

Wie eindeutig ist der genetische Code?*

Christiane Fenske, Gottfried J. Palm und Winfried Hinrichs*

Stichwörter:

Aminosäuren · Enzyme · Genetischer Code · Pyrrolysin · RNA

In memoriam Max Perutz

Einleitung

In zwei kürzlich erschienenen Publikationen in *Science* haben die Arbeitsgruppen von Krzycki und Chan eine neue genetisch codierte Aminosäure – ein modifiziertes Lysin – beschrieben, die den genetischen Code auf 22 Aminosäuren erweitert. Diese Aminosäure wurde durch genetische^[1] und kristallographische^[2] Arbeiten identifiziert und gehört offenbar zum aktiven Zentrum von Enzymen, die bei der katabolen Umsetzung von Methylaminen in methanogenen Archaea eine essentielle Rolle spielen. Kohlenstoff-Assimilation und Methanogenese in *Methanosarcina* sp. beruhen auf spezifischen Methyltransferasen, deren Substrat Mono-, Di- oder Trimethylamin ist.

In der ersten Publikation wird berichtet, dass die neue Aminosäure im Ribosom in die wachsende Polypeptidkette eingebaut wird und durch ein UAG-Stoppocodon festgelegt ist, das normalerweise die Translation während der Proteinsynthese beendet. Hierbei wird eine spezifische tRNA verwendet, die durch ihre zugehörige tRNA-Synthetase aktiviert wird. In der zweiten Publikation wird die Monomethylamin-Methyltransferase (458 Aminosäurereste) aus *Methanosarcina barkeri* durch Röntgenstrukturanalyse charakterisiert und der Aminosäurerest 201 als ein 4-Methylpyrrolin-5-carboxylat-modifizier-

tes Lysin identifiziert, das den Namen Pyrrolysin erhielt.

Die Entdeckung, dass ein Stoppcodon nicht immer „Stopp“ bedeutet, sondern eine ungewöhnliche Aminosäure codieren kann, veranlasste uns zu einigen Überlegungen zur Universalität des genetischen Codes. Ist es möglich, dass in früheren Zeiten jedes Codon eine andere Aminosäure codierte und nach Millionen von Jahren der Evolution einige seltenere Aminosäuren durch die derzeit bekannten ersetzt wurden, die nun durch bis zu sechs verschiedene Codons definiert werden? Sollte das der Fall sein, kann man einen Vergleich zum Verlust der Sprachenvielfalt ziehen: Chinesisch, Englisch und Arabisch werden von immer mehr Menschen gesprochen, gleichzeitig gehen Jahr für Jahr Sprachen verloren, weil Menschen ihre heimischen Traditionen nicht mehr pflegen können.

Struktur und Chemie des Pyrrolysins

Die dreidimensionalen Faltungsmuster biologischer Makromoleküle (Polypeptide, Polynucleotide usw.) und deren Wechselwirkung mit anderen biologisch relevanten Molekülen können durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden. Diese Methode ermöglicht es, die chemischen Grundlagen biologischer Prozesse bei atomarer Auflösung zu erfassen; dazu gehören Regulationsmechanismen, chemische Reaktionen oder Transportphänomene. Die chemische Zusammensetzung der kristallisierten Objekte ist in der Regel bekannt, nicht aber die Konformationen der Bausteine und spezifische Wechselwirkungen innerhalb des Proteins oder Polynucleotids und deren Erkennung

von Liganden. Diese Informationen lassen sich ab initio noch immer nicht aus den Sequenzen vorhersagen, deshalb sind Strukturanalysen mit hoher Auflösung durch Kristallographie oder NMR-Spektroskopie unumgänglich.

Monomethylamin-Methyltransferase (MtmB) überträgt die Methylgruppe des Methylamins auf den Corrinoid-Cofaktor einer weiteren assoziierten Methyltransferase, MtmC. Die chemische Struktur eines bisher unbekannten Aminosäurerestes in der Polypeptidkette von MtmB aus dem Archaeobakterium *Methanosarcina barkeri* wurde mit einer Auflösung von 1.55 Å durch Kristallstrukturanalyse aufgeklärt.^[2] Die beobachtete Elektronendichte des neuen Restes wurde als Lysin-Seitenkette interpretiert, die über eine Amid-Bindung mit 4-Methyl-pyrrolin-5-carboxylat verknüpft ist (Abbildung 1). Deshalb schlagen die Autoren für die neue Aminosäure die Bezeichnung L-Pyrrolysin vor (Dreibuchstabencode Pyl; unser vorgeschlagener Einbuchstabencode: O). Die direkte Synthesestufe des L-Prolins, das Δ^1 -Pyrrolin-5-carboxylat, passt wegen der D-Chiralität und des Substituenten an C-4 nicht zu den Röntgenbeugungsdaten.

Elektrospray-Massenspektrometrie des MtmB/MtmC-Komplexes stützt die Interpretation als Pyrrolin-5-carboxylat mit einem zusätzlichen Methyl-Substituenten an C-4 und schließt dessen alternative Festlegung der zugehörigen Elektronendichte als Amino- oder Hydroxygruppe aus. Das Enzym hat die bekannte Struktur eines α/β -TIM-Fasses.^[3,4] Zwar ist die Sequenz des MtmB der anderer Corrinoid-Cofaktor-assoziierten Enzyme nicht sehr ähnlich, aber die Autoren weisen darauf hin, dass die Topologie an Tetrahydrofolat:Corrinoid/Eisen-Schwefel-Methyltransfera-

[*] Prof. Dr. W. Hinrichs, Dipl.-Biol. C. Fenske, Dr. G. J. Palm
Institut für Chemie und Biochemie
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Soldmannstraße 16 17489 Greifswald (Deutschland)
Fax: (+49) 3834-86-4373
E-mail: hinrichs@uni-greifswald.de

[**] W.H. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung.

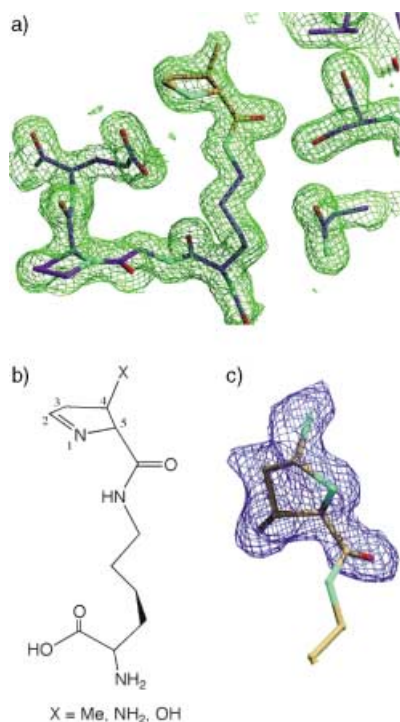


Abbildung 1. a) $2F_o - F_c$ -Elektronendichte (3σ) der NaCl-Kristallform mit dem Modell des (4R,5R)-4-substituierten Pyrrolin-5-carboxylats in Orientierung 1. Als Substituent an C-4 ist eine Methylgruppe dargestellt, die Elektronendichte lässt alternativ auch eine Ammonium- oder Hydroxygruppe zu. b) Struktur der vorgeschlagenen Aminosäure Pyrrolysin. c) Differenzelektronendichte $F_o - F_c$ der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Kristallform mit einem Modell berechnet, das L-Pyrrolysin in 40% Besetzung und ein freies Ammoniumion berücksichtigt. Die verbleibende Differenzdichte legt ein L-Pyrrolysin in einer zweiten Konformation (Orientierung 2) mit 60% Besetzung nahe, bei dem ein Amin an C-2 des Pyrrolinringes addiert ist. (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [2], Copyright 2002 American Association for the Advancement of Science)

sen, Diolhydratasen und Racemasen/Mutasen erinnert.^[5–8]

Wie auch andere Methyltransferasen hat MtmB eine tiefe, negativ geladene Tasche, die offensichtlich notwendig ist, um das Substrat Methylammonium zu binden. Die Position des neu identifizierten Aminosäurerestes am Boden dieser typischen Vertiefung weist auf dessen Funktion im katalytischen Mechanismus hin. Pyrrolysin positioniert die Methylgruppe des Substrates und ermöglicht den Angriff des Corrinoid-Cofaktors. Der vorgeschlagene Mechanismus der Methylamin-Aktivierung beruht auf zwei unterschiedlichen Konformationen des aktiven Zentrums.

Diese wurden in Kristallformen gefunden, die durch Fällung mit NaCl (NaCl-Kristallform) und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Kristallform) entstanden und Diffraktionsdaten bis 1,55 Å bzw. 1,70 Å Auflösung lieferten. Als Zwischenstufe der Reaktion kann ein Amin-Substituent an C-2 des Pyrrolin-Ringes angesehen werden, der in den durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung erhaltenen Kristallen nachgewiesen wurde, aber nicht in der anderen Struktur im Kristall. Dieser Substituent bildet Wasserstoffbrücken zu Glu- und Gln-Seitenketten und ist mit großer Wahrscheinlichkeit die Ammoniumgruppe, die als Reaktionsprodukt nach dem Methyltransfer vom Methylamin zum zugehörigen Corrinoid-Protein, MtmC, zurückbleibt.

Die Schwierigkeit bei der Interpretation der Elektronendichtekarte mit fast atomarer Auflösung ist die Fehlordnung des Pyrrolin-Gerüsts in beiden Strukturen. Die Pyrrolin-Kopfgruppe wird in zwei Orientierungen gefunden, die zueinander um etwa 90° gedreht sind. Die relative Besetzung dieser alternativen Orientierungen unterscheidet sich in den beiden Kristallformen, weil unterschiedliche Gruppen von Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein die bevorzugte Konformation mit der Seitenkette des Pyrrolysin bestimmen. Auf jeden Fall können aus den Fehlordnungen der beiden Strukturen zusätzliche Informationen bezüglich der Konformationen des aktiven Zentrums gewonnen werden, die Hinweise auf den katalytischen Mechanismus liefern und die Zuweisung der Imin-Doppelbindung N-1=C-2 stützen (Schema 1).

Genetischer Hintergrund der Pyrrolysin-Codierung

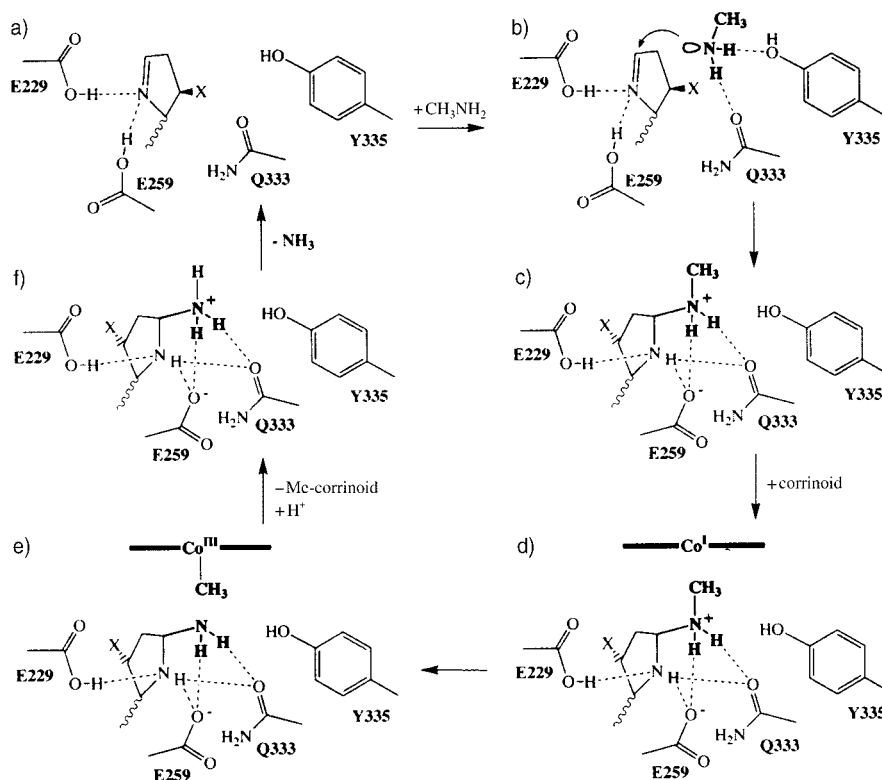
Alle Organismen auf der Erde synthetisieren die Polypeptidketten ihrer Proteine aus 20 verschiedenen L-Aminosäuren. Die Sequenzinformation zur Polypeptidsynthese wird für jedes Protein von der DNA auf die mRNA kopiert (Transkription), die in der ribosomalen „Maschinerie“ die spezifische Peptidverknüpfung bestimmt (Translation). Das grundlegende in Lehrbüchern dargestellte System beruht auf 20 proteingenen Aminosäuren, die durch Va-

riation der vier verschiedenen Nucleotide der RNA bestimmt werden. Seit etwa 50 Jahren ist bekannt, dass jede Aminosäure durch ein Triplet von Nucleotiden (Codon) in der Polynucleotidkette der DNA- und RNA-Moleküle codiert wird.

Das Vorkommen hunderter nicht-proteinogener Aminosäuren in Proteinen ist bekannt,^[9] diese werden aber alle durch Modifikation nach der ribosomalen Polypeptidsynthese oder durch nichtribosomale Prozesse hergestellt. Die erste Ausnahme hiervon war Selenocystein, das in Proteinen verschiedenster Organismen von Archaea bis zu Säugern gefunden wurde.^[10–13] Selenocystein entsteht anders als die nichtproteinogenen Aminosäuren nicht durch posttranslationale Modifikation, sondern wird durch UAG, das so genannte Opal-Stoppocodon, definiert.^[14,15]

Mehr als 10 Jahre später wurde nun Pyrrolysin als ein weiteres Beispiel gefunden.^[1,2] Krzycki et al. identifizierten in verschiedenen methanogenen Archaea eine ungewöhnliche tRNA^{Pyl} und die zugehörige Lysyl-tRNA^{Pyl}-Synthetase (PylS), die es ermöglichen, das Stoppocodon als Pyrrolysin zu übersetzen. Die Gene für diese Methyltransferasen haben ein „In-frame“-Stoppocodon (UAG, als Amber-Stoppocodon bezeichnet), das nicht die ribosomale Polypeptid-Verlängerung unterbricht. Dimethyl- und Monomethyl-Methyltransferasen haben sehr ähnliche Gene im gleichen Genom, und das Überlesen ist im Vergleich zu anderen undefinierten Stoppcodons sehr effektiv.^[16] Dass UAG in Genen für diesen speziellen Proteintyp in Archaea als normales Codon fungiert, war bisher unbekannt. Die Translation eines Stoppcodons als Pyrrolysin wird durch eine spezifische tRNA^{Pyl} möglich, die durch eine zugehörige Lysyl-tRNA-Synthetase (LysRS) mit Lysin beladen werden kann.

Die 20 Aminoacyl-Synthetasen der Standard-Aminosäuren lassen sich in zwei strukturell konservierte Klassen einteilen. Interessanterweise sind LysRS-Enzyme das einzige Beispiel mit nicht homologen Mitgliedern in Klasse I und II.^[17,18] In *M. barkeri* wurden zwei andere LysRS-Enzyme identifiziert, die jeweils zur Klasse I oder II gehören. Sequenzvergleiche der neu identifizierten Synthetasen lassen ver-



Schema 1. Modell für die Rolle des Amber-codierten Restes im Katalysezyklus. Den vorgeschlagenen Intermediaten a), b), c) und f) liegen die Strukturen des L-Pyrrolysin (X = CH₃, NH₂ oder OH) in Orientierung 1 (85 % Besetzung) aus der NaCl-Kristallform und in beiden Orientierungen aus der (NH₄)₂SO₄-Kristallform zu Grunde. Intermediate d) und e) basieren auf Dockingmodellen von MtmB mit dem zugehörigen Corrinoid-Protein MtmC. (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [2], Copyright 2002 American Association for the Advancement of Science)

muten, dass PylS einen dritten Typ von LysRS repräsentiert, der möglicherweise als eine neue Untergruppe der Klasse II anzusehen ist. Es gibt keine Hinweise auf Modifikationen der mRNA vor der Translation („transcript editing“).

Aus den gesamten genetischen und biochemischen Ergebnissen schlossen Krzycki und Kollegen, dass Pyrrolysin während der Translation in die Polypeptidkette des MtmB eingebaut wird. Leider wurde Pyrrolysin bisher nicht chemisch synthetisiert und konnte deshalb nicht als Substrat für PylS getestet werden. PylS zeigt hohe Affinität, aber langsame Reaktionsgeschwindigkeit mit Lysin. Die Synthese der Pyrrolysyl-tRNA^{Pyl} verläuft möglicherweise über enzymatische Kondensation des Pyrrolin-5-carboxylats an die Aminogruppe der Lysin-Seitenkette einer entsprechend aminoacylierten tRNA^{Pyl}. Alternativ könnte tRNA^{Pyl} mit dem fertigen Pyrrolysin beladen werden. Beide Wege würden direkte Translation des UAG-Codons als Pyrrolysin im ribosomalen Polypeptidketten-Wachstum erlauben,

aber für keinen von beiden ist bisher ein Enzym identifiziert. Würden beide Wege nebeneinander vorliegen, wären zwei Enzyme notwendig, und Pyrrolysin würde mit Lysin als Substrat für PylS konkurrieren. Krzycki et al. favorisieren die Pyl-Synthese am tRNA-Molekül.

Eine deutliche Analogie zwischen Pyrrolysin und Selenocystein ergibt sich, weil beide durch generelle Stoppcodons codiert werden. Außerdem sind für Pyrrolysin und Selenocystein „ungegewöhnliche“ tRNAs beteiligt, die strukturell von der vorhergesagten Sekundärstruktur abweichen.^[19]

Es sollte beachtet werden, dass ein Überlesen des „Stoppcodons“ für Selenocystein nur möglich ist durch die spezielle Sequenz und strukturelle Organisation der zugehörigen mRNA, die es erlaubt, zwei getrennte offene Leseraster kontinuierlich zu interpretieren. Natürlich wird nur diese spezielle Kategorie von Stoppcodons die Polypeptid-Elongation nicht unterbrechen.^[20] Der gleiche Mechanismus kann für Pyrrolysin angenommen werden.

Abweichungen vom Standardcode

Durch Variation beim Ablesen kann die genetisch codierte Information zu verschiedenen Produkten führen. Dies geschieht durch das Zusammenwirken einer spezifischen tRNA, der zugehörigen Aminoacyl-tRNA-Synthetase und spezieller mRNA-Strukturen. Vor der Translation können Modifikationen an Aminosäuren auf zwei Wegen eingeführt werden.

1. Anstelle der direkten Aminoacylierung der tRNA mit einer neuen Aminosäure kann eine Standardamino-säure auf die tRNA geladen und dort enzymatisch modifiziert werden. Letzteres wird für Selenocysteinyl-tRNA beschrieben: Nach Aminoacylierung mit Serin erfolgt dessen Umwandlung zu Selenocystein.^[21] Nach obigen Kriterien für Sec und Pyl sollte auch Formylmethionin (fMet) als codierte Aminosäure betrachtet werden, was die Anzahl der codierten Aminosäuren auf mindestens 23 erhöht: Sein AUG-Codon wird wegen der davor liegenden

Shine-Dalgarno-Sequenz als Startsignal der bakteriellen Polypeptidsynthese erkannt. Dieses Codon wird ausschließlich mit tRNA^{fMet} abgelesen, die vor der Translation mit Methionin beladen und formyliert wird (fMet-tRNA^{fMet}). Methionine auf anderen tRNAs (Met-tRNA^{Met}), die nicht die Startposition definieren, können nicht formyliert werden. Außer Sec, Pyl und fMet werden in manchen Fällen auch Standardamino-säuren an der tRNA synthetisiert. So kann das Amid der Seitenkette von Asn oder Gln auf der tRNA aus der entsprechenden Säure (Asp, Glu) gebildet werden.^[21]

2. In manchen Organismen oder Organellen werden einige Codons neu zugeordnet: Der genetische Code wird abgewandelt und jede mRNA gemäß dem neuen Code abgelesen. In Mitochondrien gilt beispielsweise ein anderer Code als im Zellkern. Beim Menschen und anderen Säugern steht UGA im Kern für Stopp, in Mitochondrien für Trp. Beispiele für weitere Spezies^[22] sind in Datenbanken abgelegt.^[23]

RNA und konvergente Evolution

Es könnte das Relikt einer RNA-Welt sein, dass RNA nicht nur an der Translation, sondern auch an der Aminosäuresynthese beteiligt ist. Das Vorkommen von Sec in allen Reichen und von fMet in allen Bakterien spricht für einen frühen Ursprung. Das Substrat für die Methylamin-Methyltransferasen war wahrscheinlich schon in der Uruppe vorhanden. Auch der Methylacceptor, ein Corrinoide, könnte schon durch präbiotische Reaktionen gebildet worden sein.^[24]

Die meisten der 20 Standardamino-säuren haben degenerierte Codons. Die vier Triplets für Alanin beispielsweise könnten aus einem Satz ähnlicher Aminosäuren hervorgegangen sein. Unter den kleinen aliphatischen L-Aminosäuren (bis C₃) fehlen heute nur die geradkettigen 2-Aminobutan- und -pentansäure, die als Helixbildner (ähnlich dem Alanin) redundant sein mögen.

Struktur und Funktion sollten die Beibehaltung einer Aminosäure im

Laufe der Evolution begründen, und in der Tat sind Sec und Pyl katalytische Reste. Die Verkleinerung des Aminosäuresatzes bot jedoch den evolutionären Vorteil effizienterer Stoffwechselwege. Wir sehen daher die gut 20 Aminosäuren von heute nicht als einen erweiterten, sondern als einen reduzierten Satz an, wobei die Sequenzierung verschiedener Genome und deren Proteomanalyse weitere Relikte zu Tage fördern könnten.

Zugang zu einem erweiterten Aminosäuresatz

Spezielle tRNAs und Aminoacyl-tRNA-Synthetasen ermöglichen eine Neuinterpretation der DNA-codierten Information. Die Biotechnologie könnte dies als allgemeinen Zugang zu Proteinen nutzen, die außer den 20 üblichen Aminosäuren solche mit neuen physikalischen, strukturellen und chemischen Eigenschaften enthalten.

Mit der Proteinsynthese-Maschinerie von *Escherichia coli* können auch nichtproteinogene Aminosäuren eingeführt werden. In Mutanten, die tRNA^{Val} mit Cystein statt Valin beladen, können 20% des Valins in zellulären Proteinen durch 2-Aminobutansäure ersetzt werden. 2-Aminobutansäure ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, die sterisch dem Cystein entspricht.^[25] Modifizierte Paare von tRNA und Aminoacyl-tRNA-Synthetase bauen in vivo O-Methyl- oder O-Allyl-L-tyrosin an der Position eines Amber-Stoppcodons in Enzyme ein.^[26]

Auch der Transfer eines Gens in einen fremden Organismus kann Änderungen, z.B. geringe Translationseffizienz, bewirken, da manche Codons und ihre tRNAs dort selten sind. Diese wenig genutzten Codons unterstützen die Hypothese, dass früher mehr als 23 Aminosäuren durch eigene Codons codiert wurden.

Genetische Variabilität auf verschiedenen Ebenen

Während beim Menschen die Chromosomenkombination XY oder XX das Geschlecht bestimmt (männlich bzw. weiblich), geschieht dies bei manchen

Wanzen nur über das X-Chromosom: Weibchen haben zwei (XX), Männchen nur eines (X0). Bei Schmetterlingen, manchen Fischen, Amphibien, Reptilien und Vögeln sind die Weibchen heterogametisch (WZ) und die Männchen homogametisch (ZZ).^[27]

Es können also nicht nur Wörter (Codons) der genetischen Information unterschiedlich interpretiert werden, auch ganze Bücher (Chromosomen) der Bibliothek (Genom) werden unterschiedlich genutzt. Nicht nur die genetische Information (DNA-Sequenz) selbst, sondern auch die Biochemie des Leseorgans (mRNA, tRNA, Synthetase, Ribosom) bestimmen Sequenz und biologische Funktion der Genprodukte.

- [1] G. Srinivasan, C. M. James, J. A. Krzycki, *Science* **2002**, 296, 1459–1462.
- [2] B. Hao, W. Gong, T. K. Ferguson, C. M. James, J. A. Krzycki, M. K. Chan, *Science* **2002**, 296, 1462–1466.
- [3] D. W. Banner, A. C. Bloomer, G. A. Petsko, D. C. Phillips, C. I. Pogson, I. A. Wilson, P. H. Corran, A. J. Furth, J. D. Milman, R. E. Offord, J. D. Priddle, S. G. Waley, *Nature* **1975**, 255, 609–614.
- [4] C. A. Orengo, A. D. Michie, S. Jones, D. T. Jones, M. B. Swindells, J. M. Thornton, *Structure* **1997**, 5, 1093–1108.
- [5] T. Doukov, J. Seravalli, J. J. Stezowski, S. W. Ragsdale, *Structure* **2000**, 8, 817–830.
- [6] J. Masuda, N. Shibata, Y. Morimoto, T. Toraya, N. Yasuoka, *Structure* **2000**, 8, 775–788.
- [7] F. Mancia, N. H. Keep, A. Nakagawa, P. F. Leadlay, S. McSweeney, B. Rasmussen, P. Bock, O. Diat, P. R. Evans, *Structure* **1996**, 4, 339–350.
- [8] R. Reitzer, K. Gruber, G. Jögl, U. G. Wagner, H. Bothe, W. Buckel, C. Kratky, *Structure* **1999**, 7, 891–902.
- [9] G. C. Barrett in *Amino acid derivatives: a practical approach* (Hrsg.: G. C. Barrett), Oxford University Press, New York, **1999**, S. 15–30.
- [10] J. F. Atkins, A. Böck, S. Matsufuji, R. F. Gesteland in *The RNA World* (Hrsg.: R. F. Gesteland, T. R. Cech, J. F. Atkins), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **1999**, S. 637–673.
- [11] A. Böck, K. Forchhammer, J. Heider, W. Leinfelder, G. Sawers, B. Veprek, F. Zinoni, *Mol. Microbiol.* **1991**, 5, 515–520.
- [12] M. Rother, R. Wilting, S. Commans, A. Böck, *J. Mol. Biol.* **2000**, 299, 351–358.

- [13] M. J. Berry, R. M. Tujebajeva, P. R. Copeland, X. M. Xu, B. A. Carlson, G. W. Martin III, S. C. Low, J. B. Mansell, E. Grundner-Culemann, J. W. Harney, D. M. Driscoll, D. L. Hatfield, *Biofactors* **2001**, 14, 17–24.
- [14] I. Chambers, J. Frampton, P. Goldfarb, N. Affara, W. McBain, P. R. Harrison, *EMBO J.* **1986**, 5, 1221–1227.
- [15] F. Zinoni, J. Heider, A Böck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 4660–4664.
- [16] L. Paul, D. J. Ferguson, J. A. Krzycki, *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 2520–2529.
- [17] D. Moras, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, 17, 159–164.
- [18] M. Ibba, S. Morgan, A. W. Curnow, D. R. Pridmore, U. C. Vothknecht, W. Gardner, W. Lin, C. R. Woese, D. Söll, *Science* **1997**, 278, 1119–1122.
- [19] S. Commans, A. Böck, *FEMS Microbiol. Rev.* **1999**, 23, 335–351.
- [20] R. F. Gesteland, J. F. Atkins, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 741–768.
- [21] M. Ibba, D. Söll, *EMBO Rep.* **2001**, 2, 382–387.
- [22] S. Osawa in *Evolution of the Genetic Code*, Oxford University Press, Oxford, **1995**.
- [23] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Utils/wprintgc.cgi?mode=c>.
- [24] G. Ksander, G. Bold, R. Lattmann, C. Lehmann, T. Früh, Y.-B. Xiang, K. Inomata, H.-P. Buser, J. Schreiber, E. Zass, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1987**, 70, 1115–1172.
- [25] V. Döring, H. D. Mootz, L. A. Nangle, T. L. Hendrickson, V. de Crécy-Lagard, P. Schimmel, P. Marlière, *Science* **2001**, 292, 501–504.
- [26] a) L. Wang, A. Brock, B. Herberich, P. G. Schultz, *Science* **2001**, 292, 498–500; b) Z. Zhang, L. Wang, A. Brock, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2964–2966; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2840–2842.
- [27] Rolf Siewing, *Lehrbuch der Zoologie, Bd. 1, Allgemeine Zoologie*, Gustav Fischer, Stuttgart, **1980**, S. 297.