M. Haj-Yaha, N. Eltarteer, S. Ohayon, E. Shema, E. Kotler, M. Oren, A. Brik, *Angew. Chem.* 2012, 124, 11703–11707.
- 26) E. M. Valkevich, R. G. Guenette, N. A. Sanchez, Y. Chen, Y. Ge, E. R. Strieter, *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 6916–6919.
- 27) L. Spasser, A. Brik, *Angew. Chem.* 2012, 124, 6946–6969.
- 28) E. R. Strieter, D. A. Korasick, *ACS Chem. Biol.* 2012, 7, 52–63.
- 29) Y. Kulathu, D. Kommander, *Nature* 2012, 13, 508–523.

#### Christian Hackenberger,

Jahrgang 1976, beschäftigt sich mit seiner Arbeitsgruppe mit der Entwicklung neuer chemoselektiver Verfahren für die Gewinnung modifizierter funktionaler Proteine. Er ist Koordinator des Schwerpunktprogramms 1623 mit diesem thematischen Schwerpunkt ([www.spp1623.de](http://www.spp1623.de)). Ende 2012 wurde er auf eine Leibniz-Humboldt-Professur für chemische Biologie am FMP Berlin und der HU Berlin berufen. [hackenbe@zedat.fu-berlin.de](mailto:hackenbe@zedat.fu-berlin.de)



#### Oliver Reimann,

Jahrgang 1984, studierte Chemie an der FU Berlin und promovierte seit 2011 in der Arbeitsgruppe von Christian Hackenberger. In seiner Doktorarbeit als Stipendiat des Fonds der Chemischen Industrie arbeitet er an der Semisynthese posttranslativaler Varianten des Alzheimerrelevanten Tau-Proteins.



## Erweiterung des genetischen Codes

◆ Einblicke in die molekulare Funktion lebender Systeme zu gewinnen, hängt zunehmend von der Fähigkeit von Chemikern ab, Chemie in intakten Zellen durchzuführen. Ein besonders zugänglicher und vielseitiger Ansatz zur Einführung neuer chemischer Funktionen in zelluläre Systeme ist die Adaptation der zentralen zellulären Biosynthesemaschinerie selbst – der genetisch kodierten Proteinbiosynthese. Diese Erweiterung des genetischen Codes hat in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht und Einblicke in viele biologische Prozesse geliefert, die mit traditionellen Methoden nicht oder nur schwer zugänglich gewesen wären.<sup>1)</sup>

Das Prinzip dieser Methode beruht auf einem Paar aus Aminoacyl-tRNA-Synthetase und tRNA, das eine nichtkanonische Aminosäure (non-canonical amino acid, ncAA) mit gewünschter Funktion prozessieren kann. Dieses Paar verhält sich orthogonal, es kann also nicht mit seinen im Wirtsorganismus vorhandenen Gegenstücken oder kanonischen Aminosäuren kreuzreagieren. Dagegen ist es mit den generellen Translationskomponenten, etwa Elongationsfaktoren (beispielsweise EF-Tu in *E. coli*) und dem Ribosom kompatibel (Abbildung 1, S. 304). Mit tRNAs, die ein freies (nonsense oder frameshift) Codon erkennen, etwa das Amber Stopcodon (TAG), lässt sich die ncAA nach tRNA-Aminoacylierung ribosomal und positionspezifisch in beliebige Proteine direkt in der Zelle einbauen. Mit diesem Ansatz wurden in den letzten zehn Jahren viele chemische und biophysikalische Funktionen erstmals in Proteine eingebaut, etwa funktionelle Gruppen für bioorthogonale Konjugations-Chemie,<sup>2)</sup> Fluorophore,<sup>3)</sup> photoaktivierbare Aminosäuren,<sup>4)</sup> Photo-Crosslinker,<sup>5)</sup> Metall-Chelatoren,<sup>6)</sup> isotoopenmarkierte Aminosäuren für NMR-Studien<sup>7)</sup> oder posttranslationale Modifikationen.<sup>8)</sup>

Eine besondere Stärke der Methode ist die direkte und unkom-

plizierte Anwendung solcher Funktionen in vivo; insbesondere in der Zellbiologie gibt es daher bereits viele, teils sehr unterschiedliche Anwendungen.<sup>1)</sup> Im Folgenden beschränken wir uns auf Entwicklungen, die grundlegende Aspekte der Methode selbst betreffen. Dies sind insbesondere:

- die Einführung mehrerer gleicher oder unterschiedlicher ncAA in ein Protein in Abhängigkeit von individuellen Codons,
- die Installation orthogonaler Paare in weiteren, insbesondere in höheren Organismen sowie
- der Einbau von Aminosäuren, die strukturell stark von den bisherigen ncAA abweichen und so bisher nicht zugängliche Funktionen ermöglichen könnten.

Weitere Trends sind die Verwendung von Organismen mit erweitertem genetischen Code für das evolutive Design neuer Proteinfunktionen und die Nutzung veränderter oder heterologer Aminosäure-Biosynthesewege für die integrierte Synthese und Inkorporation von ncAA.

#### Einbau mehrerer und mehrerer unterschiedlicher ncAA in Proteine

◆ Während für die genetische Codierung mehrerer identischer ncAA prinzipiell das Amber-Stopcodon genutzt werden kann, sind für die genetische Codierung mehrerer, unterschiedlicher ncAA zusätzliche freie Codons nötig. Für beide Fälle gab es erste Erfolge vor allem durch die Erzeugung orthogonaler Paare aus Ribosom und messenger RNA (mRNA). Dies machte erstmals die Veränderung von Ribosomen durch evolutives Design möglich, ohne die natürliche Proteinbiosynthese des Wirts zu beeinflussen. Dies gelang durch Mutagenese-Experimente zur Erkennung artifizierender mRNA-Shine-Dalgarno-Sequenzen durch veränderte 16S-rRNA-Einheiten des Ribosoms.<sup>9)</sup> →