



Leichte Neucodierung von Selenocystein in der Natur

Takahito Mukai, Markus Englert, H. James Tripp, Corwin Miller, Natalia N. Ivanova, Edward M. Rubin, Nikos C. Kyrpides und Dieter Söll*

Abstract: Selenocystein (Sec oder U) wird durch Neuordnung des Stopp-Codons UGA durch einen Sec-spezifischen Elongationsfaktor und eine charakteristische RNA-Struktur codiert. Um mögliche Codonvariationen zu finden, analysierten wir 6.4 Billionen Basenpaare metagenomischer Daten sowie 24903 mikrobielle Genome für tRNA^{Sec}-Spezies. UGA ist erwartungsgemäß das vorherrschende Codon für Sec, allerdings finden wir auch tRNA^{Sec}-Spezies, die die Stopp-Codons UAG und UAA erkennen, sowie weitere zehn Sense-Codons. Die Synthese von Selenoproteinen durch UAG in *Geodermatophilus* und *Blastococcus* sowie durch das Cys-Codon UGA in *Aeromonas salmonicida* konnte durch metabolische Markierung mit ⁷⁵Se oder Massenspektrometrie bestätigt werden. Weitere tRNA^{Sec}-Spezies mit verschiedenen Anticodons ermöglichten es *Escherichia coli*, die aktive Form des Selenoproteins Formiatdehydrogenase H zu synthetisieren. Der genetische Code ist damit bedeutend flexibler, als bisher angenommen.

Das Spurenelement Selen findet sich in zellulären Proteinen als Bestandteil der 21. Aminosäure Selenocystein wieder. In dieser ist die Thiolgruppe des Cysteins durch eine Selenolgruppe ersetzt.^[1] Obwohl so genannte Selenoproteine in allen drei Domänen des Lebens^[2] zu finden und sogar in Säugtieren essenziell sind,^[3] enthalten Pflanzen und Pilze kein Sec. Diese Aminosäure ist ein essenzieller Teil des aktiven Zentrums vieler Redox-Enzyme.^[4] Während der Translation von Selenoprotein-codierender mRNA wird das traditionelle Stopp-Codon UGA^[5] durch die spezifische Interaktion mit dem Elongationsfaktor SelB (in Bakterien) und einer spezifischen mRNA-Sequenz umprogrammiert.^[5,6] Vor kurzem ist es einer Forschergruppe als Teil einer synthetisch-biologischen Studie gelungen, in *E. coli* eine Vielzahl von Sense- und Stopp-Codons Sec zuzuordnen.^[7] Zudem konnte sie demonstrieren, dass diese Veränderungen des genetischen Codes toleriert werden. Diese Beobachtung führt zu der Frage, ob diese Abweichungen von der standardmäßigen Zuordnung von UGA zu Sec möglicherweise auch natürlich vorkommen.

Bei einer Computer-basierten Suche innerhalb mehrerer Billionen Basenpaare metagenomischer Daten konnte eine große Anzahl von umprogrammierten Stopp-Codons in Bakterien und Bakteriophagen identifiziert werden.^[8] Dies veranlasste uns dazu, eine umfassende Suche durch verfügbare metagenomische und mikrobielle Genome nach Anticodon-Varianten der typischen tRNA^{Sec}_{UCA}, der längsten tRNA^[9] mit einer untypischen Tertiärstruktur,^[10] durchzuführen. Eine BLAST-Suche der tRNADB-CE-Datenbank^[11] identifizierte vier tRNA^{Sec}_{CUA}-Sequenzen, was dafür spricht, dass diese das UAG-Codon erkennen. Eine Durchmusterung aller öffentlich zugänglichen mikrobiellen Genome des National Center for Biotechnology Information (NCBI) und aller assemblierten metagenomischen Daten des Integrated Microbial Genomes (IMG) Systems^[12] führte zu einer tRNA^{Sec}_{GCA}-Gruppe, die möglicherweise das UGC-Codon erkennt. Weiterführend entwickelten wir ein generelles Computer-basiertes System, das 6.4 Tb nicht assemblierter kurzer Sequenzen und 180 Gb assemblierter Contigs (> 2 kb) sowie 24903 mikrobielle Genome des IMG durchsuchte (Abbildung 1 A). Die erhaltenen Ergebnisse bestätigten, dass UGA das vorherrschende Sec-Codon ist. Zusätzlich sind zwölf verschiedene tRNA^{Sec}-Anticodonvarianten in der Lage, die Stopp-Codons UAG und UAA zu erkennen, und weitere zehn Sense-Codons konnten bestimmt werden (Abbildung 1 A). Zusätzliche Sequenzvalidierungen bestätigten, dass diese tRNA^{Sec}-Varianten keine Sequenzierungsartefakte sind (siehe Hintergrundinformationen).

Wir gruppieren diese nichtkanonischen tRNA-Spezies nach der Art des Anticodons, ihrer Sequenz und strukturellen Gemeinsamkeiten (Abbildung 1 A und Hintergrundinformationen). Die größte Gruppe (Anticodon CUA) enthält 366 nahezu identische tRNA^{Sec}-Sequenzen der actinobakteriellen *Geodermatophilaceae*-Familie (Abbildung 1 A, B, links),^[13] während die anderen drei tRNA^{Sec}_{CUA}-Spezies von Rhizosphären-bakteriellem Ursprung sind. Die tRNA^{Sec}_{CUA}-Spezies machten 3 % der tRNA^{Sec}-Spezies in der Boden-Metagenomprobe 3300001205 aus.

Die nächste Gruppe enthält tRNA^{Sec}-Spezies (mit dem Anticodon GCA, das Cys codieren kann) der Beta-proteobakterien und Darmsymbionten von Termiten (Abbildung 1 A; Abbildung S3 der Hintergrundinformationen). Zwei *Aeromonas-salmonicida*-Genome enthalten eine tRNA^{Sec}_{ACA}, die das UGU-Cys-Codon decodieren kann. Die anderen 16 Mitglieder dieser Gruppe stammen aus Chloroflexi (Abbildung S4) und marinen Bakterien (Abbildung S5). Die beiden tRNA^{Sec}_{UUU/CUU} (erkennen AAA/AAG-Lys-Codons) stammen wahrscheinlich von Solirubrobacterales (Abbildung S6). Zusätzliche tRNA^{Sec}-Varianten, die in der Lage sind, das Stopp-Codon UAA und die sechs Sense-Codons (CGA, AGA, GGA, UUA, UCA,

[*] Dr. T. Mukai, Dr. M. Englert, Dr. C. Miller, Prof. D. Söll
Department of Molecular Biophysics and Biochemistry
Yale University
New Haven, CT 06520 (USA)
E-Mail: dieter.soll@yale.edu

Prof. D. Söll
Department of Chemistry, Yale University
New Haven, CT 06520 (USA)

Dr. H. J. Tripp, Dr. N. N. Ivanova, Dr. E. M. Rubin, Dr. N. C. Kyrpides
Department of Energy Joint Genome Institute (DOE JGI)
Walnut Creek, CA 94598 (USA)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201511657> zu finden.

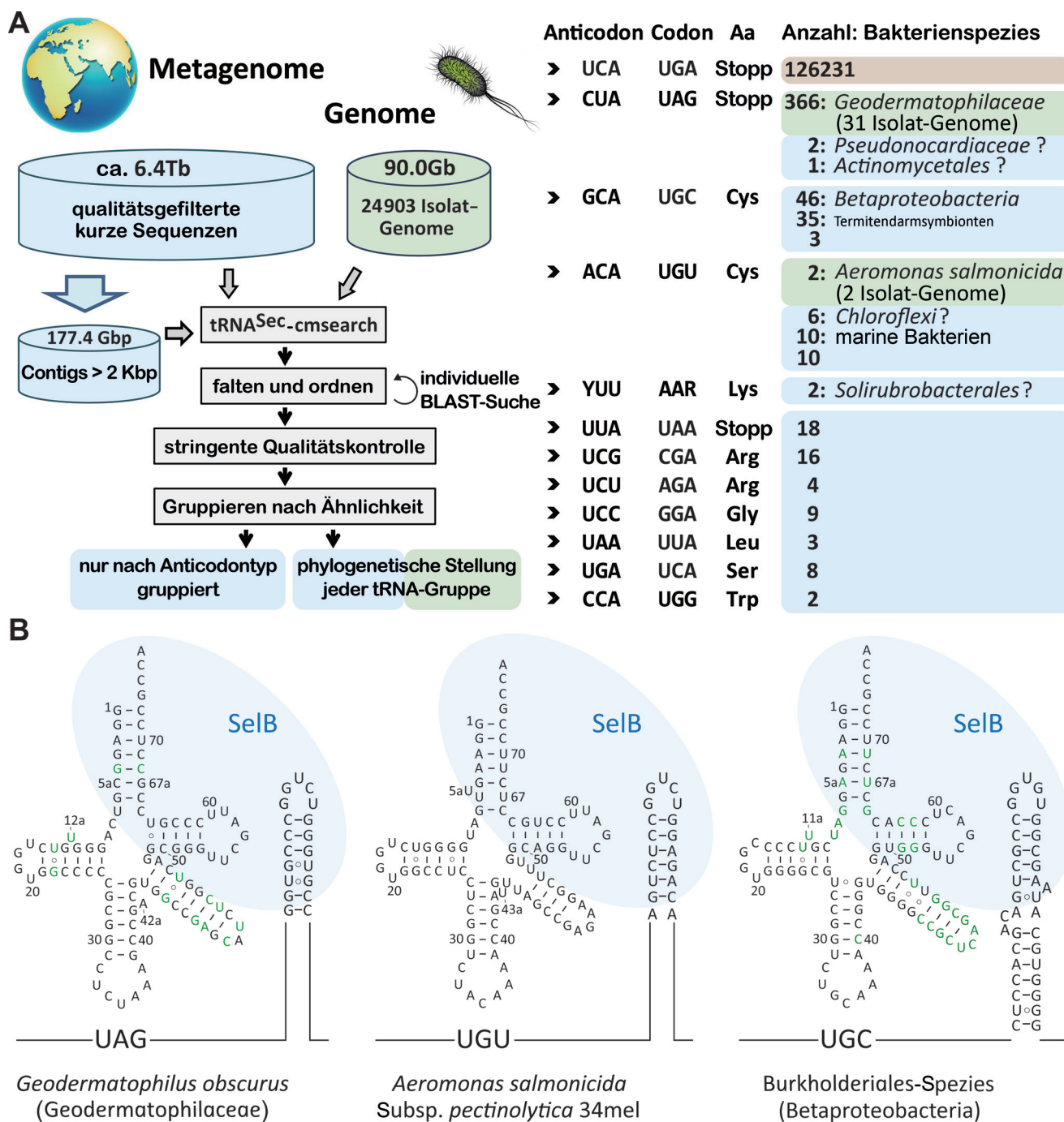


Abbildung 1. Nichtkanonische Zuordnung von Selenocystein in der Natur. A) Der Computer-basierte tRNA^{Sec}-Suchprozess und manuell geordnete Ergebnisse. Die nichtkanonischen tRNA^{Sec}-Sequenzen sind durch ihre Codon-Erfassung gruppiert; deren Anzahl und vermutlicher bakterieller Ursprung sind angezeigt. Ergebnisse aus Gesamtgenomen sind grün markiert. Blau markierte Ergebnisse repräsentieren metagenomische Daten. Zum Vergleich ist die Anzahl kanonischer tRNA^{Sec}-Sequenzen gezeigt (Die meisten von ihnen wurden nicht geordnet). „Y“ steht für „C oder U“ und „R“ für „A oder G“. B) Abgeleitete Kleeblattstrukturen der nichtkanonischen tRNA^{Sec}-Spezies. Nucleotidpolymorphismen der gleichen tRNA^{Sec}-Gruppe sind durch grüne Buchstaben markiert. Die Sec-Codons und SECIS-Elemente der Formiatdehydrogenase-mRNA sind auch gezeigt.

UGG) zu erkennen, wurden ebenfalls identifiziert (Abbildung S7).

Als nächstes wollten wir das Codierungspotenzial dieser nichtkanonischen tRNA^{Sec}-Spezies bestätigen. Die Selenoproteinsynthese lässt sich durch drei Strategien überprüfen: 1) Metabolische Markierung der Organismen mit ⁷⁵Se;

- 2) Ersetzen von Teilen der *E.-coli*-Selenoproteinsynthesemaschinerie durch Gene und tRNA^{Sec}, die wir in den genomischen und metagenomischen Daten identifiziert haben;
- 3) Ersetzen der *E.-coli*-tRNA^{Sec} durch die neu identifizierten tRNA^{Sec}-Spezies.

Die beiden letzten Strategien nutzen die Synthese der *E. coli*-Formiatdehydrogenase H (FDH_H, codiert durch das *fdhF*-Gen) als Reporter.^[7]

Um den UAG-bestimmten Einbau von Sec zu bestätigen, ließen wir Zellen von *Geodermatophilus obscurus* G-20 und *Blastococcus saxobsidens* in Gegenwart von [⁷⁵Se]Selenit wachsen und konnten in der Folge radioaktiv markierte Selenoproteine mit einer Größe von 140 und 50 kDa detektieren. Die Genomsequenzen dieser Organismen sagen das Vorhandensein von Formiatdehydrogenasen (FDHs) (Abbildung S8, Tabellen S1, S2) und UGSC-Motiv-Proteinen^[14] (Abbildungen S1, S8, Tabelle S3) voraus. Zusammengefasst war dies der erste Hinweis auf eine UAG-Umcodierung durch

Sec, die zur erwarteten Synthese von FDH (FdxG) und den UGSC-Motiv-Proteinen führt. Die Zellextrakte wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine der Größe von 140 und 50 kDa aus dem Gel ausgeschnitten, trypsinisiert und durch Flüssigkeitschromatographie mit gekoppelter Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) analysiert. Das 140-kDa-Gelstück enthielt Vollängen-FdxG. Das 50-kDa-Gelstück von *G. obscurus* enthielt ein UGSC-Motiv-Protein (Abbildung 2 A; Tabelle S4).

Vergleichbar mit *E. coli* codiert das *G. obscurus*-Genom^[13b] die Gene *selA*, *selB*, *selC* und *selD* der Sec-Einbaumaschinerie. In Bakterien produziert SelD den Se-Donor Selenphosphat, SelA überführt Ser-tRNA^{Sec} (die tRNA ist

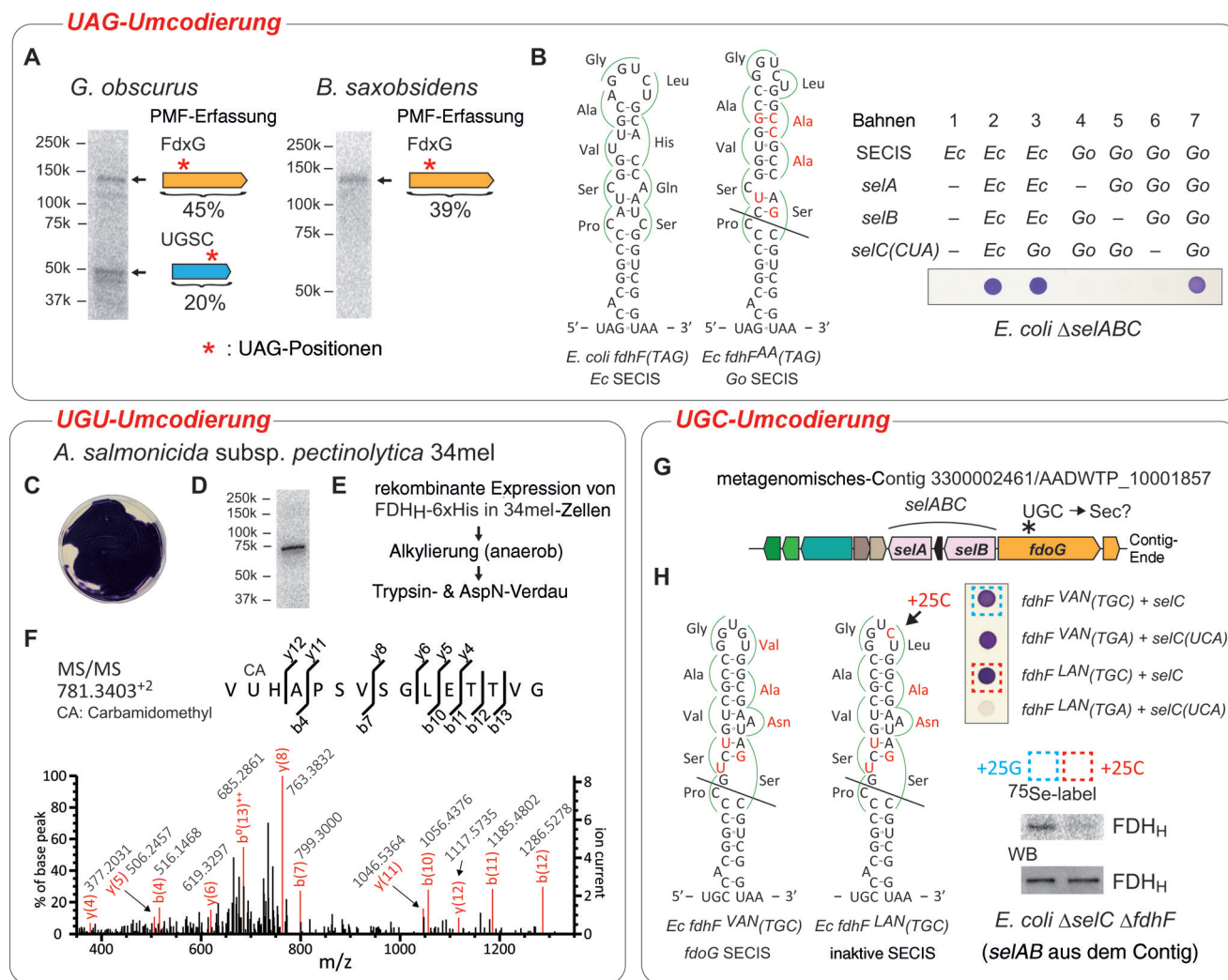


Abbildung 2. Umcodierung von UAG- und Cystein-Codons zu Selenocystein. A) Metabolische Markierung von *G. obscurus*- und *B. saxobsidens*-Zellen mit ⁷⁵Se. Zellextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, und ihre mutmaßlichen Selenoproteine wurden durch die Analyse mit PhosphorImager visualisiert. Die Ergebnisse der Peptidmassen-Fingerprinting (PMF)-Analyse der aus dem Gel ausgeschnittenen Proteinbanden sind rechts von den Banden gezeigt. B) FDH_H-Expression in *E. coli* Δ*selABC* Δ*fdhF*-Zellen, komplementiert mit den *G. obscurus*-*selABC*-Genen und der chimären *fdhF*(140TAG)-Variante, die ein *G. obscurus*-SECIS-Element mit einigen Nucleotidmodifikationen (gezeigt in Rot) enthält. Die *selC*(CUA)-Gene exprimieren tRNA^{Sec}_{CUA}. Das exprimierte Selenoprotein FDH_H reduziert Benzylviologen, was zu einer Farbveränderung nach Violett führt. C) FDH_H-Aktivität von 34mel-Zellen aus *A. salmonicida* Subsp. *pectinolytica*. D) Metabolische Markierung von 34mel mit ⁷⁵Se. E) Prozedur der Probenpräparation für die LC-MS/MS-Analyse des FDH_H-Selenoproteins. F) PMF bestätigt den Sec-Einbau an Codon 140 in rekombinanter FDH_H. G) tRNA^{Sec}_{CUA}-Gen(*selC*)-Locus eines metagenomischen Contigs. H) Test der FDH_H-Aktivität in vivo in *E. coli* Δ*selABC* Δ*fdhF*-Zellen, die durch die *selABC*-Gene des metagenomischen Contigs und durch das chimäre *fdhF*(140TGC)-Gen, welches das SECIS-Element des Contigs enthält, komplementiert wurden. Die beiden transformierten Stämme (eingerahmt) wurden metabolisch mit ⁷⁵Se markiert und die radioaktiven FDH_H-Proteine durch SDS-PAGE und Autoradiographie oder Western Blotting (WB) analysiert.

das Produkt des *selC*-Gens) in Sec-tRNA^{Sec}, und SelB bringt die Sec-tRNA^{Sec} abhängig von der Selenocystein-Insertionssequenz (SECIS) zum Ribosom. Um die Funktionalität von SelA, SelB und SelC zu testen, komplementierten wir den *E. coli*- Δ *selABC*- Δ *fdhF*-Stamm ME6 mit den *G. obscurus*-*selABC*-Genen. Das Produkt des *E. coli*-Gens *fdhF* ist das Selenoprotein FDH_H (Tabelle S1), das für seine Aktivität Sec an der Position 140 benötigt.^[15] Das Ersetzen von Sec durch Cys führt zu einer 300-fachen Verringerung der FDH_H-Aktivität.^[16] Katalytisch aktive FDH_H lässt sich leicht durch die Reduktion von Benzylviologen identifizieren, was zu einer violetten Verfärbung führt.^[17] Als Reporter nutzen wir eine *E. coli*-*fdhF*-Variante mit einem UAG-Codon in Position 140 und einem *G. obscurus*-SECIS-Element. Dies führte zu einer FDH_H-Variante mit zwei veränderten Aminosäuren (Abbildung 2B). Dieses Reportergen wurde in das pRSF-Plasmid kloniert und in den ME6-Stamm transformiert. Die Expression der *G. obscurus*-*selABC*-Gene in diesem veränderten Stamm produziert die aktive FDH_H (Abbildung 2B). Diese Daten bestätigen, dass das UAG₁₄₀-Codon in dieser *E. coli*-FDH_H-Variante Sec neu zugeordnet wurde.

UGU(Cys)-Neuzuordnung in *Aeromonas salmonicida* Subsp. *pectinolytica* 34mel,^[18] einem Stamm der γ -proteobakterium-*A. salmonicida*-Subspezies, konnte bereits bestätigt werden. Im Unterschied zu anderen *Aeromonas*-Spezies paaren die *pectinolytica*-Subspezies und der Stamm Y577^[19] die tRNA^{Sec}_{ACA} mit dem UGU-Cys-Codon in *fdhF*. Die anaerobe metabolische Markierung von *pectinolytica*-Zellen mit ⁷⁵Se führte, zusätzlich deren In-vivo-FDH-Aktivität (Abbildung 2C), zu radioaktiver FDH_H (Abbildung 2D). Wir bestätigten durch Überexpression von einem Plasmid und LC-MS/MS-Analyse (Abbildung 2E, Tabelle S4) den UGU₁₄₀-vermittelten Sec-Einbau in FDH_H. Das detektierte Selenopeptid (LC-Retentionszeit 24.82 min) hat die korrekte Masse (Abbildung S9) und das zu erwartende sekundäre Fragmentierungsschema (Abbildung 2F). Die coeluiierenden Cys- und Sec-Peptide konnten anhand ihrer verschiedenen Massen mit Ionenintensitäten von ca. 100:1 unterschieden und detektiert werden (Abbildung S9A). In Proteinproben von *pectinolytica*-Zellen, die eine *fdhF*-Variante exprimieren, der das SECIS-Element fehlt, konnten keine Massenpeaks von Sec-Peptiden nachgewiesen werden (Tabelle S4). Diese Daten zeigen, dass in *A. pectinolytica* 34mel das Cys₁₄₀-Codon des *fdhF*-Gens SECIS-abhängig als Sec translatiert wird.

Die UGC-Neuzuordnung von Cys zu Sec durch tRNA^{Sec}_{GCA} ist möglicherweise ein typisches Merkmal von Burkholderiales. In langen metagenomischen Contigs von Burkholderiales ist das *selC*-Gen flankiert von den Genen *selB* und *selA*. Das *selABC*-Operon befindet sich neben dem Formiatdehydrogenase-Gen (*fdoG*), an dessen UGC-Cys-Codon im aktiven Zentrum sich ein putatives SECIS-Motiv anschließt. Der *E. coli*- Δ *selABC*-Stamm wurde durch die Burkholderiales-*selAB*- und *selC*-opal-Contig-Varianten sowie die *E. coli*-*fdhF*-Variante, die das Burkholderiales-SECIS-Element-Contig enthält, komplementiert (Abbildungen 1 B, rechts, und 2 G). Dieser Stamm produzierte die aktive Form der FDH_H (violette Farbe; Abbildung 2H, zweite Reihe). Im Falle eines inaktiven SECIS-Elements, das eine G25C-Mutation enthielt, konnte keine FDH_H-Aktivität

nachgewiesen werden, und die Zellen blieben farblos (Abbildung 2H, Reihe 4). Wir veränderten in Kombination mit dem Burkholderiales-*selC*-Contig das UGA₁₄₀-Codon zu UGC für die chimären *fdhF*-Varianten, die entweder ein aktives oder ein inaktives SECIS-Element enthielten. Da das FDH_H-Cys₁₄₀-Enzym eine klare Farbveränderung nach Violett zeigte (Abbildung 2H, Reihen 1 und 3), bestätigten wir das funktionelle SECIS-Element durch ⁷⁵Se-Markierung (Abbildung 2H). Diese Daten zeigen, dass die Burkholderiales-Contigs *selA* und *selB*, tRNA^{Sec}_{GCA} sowie das SECIS-Element das UGC-Codon in *E. coli* neu zuordnen können.

Wir testeten auch die metagenomischen tRNA^{Sec}-Varianten, die andere Stopp- und Sense-Codons erkennen, bezüglich einer Sec-Neuzuordnung. Wir wählten eine repräsentative metagenomische tRNA^{Sec}-Spezies für jedes Anticodon und exprimierten diese zusammen mit *E. coli*-*fdhF*-Varianten mit dem entsprechenden kognaten Codon an Position 140 im *E. coli*- Δ *selC*- Δ *fdhF*-Stamm.^[7] Überraschenderweise führten alle getesteten tRNA^{Sec}-Spezies, bis auf tRNA^{Sec}_{UCC}, zur Neuordnung der betreffenden Codons zu Sec, was wir durch ihr Potenzial zur Produktion einer aktiven FDH_H-Form in *E. coli*-Zellen demonstrieren konnten. Es sollte erwähnt werden, dass die Neuordnung von GGA in unseren früheren Sec-Studien nur schlecht funktioniert hatte.^[7] Diese verschiedenen Effizienzen sind möglicherweise auf Veränderungen der idealen SECIS-Element Struktur durch das Upstream-Codon zurückzuführen.^[20] Auf Grundlage dieser Befunde glauben wir, dass diese tRNA^{Sec}-Spezies möglicherweise dazu genutzt werden, Sense-Codons in ihren ursprünglichen Organismen neu zuzuordnen.

Wie sieht dies in eukaryotischen Organismen aus? Wir haben zwar neun tRNA^{Sec}-Varianten in Algen gefunden (zwei sind in Abbildung S7 dargestellt), jedoch erfordern sie noch eine weitere Validierung, da sie fast identisch mit kanonischen tRNA^{Sec}-Spezies sind. Bei einer ähnlichen Durchmusterung von 92 Säugetiergenomem (215 Gb) sowie vom Genom von *Drosophila melanogaster* (139 Mbp) konnte keine Ausnahme für UGA als Sec-Codon gefunden werden. Daher ist weiter zu untersuchen, ob dieser Befund damit zusammenhängt, dass Selenoproteine essenziell in Redox-Signalwegen sind^[21] oder für ein hochentwickeltes Backup-System zur Verfügung stehen.^[22] Allerdings agiert UGA sowohl als Cys- wie auch als SECIS-abhängiges Sec-Codon im niederen Eukaryoten *Euplotes crassus*.^[23]

Bisher konnte keine natürlich vorkommende Neuordnung von Sense-Codons in Bakterien beobachtet werden. Von mitochondrialen Genomen ist jedoch bekannt, dass Codons, die ihre ursprüngliche Zuordnung verloren haben, andere Aminosäuren insertieren.^[24] Der hier beschriebene Fall ist anders; die Sec-Insertion wird durch ein SECIS-Element vermittelt und führt dadurch zu einer dualen Nutzung des gleichen Codons für eine andere Aminosäure (durch Paarung mit tRNA^{Sec}-Varianten, die das richtige Anticodon enthalten).

Was könnte für die leichte natürliche Neuordnung von Sec verantwortlich sein? Der Einbau von Sec weicht deutlich von dem anderer Aminosäuren ab und wird durch ein eigenes, orthogonales System ermöglicht,^[5] das aus einem anderen Elongationsfaktor (SelB), einem benötigten SECIS-

RNA-Element, einer strukturell ungewöhnlichen tRNA (tRNA^{Sec}),^[10] dem dualen Stopp-Codon (UGA) und dem Release-Faktor 2 (RF2) besteht. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass die Sec-Neuzuordnung möglicherweise keine generellen Auswirkungen auf die Proteintranslationsmaschinerie hat, wie man dies für die Neuzuordnung von kanonischen Sense-Codons annehmen könnte.^[25] Die leichte Neuzuordnung von Cys zu Sec ist möglicherweise eine Konsequenz aus der Kombination von oft wünschenswerten Eigenschaften von Selenenzymen und Selenoproteinen, wie neue Redox-Funktionen oder erhöhte Enzymaktivität,^[4,26] wobei die Möglichkeit erhalten bleiben soll, die Cys-Proteine und -Enzyme weiter normal zu exprimieren. Unsere Studien der natürlichen Sec-Neuzuordnung sprechen für die mögliche Existenz anderer Codierungsschemata und bekräftigen die Einschränkungen von vorhandenen, Computer-basierten Programmen zur Vorhersage von Selenoproteinen aus Genomsequenzen, da diese Algorithmen auf UGA als einzigem Sec-Codon beruhen.

Unsere Studie liefert neue Belege für eine begrenzte, aber eindeutige Formbarkeit des genetischen Codes, dessen Geheimnisse immer noch in den unsequenzierten Organismen verborgen liegen.

Danksagung

Wir danken Andreas Brune, Filipa Gody-Vitorino, Hans-Peter Klenk, Ryan Lynch, Katherine McMahon, Daniel Marcus, William Mohn, Len Pennacchio und Ameet Pinto für die Erlaubnis, unveröffentlichte Sequenzdaten zu verwenden, die durch das DOE-JGI's Community Sequencing Program produziert wurden. Weiterhin danken wir Hans Aerni, Patrick O'Donoghue, Jean Kanyo, Jiqiang Ling, Jesse Rinehart und Oscar Vargas-Rodriguez für Diskussionen und praktische Ratschläge sowie Daniel Drell und Robert Stack für Ermutigung. Diese Arbeit wurde unterstützt vom NIGMS (GM22854 an D.S.) und der CSGB Division, Office of Basic Energy Sciences of the Department of Energy (DE-FG02-98ER20311 an D.S.; zur Förderung der genetischen Experimente). Die Arbeiten im U.S. Department of Energy Joint Genome Institute, a DOE Office of Science User Facility wurden unter der Vertragsnr. DE-AC02-05CH11231 unterstützt.

Stichwörter: Genetischer Code · Metagenom · Selenocystein · Sense-Codon · Synthetische Biologie

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5337–5341
Angew. Chem. **2016**, *128*, 5423–5427

- [1] J. E. Cone, R. M. Del Rio, J. N. Davis, T. C. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 2659–2663.
- [2] A. Ambrogelly, S. Palioura, D. Söll, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 29–35.
- [3] G. V. Kryukov, S. Castellano, S. V. Novoselov, A. V. Lobanov, O. Zehab, R. Guigo, V. N. Gladyshev, *Science* **2003**, *300*, 1439–1443.
- [4] N. Metanis, D. Hilvert, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *18*, 27–34.
- [5] A. Böck, M. Thanbichler, M. Rother, A. Resch in *Aminoacyl-tRNA Synthetases* (Hrsg.: M. Ibba, C. S. Francklyn, S. Cusack), Landes Bioscience, Georgetown, TX, **2005**, S. 320–327.
- [6] J. Heider, C. Baron, A. Böck, *EMBO J.* **1992**, *11*, 3759–3766.
- [7] M. J. Bröcker, J. M. Ho, G. M. Church, D. Söll, P. O'Donoghue, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 319–323; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 325–330.
- [8] N. N. Ivanova, P. Schwientek, H. J. Tripp, C. Rinke, A. Pati, M. Huntemann, A. Visel, T. Woyke, N. C. Kyrpides, E. M. Rubin, *Science* **2014**, *344*, 909–913.
- [9] A. Schön, A. Böck, G. Ott, M. Sprinzl, D. Söll, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 7159–7165.
- [10] a) S. Palioura, R. L. Sherrer, T. A. Steitz, D. Söll, M. Simonovic, *Science* **2009**, *325*, 321–325; b) Y. Itoh, S. Chiba, S. Sekine, S. Yokoyama, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 6259–6268; c) Y. Itoh, S. Sekine, S. Suetsugu, S. Yokoyama, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 6729–6738.
- [11] T. Abe, H. Inokuchi, Y. Yamada, A. Muto, Y. Iwasaki, T. Ikemura, *Front. Genet.* **2014**, *5*, 114, DOI: 10.3389/fgene.2014.00114.
- [12] V. M. Markowitz, I. M. Chen, K. Chu, E. Szeto, K. Palaniappan, M. Pillay, A. Ratner, J. Huang, I. Pagani, S. Tringe, M. Huntemann, K. Billis, N. Varghese, K. Tennessen, K. Mavromatis, A. Pati, N. N. Ivanova, N. C. Kyrpides, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D568–D573.
- [13] a) G. M. Luedemann, *J. Bacteriol.* **1968**, *96*, 1848–1858; b) N. Ivanova et al., *Stand. Genomic Sci.* **2010**, *2*, 158–167.
- [14] Y. Zhang, V. N. Gladyshev, *PLoS Genet.* **2008**, *4*, e1000095.
- [15] F. Zinoni, A. Birkmann, W. Leinfelder, A. Böck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 3156–3160.
- [16] M. J. Axley, A. Böck, T. C. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 8450–8454.
- [17] M. A. Mandrand-Berthelot, M. Y. K. Wee, B. A. Haddock, *FEMS Microbiol. Lett.* **1978**, *4*, 37–40.
- [18] M. E. Pavan, E. E. Pavan, N. I. Lopez, L. Levin, M. J. Pettinari, *Genome Announc.* **2013**, *1*, e00675–00613.
- [19] A. T. Vincent, M. V. Trudel, L. Freschi, V. Nagar, C. Gagne-Thivierge, R. C. Levesque, S. J. Charette, *BMC Genomics* **2016**, *17*, 44.
- [20] S. Yoshizawa, L. Rasubala, T. Ose, D. Kohda, D. Fourmy, K. Maenaka, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 198–203.
- [21] J. Lu, A. Holmgren, *Free Radical Biol. Med.* **2014**, *66*, 75–87.
- [22] a) H. C. Lin, S. C. Ho, Y. Y. Chen, K. H. Khoo, P. H. Hsu, H. C. Yen, *Science* **2015**, *349*, 91–95; b) A. A. Turanov, R. A. Everley, S. Hybsier, K. Renko, L. Schomburg, S. P. Gygi, D. L. Hatfield, V. N. Gladyshev, *PLoS One* **2015**, *10*, e0140353.
- [23] A. A. Turanov, A. V. Lobanov, D. E. Fomenko, H. G. Morrison, M. L. Sogin, L. A. Klobutcher, D. L. Hatfield, V. N. Gladyshev, *Science* **2009**, *323*, 259–261.
- [24] a) S. Yokobori, *Viva Origino* **2014**, *42*, 47–49; b) J. Ling, P. O'Donoghue, D. Söll, *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 707–721.
- [25] a) J. M. Ho, N. M. Reynolds, K. Rivera, M. Connolly, L. T. Guo, J. Ling, D. J. Pappin, G. M. Church, D. Söll, *ACS Synth. Biol.* **2015**, *5*, 163–171; b) T. Mukai, A. Yamaguchi, K. Ohtake, M. Takahashi, A. Hayashi, F. Irahia, S. Kira, T. Yanagisawa, S. Yokoyama, H. Hoshi, T. Kobayashi, K. Sakamoto, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 8111–8122.
- [26] a) J. Beld, K. J. Woycechowsky, D. Hilvert, in *Oxidative Folding of Peptides and Proteins*, The Royal Society of Chemistry, London, **2009**, S. 253–273; b) G. W. Snider, E. Ruggles, N. Khan, R. J. Hondal, *Biochemistry* **2013**, *52*, 5472–5481.

Eingegangen am 15. Dezember 2015
Online veröffentlicht am 15. März 2016