

Strukturelle Studie zur Erweiterung des genetischen Codes durch ein artifizielles Nucleobasenpaar

Karin Betz, Michiko Kimoto, Kay Diederichs, Ichiro Hirao* und Andreas Marx*

Abstract: Hydrophobe artifizelle Basenpaare, die keine Wasserstoffbrücken bilden, sind die derzeit vielversprechendsten Kandidaten zur Erweiterung des genetischen Alphabets. Die erfolgreichsten nichtnatürlichen Nucleobasen weisen wenig Ähnlichkeit untereinander und mit ihren natürlichen Gegenstücken auf. Daher ist es rätselhaft, wie sie von DNA-Polymerasen prozessiert werden, den Enzymen, die in der Evolution eigentlich daraufhin optimiert wurden, effizient die natürlichen Bausteine zu prozessieren. Hier werden die strukturellen Hintergründe des enzymatischen Einbaus von dDs-dPx, einem der vielversprechendsten hydrophoben nichtnatürlichen Basenpaare, in einen DNA-Strang untersucht. Dazu wurde eine Kristallstruktur der KlenTaq-DNA-Polymerase mit einem modifizierten Templat/Primer-Duplex und dem gebundenen nichtnatürlichen Triphosphat gelöst. Der ternäre Komplex zeigt, dass das artifizelle Paar genau wie ein natürliches Basenpaar eine planare Struktur annimmt, und lässt zudem Besonderheiten erkennen, die die immer noch schlechtere Einbaueffizienz bei der Prozessierung von nichtnatürlichen Substraten erklären könnten.

Die Erweiterung des genetischen Codes durch ein nichtnatürliches Basenpaar erhöht die funktionelle Diversität von Nucleinsäuren und damit auch deren biologische und biotechnologische Anwendbarkeit. Zusätzlich zu Nucleobasenpaaren, die ein abweichendes Muster von Wasserstoffbrücken gegenüber dem der natürlichen A-T- und G-C-Paaren bilden,^[1] wurden in den letzten Jahren auch hydrophobe Surrogate entwickelt, die ausschließlich auf hydrophoben und Basenstapel-Wechselwirkungen beruhen. Es wurde gezeigt, dass diese in der Lage sind, selektiv miteinander zu paaren, und daher gute Kandidaten sind, um ein drittes Basenpaar zu generieren.^[2] Ihr Hauptvorteil ist, dass sie durch ihre fehlende

Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrücken auch eine geringere Fehlpaarungsrate mit den natürlichen Nucleotiden aufweisen. Bedeutende Vertreter sind die Paare von 2-Methoxynaphthalin (NaM) mit 6-Methyl-2*H*-isochinolin-1-thion (5SICS) und Thieno[2,3-*c*]pyridin-7(6*H*)-thion (TPT3), die in der Gruppe von Romesberg entwickelt wurden,^[3] sowie das Paar aus 7-(2-Thienyl)imidazo[4,5-*b*]pyridin (Ds) und 2-Nitro-4-propinylpyrrol (Px), das von der Hirao-Gruppe stammt^[4-7] (Abbildung 1). Das letztgenannte Paar wurde

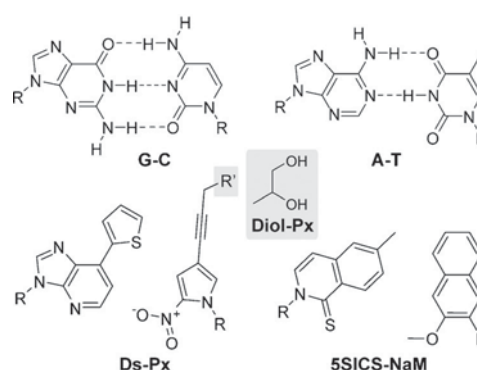


Abbildung 1. Strukturen der natürlichen Basenpaare und zweier erfolgreicher hydrophober artifizeller Basenpaare. R = 2'-Desoxyribose; R' kann unterschiedliche funktionelle Gruppen darstellen, z. B. die Diol-Gruppe, die grau hinterlegt ist und in dieser Studie verwendet wurde.

kürzlich verwendet, um mithilfe der systematischen Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (SELEX) hochaffine DNA-Aptamere zu generieren, die sowohl natürliche als auch nichtnatürliche Nucleotide enthalten.^[8] Hierbei erweiterte die Verwendung des nichtnatürlichen Basenpaares dDs-dPx die chemische und strukturelle Diversität der verwendeten DNA-Bibliotheken, was zu einer verbesserten Selektivität und Bindungsaffinität der Aptamere führte. Des Weiteren wurde eine erste Methode zur posttranslationalen Modifikation von RNA-Transkripten mit einem erweiterten genetischen Code präsentiert, die auf der Amplifikation von DNA mit dem dDs-dPx-Paar durch Polymerasekettenreaktion beruht.^[9] Der Schlüssel für den Erfolg dieser Verfahren ist, dass das nichtnatürliche Basenpaar während der enzymatischen Synthese der Nucleinsäuren neben den natürlichen Nucleotiden erhalten bleibt.

Das Basenpaar dDs-dPx hat keine Ähnlichkeit mit dem Paar dNaM-d5SICS und mit den natürlichen Basenpaaren. Es wurde über mehrere Screening-Runden hinweg auf eine effektive und selektive Replikation optimiert.^[4,7] Dabei zeigte sich, dass die Nitrogruppe von dPx unverzichtbar ist. Einerseits wird angenommen, dass die Nitrogruppe eine direkte

[*] Dr. K. Betz, Prof. Dr. K. Diederichs, Prof. Dr. A. Marx
Fachbereiche Chemie und Biologie
und Konstanz Research School Chemical Biology
Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 78464 Konstanz (Deutschland)
E-Mail: andreas.marx@uni-konstanz.de

Dr. M. Kimoto, Prof. Dr. I. Hirao
Institute of Bioengineering and Nanotechnology
31 Biopolis Way, The Nanos, #09-01, 138669 Singapur (Singapur)
und
RIKEN Center for Life Science Technologies
1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045
(Japan)
E-Mail: ichiro@ibn.a-star.edu.sg

oder über ein Wassermolekül verbrückte Wechselwirkung der DNA mit der DNA-Polymerase vermittelt,^[5,7] und andererseits, dass sie eine Fehlpaarung mit dA verhindert, was zu einer erhöhten Selektivität führt.^[5] Ein Vorteil dieses Basenpaares ist die einfache Möglichkeit, über einen Linker an Position 4 der Px-Base eine Vielzahl von funktionellen Gruppen für eine spätere Markierung einzuführen (grau hinterlegt in Abbildung 1), ohne dabei die Replikationseffizienz signifikant zu beeinflussen.^[10,11] Unter den verschiedenen dPx-Derivaten zeigt das Dihydroxy-Derivat die besten Paarungseigenschaften mit dDs.^[10] Über die Diol-Einheit könnte das Nukleotid oder die modifizierte DNA später durch Bildung einer Schiffsbasis weiter funktionalisiert werden. Die offensichtliche Unähnlichkeit des dDs-dPx-Paares mit den natürlichen Basenpaaren wirft die Frage auf, wie diese Analoga von DNA-Polymerasen prozessiert werden. Bis jetzt sind nur Strukturdaten des dNaM-d5SICS-Basenpaares im aktiven Zentrum einer DNA-Polymerase (genauer: des großen Fragments der DNA-Polymerase I von *Thermus aquaticus*, kurz: KlenTaq), verfügbar.^[12,13] Diese Daten zeigen, dass das Enzym das nichtnatürliche Basenpaar in eine koplanare Anordnung zwingt, sobald das Triphosphat auf das nichtnatürliche Templat trifft. Dabei werden Basenstapel-Wechselwirkungen, die man in freier doppelsträngiger DNA beobachtet, aufgelöst.^[14] Hier zeigen wir Strukturdaten von KlenTaq in Komplex mit dem nichtnatürlichen Basenpaar dDs-dPxTP (dPxTP steht hier für das Diol-dPxTP, das für die Kristallisation verwendet wurde).

Um die Kristallstruktur zu erhalten, wurde eine bereits bewährte Kristallisationsstrategie angewendet.^[12] KlenTaq wurde mit einer Mischung aus gepaartem natürlichem Primer und Templat, das dDs enthält, sowie ddCTP inkubiert, um den Primerstrang durch Einbau eines dCMP zu terminieren. Die gezüchteten Kristalle wurden anschließend mit dem Substrat dPxTP inkubiert, um die KlenTaq_{dDs-dPxTP}-Struktur zu erhalten. Zur Strukturlösung wurden Daten bis zu einer Auflösung von 1.7 Å verwendet (siehe Methodenteil und Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen).

Die Gesamtstruktur von KlenTaq_{dDs-dPxTP} mit ihren vier Domänen (N-terminale, Handflächen-, Daumen- und Fingerdomäne; Abbildung 2A) ist ähnlich zu jener des natürlichen ternären Komplexes KlenTaq_{dG-dCTP} (PDB-ID: 3RTV^[12]) sowie der von KlenTaq_{dNaM-d5SICS} (PDB-ID: 3SV3^[12]) mit mittleren quadratischen Abweichungen (rmsds) für C α -Atome von nur 0.185 Å (446 Atome überlagert, 39 Atome aussortiert) bzw. 0.173 Å (442 Atome überlagert, 91 Atome aussortiert). Alle Aminosäuren konnten modelliert werden, jedoch ist die Region der Fingerdomäne zwischen Rest 645 und 700 schlechter aufgelöst und zeigt höhere Flexibilität als der Rest des Enzyms (Abbildung S2A,D). Die Fingerdomäne liegt in einer geschlossenen Konformation vor, und das dDs-dPxTP-Paar befindet sich im aktiven Zentrum (Abbildung 2). Das Basenpaar konnte zweifelsfrei in die Differenz-Elektronendichte platziert werden, die nach dem ersten Verfeinerungsschritt der Struktur ohne das Paar erschien. Alle Funktionalitäten sind gut definiert, nur die

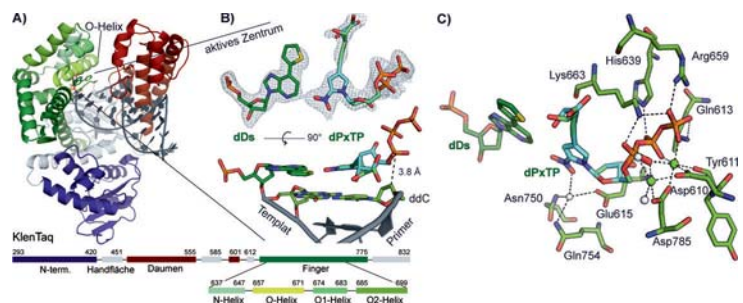


Abbildung 2. Das artifizelle Basenpaar dDs-dPxTP paart im aktiven Zentrum von KlenTaq koplanar und zeigt die gleichen Wechselwirkungen mit dem Enzym und den katalytischen Ionen wie ein natürliches Basenpaar. A) Übersicht der KlenTaq-Struktur mit gebundener DNA (dunkelgrau) und Substrat. Die Farbcodierung und Einteilung der Domänen sind in der Abbildung angegeben. B) Vergrößerte Ansicht des aktiven Zentrums. Die „Simulated Annealing mFo-DFc OMIT Map“ des dDs-dPxTP-Paares ist mit einem Cutoff von 3 σ dargestellt. dDs: dunkelgrün, R- und S-Isomer von dPxTP: cyanblau bzw. cyangrün. C) Wechselwirkungen des dPx-Triphosphats mit dem Enzym. Mg: grüne Kugeln, H₂O: weiße Kugeln.

Elektronendichte um die Diol-Einheit des Triphosphats ist etwas erweitert. Gründe dafür können zum einen die Rotationsfreiheit der terminalen Hydroxygruppen und zum anderen die gleichzeitige Bindung zweier epimerer Liganden (R- und S-Konfiguration am Diol) sein. Daher wurden beide Isomere an derselben Position modelliert und mit Besetzungen von 0.40 für das S- bzw. 0.46 für das R-Isomer verfeinert. Der Pyrrol-Teil, der Zucker und die Triphosphat-Einheit des Liganden überlagern dabei nahezu identisch. Die Ribose-Einheiten des Triphosphats und des dDs-Nukleotids liegen in einer C3'-endo-Konformation vor, genau wie beim natürlichen Basenpaar. Die Koordination zweier Magnesiumionen durch das Triphosphat, Asp610, Asp785 und das Rückgrat von Tyr611 charakterisiert einen aktiven, geschlossenen Komplex (Abbildung 2C). Der Abstand zwischen dem Primer-3'-Ende (das C3'-Atom wurde zur Messung verwendet) und dem α -Phosphat ist nahezu identisch zum natürlichen Fall (3.8 gegenüber 3.9 Å). Zusätzlich zur Koordination der Metalle wechselwirkt das Triphosphat noch mit den Seitenketten von Lys663, Arg659, His639 und dem Rückgrat von Gln613, wodurch es in seiner Position sehr gut stabilisiert scheint. Eine Wechselwirkung auf der Seite der kleinen Furche mit den Seitenketten von Asn750, Gln754 sowie Glu615 wird über ein Wassermolekül durch die Nitrogruppe von dPxTP vermittelt. Im natürlichen Fall findet diese Wechselwirkung über die O2-Atome der Pyrimidine oder über die N3-Atome der Purine statt.

Am interessantesten jedoch ist die Wechselwirkung zwischen den artifizellen Nukleotiden. Das dDs-dPxTP-Paar interkaliert nicht, sondern paart koplanar, sehr ähnlich den natürlichen Watson-Crick-Basenpaaren (Abbildung 3). Dabei ist sogar die Basenpaargeometrie zwischen dDs-dPxTP und dG-dCTP sehr ähnlich. Die „Propellerverdrehung“ („Propeller Twist“, relative Rotation zwischen den Basen innerhalb eines Basenpaares bezogen auf die Basenpaarungsachse) beträgt 10.5° im dDs-dPxTP-Paar sowie 9.2° im dG-dCTP-Paar (Abbildungen 3A und S3; bestimmt mithilfe des 3DNA-Servers^[15]). Diese Ähnlichkeit war unerwartet, da

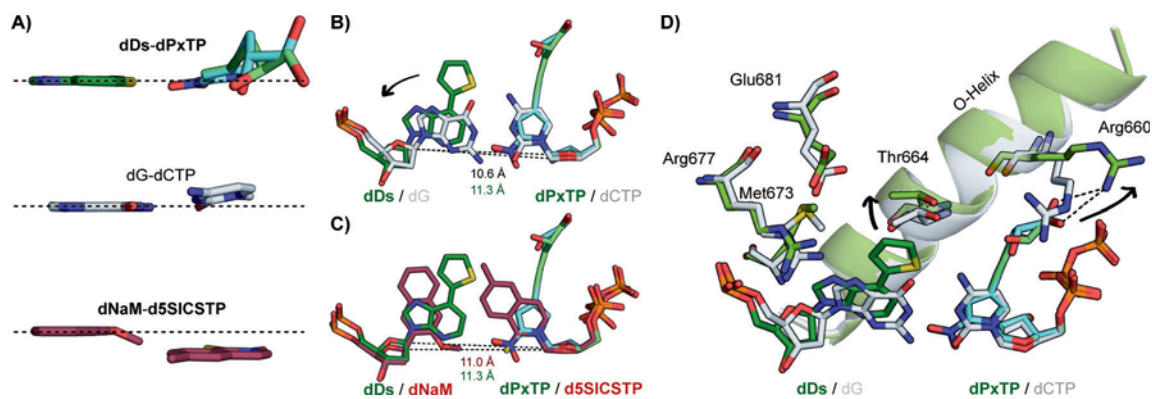


Abbildung 3. Vergleich von dDs-dPxTP mit dem natürlichen dG-dCTP-Paar und dem nichtnatürlichen dNaM-d5SICSTP-Paar in KlenTaq. A) Der Propeller Twist der Basenpaare ist gezeigt, indem die Templatbase orthogonal zur Papierebene orientiert wurde (Zucker- und Triphosphat-Einheiten sind nicht gezeigt). B) Relative Position der Basenpaare zueinander bei Überlagerung des gesamten Enzyms. C1'-C1'-Abstände zwischen den Paarungspartnern sind gezeigt. C) Verschiebungen der Reste, die das artifizielle Basenpaar auf der Seite der O-Helix umgeben, sind gezeigt. Die O-Helix der Fingerdomäne ist in Bänderdarstellung gezeigt.

das zuvor analysierte hydrophobe Basenpaar dNaM-d5SICSTP in dieser Hinsicht Unterschiede aufweist (siehe unten). Gegenüber dem natürlichen dG-dCTP-Paar zeigt das nichtnatürliche dDs-dPxTP-Paar eine vergrößerte Breite (C1'-C1'-Abstand zwischen den Partnern ist um 0,7 Å größer; Abbildung 3B). Dabei ist nur das Templatnukleotid verschoben, während das Triphosphat an seiner gut stabilisierten Position, die oben beschrieben wurde, verbleibt. Die Aminosäuren, die mit dem Templatnukleotid wechselwirken (Arg677, Ser674 und Met673) sind ebenfalls leicht verschoben (Abbildung 3D), indem sie der Bewegung des Templats folgen. Jedoch nicht nur die Breite, sondern auch die Höhe des Basenpaares unterscheidet sich von jener der kanonischen Paare. Die Thiophenyl- sowie die Propinyldiol-Einheit zeigen auf die O-Helix der Fingerdomäne. Dies bewirkt eine Verschiebung der gesamten O-Helix sowie der angrenzenden Helices und eine veränderte Orientierung mehrerer Aminosäure-Seitenketten. Thr664, welches der Thiophenyl-Einheit am nächsten kommt, wird dabei um 0,6 Å nach oben verschoben. Im Detail sind die Verschiebungen der α -Atome entlang der O-Helix in Abbildung S3D gezeigt. Einhergehend mit der Verschiebung resultiert auch eine höhere Flexibilität der gesamten Fingerdomäne und des neu gebildeten Basenpaares gegenüber dem natürlichen Fall, was man anhand der erhöhten B-Faktoren sehen kann (Abbildung S2A-C). Arg660 macht Platz für die Propinyldiol-Einheit und nimmt alternativ eine Position ein, in der es mit einer OH-Gruppe des Liganden über eine Wasserstoffbrücke wechselwirken könnte (Abbildung 3D). Die Flexibilität der Seitenkette impliziert jedoch, dass diese Wechselwirkung im vorliegenden Fall nicht stark sein kann. Ähnliche Verschiebungen von Arg660 wurden auch schon zuvor in KlenTaq-Strukturen mit modifizierten Substraten beobachtet, und die Verschiebung scheint die Einbaueffizienz nicht zu mindern.^[16,17] Insgesamt beeinflusst die vergrößerte Höhe des Basenpaares das Enzym nur auf Seiten der großen Furche, während die Seite der kleinen Furche ungestört bleibt.

Wie oben erwähnt, paart das zuvor untersuchte hydrophobe Basenpaar dNaM-d5SICSTP ebenso planar, Kante auf Kante im aktiven Zentrum von KlenTaq. Der Propeller Twist

ist jedoch deutlich kleiner (2,4°; Abbildungen 3A und S3) als bei den Paaren dG-dCTP und dDs-dPxTP, und das Basenpaar zeigt zudem eine größere Verschiebung der Basen entlang der Z-Achse (Stagger = -1,2 Å). Für dG-dCTP ist diese Verschiebung nicht vorhanden, und für dDs-dPxTP beträgt sie nur 0,12 Å. Diese beiden Basenpaarparameter wurden zuvor beim Vergleich des hydrophoben artifiziellen Basenpaares dNaM-d5SICSTP mit dem natürlichen dG-dCTP-Paar nicht diskutiert. Mit Analyse der neuen Struktur KlenTaq_{dDs-dPxTP} wurde dieser nicht ganz offensichtliche Unterschied zwischen den beiden nichtnatürlichen Basenpaaren gegenüber den natürlichen identifiziert.

Eine Gemeinsamkeit der beiden hydrophoben Basenpaare ist ihr vergrößerter Abstand zwischen den paarenden Partnern (Abbildung 3B), denn auch bei dNaM-d5SICSTP ist die C1'-C1'-Distanz vergrößert (11,0 gegenüber 10,6 Å im Falle von dG-dCTP; Abbildungen 3B,C und S1A). Die Reste, die das Templatnukleotid umgeben, sind gegenüber KlenTaq_{dDs-dPxTP} sogar noch etwas mehr verschoben, was von der unterschiedlichen Struktur der Nukleobase herrührt (Abbildung S1B). Wenn ein artifizielles Basenpaar im aktiven Zentrum von KlenTaq paart, scheint das Enzym nur in eine Richtung hin flexibel zu sein, und zwar im Bereich des Templatnukleotids. Die Position des Triphosphats dagegen verändert sich nicht. Hierdurch kann garantiert werden, dass das Triphosphat perfekt platziert ist, um von der 3'-OH-Gruppe des Primerendes angegriffen zu werden, obwohl das Basenpaar an sich in manchen Parametern von der natürlichen Konsensus-Struktur abweicht.

Zusätzlich zur Verschiebung auf Seiten des Templats wird in KlenTaq_{dNaM-d5SICSTP} eine ähnliche Verschiebung der O-Helix, wie oben für KlenTaq_{dDs-dPxTP} beschrieben, beobachtet. In beiden Fällen schließt die O-Helix weit genug, damit das Substrat und alle anderen Komponenten, die an der Katalyse beteiligt sind, richtig angeordnet sind.

Ein kürzlich publiziertes Modell des dDs-dPx-Basenpaares im aktiven Zentrum der Deep-Vent-DNA-Polymerase (einer Polymerase, die das dDs-dPx-Paar im Replikationsprozess mit hoher Genauigkeit erkennt^[10]) legt nahe, dass das Paar dort genug Platz findet.^[18] Im Unterschied dazu deutet

die Modellierung des artifiziiellen Paares im aktiven Zentrum der ternären KlenTaq-Struktur darauf hin, dass hier das Sauerstoffatom der Thr664-Seitenkette mit dem Templatnukleotid dDs kollidiert.^[18] Tatsächlich ist Thr664 zwar der Rest in der O-Helix der Fingerdomäne, der dem nichtnatürlichen Paar am nächsten kommt, jedoch zeigen unsere Strukturdaten, dass das Enzym flexibel genug ist, um sich an die Struktur des Basenpaares anzupassen. Die beschriebene Verschiebung sowie die erhöhten B-Faktoren der O-Helix und anderer Teile der Fingerdomäne (siehe Abbildung S2) lassen jedoch darauf schließen, dass sich die O-Helix nicht so fest schließt, wie es bei einem natürlichen Paar der Fall wäre. Dieser kleine Unterschied könnte erklären, warum die beiden erfolgreichsten hydrophoben artifiziiellen Basenpaare gegenüber ihren natürlichen Vertretern immer noch mit etwas schlechterer Effizienz gebildet werden. Die perfekte Anordnung der Komponenten, die an der katalytischen Reaktion beteiligt sind, könnte dadurch in einem oder mehreren Schritten während des Einbauprozesses leicht gestört sein. Veränderungen der Größe der Paare auf Seiten der O-Helix oder Mutation des Enzyms in dieser Region wären daher eine Möglichkeit, den Einbau eines dritten Basenpaares weiter zu optimieren.

Eine Besonderheit der dPx-Nukleobase ist die Möglichkeit, sie mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen zu modifizieren. Die Linker-Einheit von dPxTP ist so platziert, dass die Modifikation das Enzym durch zwei mögliche Kanäle verlassen kann, wie zuvor für C5-modifizierte Desoxyuridine und C7-modifizierte 7-Desazaadenosine in KlenTaq gezeigt wurde.^[16,17,19] (Die Daten in Tabelle 2 aus Lit. [10] zeigen die Abhängigkeit der Replikationseffizienz von unterschiedlichen dPx-Funktionalitäten, wobei große Seitenketten die Effizienz verminderten.)

Wir haben hier strukturelle Grundlagen für die Erweiterung des genetischen Alphabets durch das dDs-dPxTP-Paar präsentiert. Die Daten zeigen, wie das artifiziielle Basenpaar durch die Art und Weise der Paarung (Kante auf Kante, wie im Falle der natürlichen Basenpaare) im aktiven Zentrum von KlenTaq akzeptiert werden kann. Dieser Befund stimmt mit den früheren Beobachtungen für das artifiziielle Basenpaar dNaM-d5SICSTP überein. Im Unterschied zu dNaM-d5SICSTP, das fast koplanar paart, nimmt das dDs-dPxTP Paar einen ähnlichen Propeller Twist wie das natürliche dG-dCTP Paar an. Beide nichtnatürliche Basenpaare zeigen eine vergrößerte absolute Breite und unterschiedliche Höhen gegenüber ihren natürlichen Gegenstücken. Die KlenTaq-DNA-Polymerase hat eine gewisse Flexibilität, um sich an die leicht vergrößerten Basenpaare anzupassen. Dabei werden die Positionen des Triphosphats und des Enzyms auf Seiten der kleinen Furche des Basenpaares nicht beeinflusst, während die Anpassungen des Enzyms auf Seiten des Templatnukleotids und der O-Helix stattfinden. Im Falle von beiden Basenpaaren ist die O-Helix nicht so fest geschlossen wie im natürlichen Fall, und die daraus resultierenden kleinen Veränderungen der Positionen könnten die immer noch verminderte Einbaueffizienz der artifiziiellen Substrate erklären. Dadurch sind die Größe der Paare in diese Richtung sowie Reste in der O-Helix passende Stellen für weitere Veränderungen zur Verbesserung der Einbaureaktion.

Unsere Befunde bestätigen somit, dass hydrophobe Basenpaare geeignet sind, um den genetischen Code zu erweitern, solange sie in der Lage sind, mit ähnlicher Geometrie wie die natürlichen Basenpaare zu paaren, und in die aktiven Zentren der entsprechenden Enzyme passen. Zudem scheinen Basenpaarparameter (wie der Propeller Twist) zwischen verschiedenen hydrophoben Basenpaaren durchaus zu variieren. Wir nehmen an, dass es schwer ist, die Paarungsgeometrie, die ein Paar im aktiven Zentrum einer Polymerase annimmt, direkt aus der Architektur des Paares vorherzusagen. Dies macht strukturelle Studien unverzichtbar, um zukünftige artifiziielle Basenpaare für die Erweiterung des genetischen Codes zu charakterisieren.

Danksagung

Wir danken dem Beamline-Personal der Synchrotron Lichtquelle Schweiz am Paul Scherrer Institut für den Zugang zur und die Hilfe an der Beamline. Außerdem danken wir der Konstanz Research School Chemical Biology (K.B.) und der Japan Science and Technology Agency, Precursory Research for Embryonic Science and Technology (JPMJPR13K9; M.K.) für finanzielle Unterstützung. Ein Teil dieser Arbeit wurde durch das Institute of Bioengineering and Nanotechnology (Biomedical Research Council, Agency for Science, Technology and Research, Singapore) gefördert.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Stichwörter: Artifiziielle Basenpaare · DNA-Polymerasen · Enzymkatalyse · Nukleobasen · Strukturaufklärung

- [1] a) C. Switzer, S. E. Moroney, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8322–8323; b) J. A. Piccirilli, T. Krauch, S. E. Moroney, S. A. Benner, *Nature* **1990**, *343*, 33–37; c) M. Ishikawa, I. Hirao, S. Yokoyama, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3931–3934; d) T. Fujiwara, M. Kimoto, H. Sugiyama, I. Hirao, S. Yokoyama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2221–2223; e) I. Hirao, Y. Harada, M. Kimoto, T. Mitsui, T. Fujiwara, S. Yokoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13298–13305; f) Z. Yang, D. Hutter, P. Sheng, A. M. Sismour, S. A. Benner, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 6095–6101; g) N. Tarashima, Y. Komatsu, K. Furukawa, N. Minakawa, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 10688–10695.
- [2] a) D. L. McMinn, A. K. Ogawa, Y. Wu, J. Liu, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11585–11586; b) E. T. Kool, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 191–219; c) T. Mitsui, A. Kitamura, M. Kimoto, T. To, A. Sato, I. Hirao, S. Yokoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5298–5307.
- [3] a) Y. J. Seo, G. T. Hwang, P. Ordoukhanian, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3246–3252; b) T. Laverne, D. A. Malyshev, F. E. Romesberg, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1231–1239; c) L. Li, M. Degardin, T. Laverne, D. A. Malyshev, K. Dhami, P. Ordoukhanian, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 826–829; d) Y. Zhang, B. M. Lamb, A. W. Feldman, A. X. Zhou,

- T. Lavergne, L. Li, F. E. Romesberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, 201616443.
- [4] I. Hirao, M. Kimoto, T. Mitsui, T. Fujiwara, R. Kawai, A. Sato, Y. Harada, S. Yokoyama, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 729–735.
- [5] I. Hirao, T. Mitsui, M. Kimoto, S. Yokoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15549–15555.
- [6] M. Kimoto, R. Kawai, T. Mitsui, S. Yokoyama, I. Hirao, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e14.
- [7] I. Hirao, M. Kimoto, R. Yamashige, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 2055–2065.
- [8] a) M. Kimoto, R. Yamashige, K.-i. Matsunaga, S. Yokoyama, I. Hirao, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 453; b) K.-i. Matsunaga, M. Kimoto, C. Hanson, M. Sanford, H. A. Young, I. Hirao, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 18478; c) M. Kimoto, M. Nakamura, I. Hirao, *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 7487–7494; d) K.-i. Matsunaga, M. Kimoto, I. Hirao, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 324–334.
- [9] T. Someya, A. Ando, M. Kimoto, I. Hirao, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 6665–6676.
- [10] R. Yamashige, M. Kimoto, Y. Takezawa, A. Sato, T. Mitsui, S. Yokoyama, I. Hirao, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 2793–2806.
- [11] I. Okamoto, Y. Miyatake, M. Kimoto, I. Hirao, *ACS Synth. Biol.* **2016**, *5*, 1220–1230.
- [12] K. Betz, D. A. Malyshev, T. Lavergne, W. Welte, K. Diederichs, T. J. Dwyer, P. Ordoukhanian, F. E. Romesberg, A. Marx, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 612–614.
- [13] K. Betz, D. A. Malyshev, T. Lavergne, W. Welte, K. Diederichs, F. E. Romesberg, A. Marx, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18637–18643.
- [14] D. A. Malyshev, D. A. Pfaff, S. I. Ippoliti, G. T. Hwang, T. J. Dwyer, F. E. Romesberg, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 12650–12659.
- [15] X.-J. Lu, W. K. Olson, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1213–1227.
- [16] K. Bergen, A.-L. Steck, S. Strütt, A. Baccaro, W. Welte, K. Diederichs, A. Marx, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11840–11843.
- [17] A. Hottin, K. Betz, K. Diederichs, A. Marx, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 2109–2118.
- [18] Y. Hikida, M. Kimoto, I. Hirao, S. Yokoyama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *483*, 52–57.
- [19] A. Hottin, A. Marx, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 418–427.