

Identifizierung des Schlüsselenzyms der Roseoflavinbiosynthese

Julia Schwarz⁺, Valentino Konjik⁺, Frank Jankowitsch, Roger Sandhoff und Matthias Mack*

Abstract: Die Bakterienarten *Streptomyces davawensis* und *Streptomyces cinnabarinus* produzieren Roseoflavin, das einzige bekannte natürliche Analogon von Riboflavin (Vitamin B₂) mit antibiotischer Wirkung. Roseoflavin kann als natürlicher Antimetabolit bezeichnet werden und soll aus Riboflavin über das Schlüsselintermediat 8-Demethyl-8-aminoriboflavin (AF) synthetisiert werden. Der ortsspezifische Austausch einer Methylgruppe des Dimethylbenzolrings von Riboflavin gegen eine Aminogruppe (der zu AF führt) ist mechanistisch schwierig. Der Biosyntheseweg von Riboflavin zu AF war unklar, und das/die zugehörige/n Enzym/e war/en unbekannt. Systematische Gendelektions- und -expressionsexperimente sowie biochemische Analysen zeigten jetzt, dass das vom Gen BN159_7989 aus *S. davawensis* kodierte Enzym mehrere chemischer Reaktionen katalysieren kann: Ausgehend von Riboflavin-5'-phosphat bildet BN159_7989 8-Demethyl-8-aminoriboflavin-5'-phosphat.

Vitaminanaloga dienen als Leitstrukturen zur Entwicklung neuartiger Antibiotika und tragen dazu bei, das Arsenal an Antiinfektiva aufzufüllen, was zur Bekämpfung multiresistenter bakterieller Krankheitserreger dringend notwendig ist.^[1] Drei natürliche Vitaminanaloga wurden bisher beschrieben, das Vitamin-B₁-Analogon Bacimethrin,^[2] das Vitamin-B₆-Analogon Ginkgotoxin^[3] und das Vitamin-B₂ (Riboflavin)-Analogon Roseoflavin (RoF).^[4]

Die Gram-positiven Bodenbakterien *Streptomyces davawensis* und *Streptomyces cinnabarinus* sind die einzigen bekannten Lebewesen, die RoF produzieren.^[5] Die bei Mikroorganismen weit verbreiteten Riboflavintransporter vermitteln dabei die effiziente Aufnahme von RoF durch die Zielzellen,^[6] da sie offenbar neben Riboflavin auch RoF als Aufnahmesubstrat akzeptieren.^[6,7] Nach der Aufnahme wandeln Flavokinasen und FAD-Synthetasen, in allen Lebewesen vorhandene Enzyme, RoF in die Flavincofaktoranaloga Roseoflavin-5'-phosphat (RoFP) bzw. Roseoflavinadeninindinucleotid (RoFAD) um.^[1,8] Naheliegende zelluläre Zielmoleküle für RoFP und RoFAD sind Flavoproteine. Diese Proteine sind häufig: 0.1–3.5% der vorhergesagten

Proteine im Proteom bisher vollständig sequenzierter Organismen sind Flavoproteine.^[9] Die Aktivität von Flavoproteinen hängt vom Vorhandensein der Cofaktoren Riboflavin-5'-phosphat und Flavinadeninindinucleotid (FAD) ab. Wenn Flavoproteine statt dieser Cofaktoren RoFP oder RoFAD gebunden haben, sind sie weniger oder gar nicht aktiv.^[8b,10] Riboflavin-5'-phosphat-RNA-Schalter (FMN riboswitches) sind genetische Elemente, die die Riboflavinbiosynthese und den Riboflavintransport regulieren. Diese Schalter sind zusätzliche Zielstrukturen für RoF, denn sie werden in Gegenwart von RoFP abgestellt, was zur Riboflavinauxotrophie führt.^[11]

In früheren Arbeiten zur Biosynthese von RoF wurde vorgeschlagen, dass es aus Riboflavin über 8-Demethyl-8-aminoriboflavin (AF) und 8-Demethyl-8-methylaminoriboflavin (MAF) gebildet wird.^[12] Die Zwischenprodukte AF und MAF wurden durch die Entdeckung des ersten Enzyms der RoF-Biosynthese, der S-Adenosylmethionin(SAM)-abhängigen Dimethyltransferase RosA, bestätigt.^[13] Dieses Enzym bildet RoF aus AF (über MAF; Abbildung 1, Umwandlung von 6 in 8). Das zugehörige Gen *rosA* liegt in einer Gengruppe aus neun Genen (Cluster 7, Abbildung 2). Die übrigen Gene dieser Gruppe sind nicht an der RoF-Biosynthese beteiligt.^[13] Der Weg, der von Riboflavin zu AF führt, blieb weiterhin unbekannt. Es wurde postuliert, dass mehrere Enzyme für die Bildung des Schlüsselintermediats AF der RoF-Biosynthese notwendig sind.^[5] Ein wichtiger Schritt hin zur Identifizierung der unbekannten AF-Biosynthesegene war das Ergebnis des folgenden Genexpressionsexperiments. Ein Cosmid (pESAC13-SD106kbp),^[5] das ein bestimmtes 106 kbp großes, subgenomisches DNA-Fragment mit 95 putativen Genen aus *S. davawensis* enthielt (Abbildung 2), wurde in das Chromosom des Expressionswirts *S. coelicolor* integriert. Dies führte zur Bildung von RoF durch den entsprechenden rekombinanten *S. coelicolor*-Stamm.^[5] *S. coelicolor* produziert als Wildtyp weder RoF noch AF (noch irgendein anderes Flavinanalogon). Das Ergebnis dieses Expressionsexperiments legte daher nahe, dass alle Gene der RoF-Synthese (und damit auch alle Gene der AF-Synthese), auf diesem 106 kbp großen, subgenomischen DNA-Fragment aus *S. davawensis* vorhanden sind. Das 106 kbp große subgenomische DNA-Fragment enthielt auch das Gen *rosA*, dessen Genprodukt für die Bildung von RoF aus AF verantwortlich ist (siehe oben). Die meisten in dieser Arbeit beschriebenen Experimente zielten nun darauf ab, die Gene/Enzyme der Biosynthese von AF selbst zu identifizieren und zu charakterisieren. Zunächst wollten wir jedoch die publizierten Ergebnisse verifizieren, die beschreiben, dass Riboflavin eine Vorstufe der RoF-Biosynthese ist.^[12a]

Die Zugabe von Riboflavin (100 µM) zu einer *S. davawensis*-Kultur förderte die Bildung von RoF und führte zu einer erhöhten Ausbeute (43 µM RoF im Überstand einer

[*] Dr. J. Schwarz,^[+] V. Konjik,^[+] Dr. F. Jankowitsch, Prof. Dr. M. Mack
Fakultät für Biotechnologie, Institut für Technische Mikrobiologie
Hochschule Mannheim
Paul-Wittsack-Straße 10, 68163 Mannheim (Deutschland)
E-Mail: m.mack@hs-mannheim.de

Prof. Dr. R. Sandhoff
Pathobiochemie der Lipide im Deutschen Krebsforschungszentrum
Heidelberg (Deutschland)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

Hintergrundinformationen (Material und Methoden) und die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201600581> zu finden.

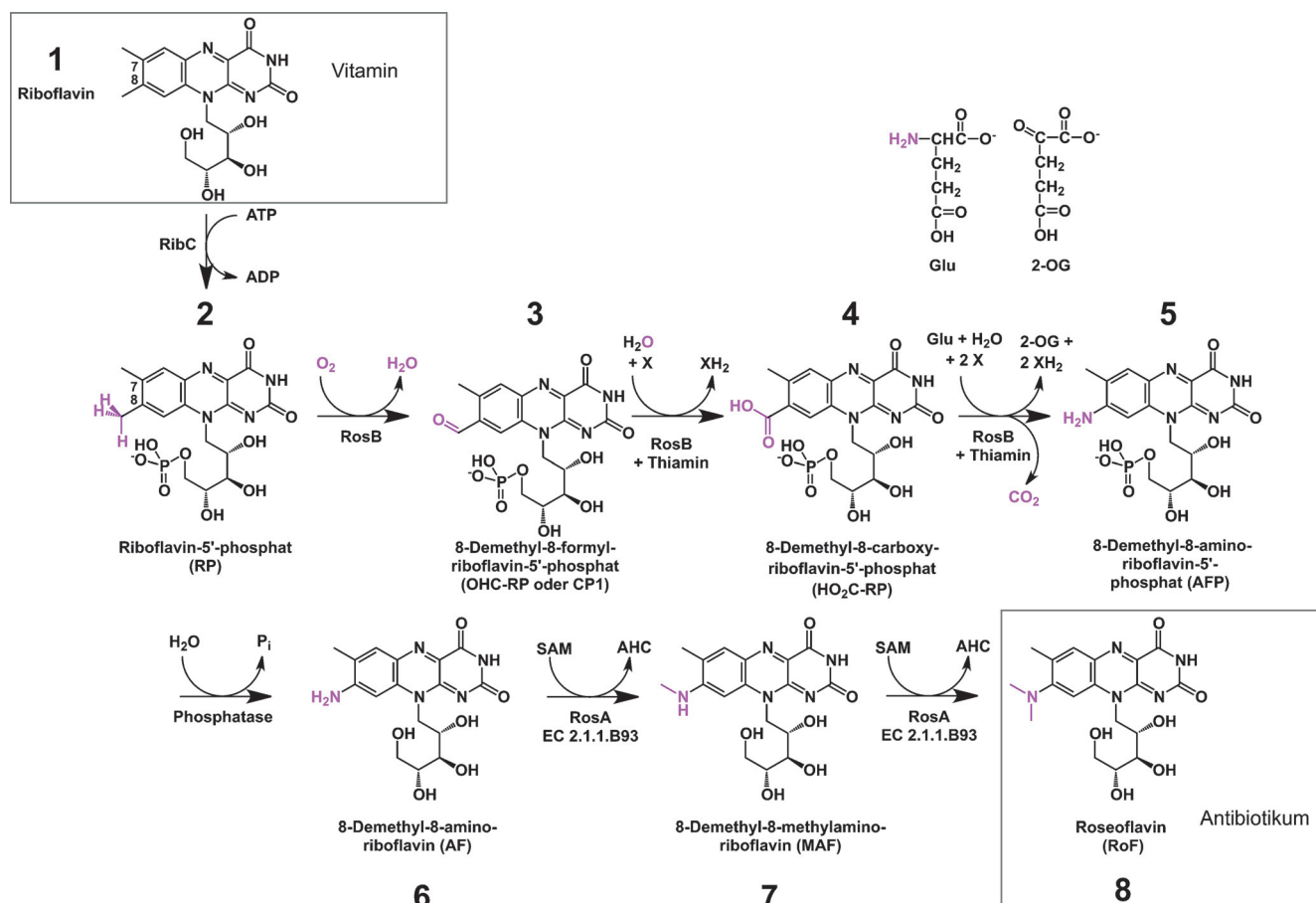


Abbildung 1. Die RoF-Biosynthese in *S. davawensis* ausgehend von Riboflavin. Die Flavokinase RibC bildet aus Riboflavin und ATP zunächst RP (2).^[8b] Für die erste RosB-Reaktion, die Umwandlung von RP in OHC-RP (CP1; 3), ist nur Sauerstoff notwendig. Für die Überführung von OHC-RP in HO₂C-RP (4) wird Thiamin, nicht aber Sauerstoff benötigt (X = unbekannter Wasserstoffakzeptor). HO₂C-RP wird dann in Gegenwart von Thiamin und Glutamat zu AFP (5) decarboxyliert und transaminiert, wobei zugleich 2-Oxoglutarat (2-OG) entsteht. Diese Reaktion benötigt wieder keinen Sauerstoff. Die SAM-abhängige Dimethyltransferase RosA ist für die Umwandlung von AF in RoF (über MAF) verantwortlich.^[13] Als Begleitprodukt entsteht S-Adenosylhomocystein (AHC). AFP ist kein Substrat für RosA,^[13] seine Dephosphorylierung wird somit von einem noch unbekannten Enzym durchgeführt. Für weitere Details siehe Text.

stationären Kultur im Gegensatz zu 21 µM in der unbehandelten Kontrolle). Fütterungsexperimente mit [U-¹⁵N]Riboflavin (50 µM) und *S. davawensis* und die nachfolgende Analyse mittels Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC/MS) zeigte, dass alle vier Stickstoffatome von [U-¹⁵N]Riboflavin in RoF erhalten waren (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Dies belegt, dass Riboflavin direkt (ohne zwischenzeitlichen Abbau) als Ausgangsstoff für die RoF-Biosynthese verwendet wurde.^[12a]

Folgende Expressionsexperimente wurden durchgeführt, um die Zahl der Kandidatengene der AF-Biosynthese auf dem Cosmid pESAC13-SD106kbp zu reduzieren. 5'- und 3'-verkürzte Versionen mit 84 bzw. 76 der ursprünglichen Gene wurden hergestellt (die weiß dargestellten Gene in Abbildung 2 wurden entfernt) und mittels Konjugation in den Expressionswirt *S. coelicolor* übertragen. Überstände stationärer Kulturen der rekombinanten Stämme enthielten RoF, was stark dafür sprach, dass die AF-Biosynthesegene auch auf diesen verkürzten Cosmiden noch vorhanden waren. Da der Cluster 7 keine Kandidatengene für die AF-Biosynthese

aufwies,^[13] mussten die gesuchten Gene in den Clustern 1, 2, 3, 4, 5, 6 oder 8 (siehe Abbildung 2) liegen. Diese Cluster wurden jeweils einzeln deletiert, und die Überstände stationärer Kulturen der entsprechenden rekombinanten Stämme wurden auf das Vorhandensein von RoF untersucht. Nur die Deletion des Clusters 2 führte zu einem Stamm, der kein RoF mehr produzierte (Abbildung 2, Chromatogramm b). Dies deutete darauf hin, dass die Gene der AF-Biosynthese in diesem Cluster zu finden sind. Die fünf Gene des Clusters 2 wurden jeweils einzeln deletiert, und die Überstände stationärer Kulturen der entsprechenden rekombinanten Stämme wurden auf das Vorhandensein von RoF untersucht. Nur die Deletion des Gens *BN159_7989* des Clusters 2 führte zu einem Stamm, der kein RoF mehr produzierte (Abbildung 2, Chromatogramm c), was darauf hindeutete, dass nur ein Enzym (das Produkt des Gens *BN159_7989*) für die Bildung von AF verantwortlich ist. Diese Hypothese wurde durch die Ergebnisse der folgenden Experimente untermauert. Die Überexpression von *BN159_7989* in *S. coelicolor* führte zur Bildung von AF (Abbildung 2, Chromatogramm d), und die

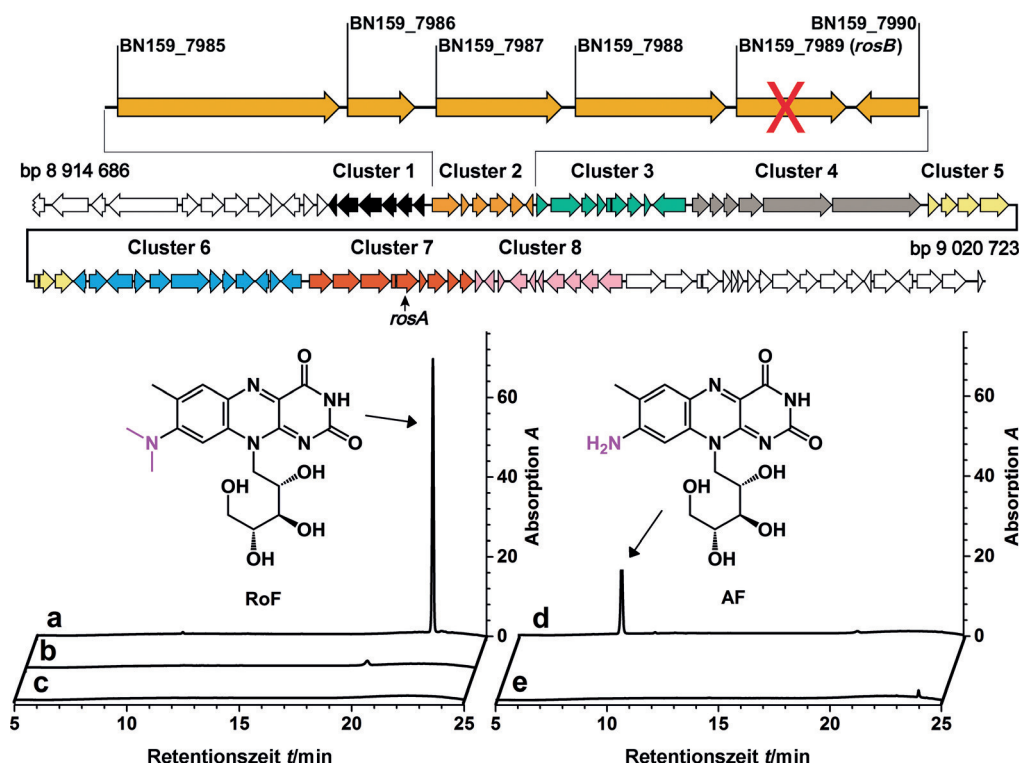


Abbildung 2. Identifizierung des für die Bildung von AF verantwortlichen Gens mithilfe systematischer Gendeletions- und -expressionsexperimente; für weitere Details siehe Text. Mitte: schematische Darstellung 95 putativer Gene auf einem 106 kbp großen, subgenomischen DNA-Fragment von *S. davawensis* (von bp 8 914 686 bis bp 9 020 723).^[5] Unten: Ergebnisse der Analyse von Kulturen rekombinanter *S. davawensis*-Stämme im Hinblick auf die Synthese von RoF und AF mittels HPLC (photometrische Detektion bei $\lambda = 480$ nm). Chromatogramm a: Der *S. davawensis*-Wildtyp (Kontrolle) produziert RoF. Chromatogramm b: Ein *S. davawensis*-Stamm ohne Cluster 2 (die systematischen Namen der kodierenden Sequenzen von Cluster 2 sind ganz oben gezeigt)^[5] bildete weder RoF noch AF. Chromatogramm c: Ein *S. davawensis*-Stamm ohne Gen BN159_7989 (*rosB*) (rotes Kreuz) bildete weder AF noch RoF. Chromatogramm d: Expression von BN159_7989 in *S. coelicolor* führte zu AF im Kulturüberstand des zugehörigen rekombinanten Stammes. Chromatogramm e: Der *S. coelicolor*-Wildtyp (Kontrolle) produziert weder AF noch RoF.

Koexpression der Gene BN159_7989 und *rosA* in *S. coelicolor* und dem Gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* führte zur Bildung von RoF. Darüber hinaus gaben die Expressionsexperimente mit *E. coli* einen Hinweis darauf, dass das Reaktionsprodukt von BN159_7989 AFP (die phosphorylierte Form von AF) und nicht AF ist (Abbildung S2). Die im Folgenden beschriebenen Daten zeigen, dass das Protein BN159_7989 tatsächlich AFP bildet und nicht AF und dass für die RoF-Biosynthese ein zusätzliches Enzym notwendig ist, das die Umwandlung von AFP in AF (das Substrat von RosA) katalysiert (eine Phosphatase).

Die Primärstruktur von BN159_7989 wurde mit Primärstrukturen anderer Proteine in öffentlichen Datenbanken verglichen, und es zeigte sich, dass BN159_7989 eine putative Bindestelle für RP besitzt (Abbildung S3). Dies legte nahe, dass RP (und nicht Riboflavin) der Startpunkt der RoF-Biosynthese ist. Eine rekombinante Version von BN159_7989, BN159_7989-His₆, wurde in *E. coli* überproduziert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt (Abbildung S4). Dieses Reinigungsverfahren führte zur Freisetzung einer gelben Verbindung, die als AFP identifiziert wurde (Abbildung S5). Nach Modifikation der ersten Reinigungsstrategie erhielten wir BN159_7989-His₆-Präparationen, die weitge-

hend AFP-frei waren (AFP-Gehalt < 5%) und die für die biochemische Analyse dieses Proteins eingesetzt werden konnten.

AFP-armes BN159_7989-His₆ wurde zu einem Enzym-Assay gegeben, der RP als einziges Substrat enthielt. Nach Inkubation wurde das Gemisch mittels ultraschneller HPLC gekoppelt mit Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (UPLC/ESI/MS2) analysiert. Eine unbekannte Verbindung (CP1; **3**) mit einem m/z -Wert von 471 wurde von BN159_7989-His₆ mit einer spezifischen Aktivität von $0.44 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ (± 0.01 ; $n = 6$; K_m für RP < $20 \mu\text{M}$) aus RP (aber nicht aus Riboflavin) gebildet. Für diese Reaktion genügte die Gegenwart von molekularem Sauerstoff (Abbildung S6b); andere Substrate oder Cofaktoren waren nicht notwendig. Das UV/Vis-Spektrum (200–800 nm) von CP1 ähnelte dem von RP (Abbildung S7), was darauf hindeutete, dass CP1 ebenfalls ein Flavin ist. CP1 wurde mittels UPLC/ESI/MS2 weiter analysiert, und der Vergleich seiner Produkt-Ionen-Spektren mit denen von RP, AFP (Abbildung S6a/h), [U-¹⁵N]Riboflavin, [U-¹³C]-Riboflavin und [U-¹³C,U-¹⁵N]Riboflavin (Abbildung S8) deutete darauf hin, dass CP1 ein Flavin mit einem modifizierten Dimethylbenzolteil ist. Der m/z -Wert und die Massenunterschiede der Produkt-Ionen-Spektren von CP1 passen zur Oxidation einer der Methylgruppen von RP zu einer

Formylgruppe (siehe Abbildung 1, Umwandlung von **2** in **3**). Dass es sich bei CP1 um 8-Demethyl-8-formylriboflavin-5'-phosphat (OHC-RP) handeln könnte, passte wiederum dazu, dass Sauerstoff für die Reaktion notwendig war. Darüber hinaus deutete das breite Absorptionssignal während der Chromatographie des Aldehyds CP1 auf eine reversible Halbacetalbildung mit Methanol auf der Säule hin (Abbildung S6b). Die schnelle Reaktion von CP1 mit Phenylhydrazin (ein Nachweisreagens für primäre Aldehyde) zu einem klar erkennbaren Hydrazon (Abbildung S6c) und die Oxidation von CP1 zu 8-Demethyl-8-carboxyriboflavin-5'-phosphat (HO₂C-RP) mit Wasserstoffperoxid (Abbildung S6d/e) bestätigten, dass CP1 eine Aldehydgruppe enthält (siehe auch Abbildung S9).

Die Identifizierung von OHC-RP (CP1) als Intermediat der AFP-Synthese durch BN159_7989-His₆ legte nahe, dass eine Decarboxylierungsreaktion den Weg für die Einführung einer Aminogruppe ebnet (siehe Abbildung 1, Umwandlung von **4** in **5**). Eine solche Reaktion setzt eine Oxidation von OHC-RP zu HO₂C-RP voraus, die im ursprünglichen Enzym-Assay, der lediglich RP und BN159_7989-His₆ enthielt, nicht beobachtet wurde. Mehrere Zusätze wurden einzeln zum ursprünglichen Enzym-Assay gegeben, um die angenommene Bildung von HO₂C-RP durch BN159_7989-His₆ zu fördern (siehe Tabelle S1). In Gegenwart von Thiamin wurde die Oxidation von OHC-RP zu HO₂C-RP tatsächlich beobachtet. HO₂C-RP wurde von BN159_7989-His₆ mit einer spezifischen Aktivität von 0.61 nmol min⁻¹ (mg Protein)⁻¹ (± 0.04; n = 6) gebildet (Abbildung S6e/f). Auch die Zugabe von Thiaminpyrophosphat förderte die Oxidation von OHC-RP zu HO₂C-RP, im Vergleich zu Thiamin allerdings in geringerem Maße (Tabelle S1). Weder Sauerstoff noch irgendein anderes Substrat oder ein anderer Cofaktor waren für diesen Reaktionsschritt notwendig. Die Aufgabe von Thiamin bei der Umwandlung von OHC-RP in HO₂C-RP bleibt unklar. Eindeutig war jedoch, dass das Endprodukt AFP auch in Gegenwart von Thiamin nicht gebildet wurde, d. h., der Aminogruppendonor der Reaktion war immer noch unbekannt. Ein modifizierter Enzym-Assay, der jetzt RP, Thiamin und BN159_7989-His₆ enthielt, wurde verwendet, um mögliche Aminogruppendonoren zu testen (Tabelle S1). Dabei wurde Glutamat als Aminogruppendonor der AFP-Synthese identifiziert (Abbildung S6g/h und Abbildung S9). In Gegenwart von RP, Thiamin und Glutamat wurde AFP von BN159_7989-His₆ mit einer spezifischen Aktivität von 0.33 nmol min⁻¹ (mg Protein)⁻¹ (± 0.06; n = 6) gebildet (Abbildung S6e/f). Der Transfer der Aminogruppe von Glutamat auf HO₂C-RP wurde mittels [¹⁵N]Glutamat als Cosubstrat (anstelle von [¹⁴N]Glutamat) verifiziert: Die Atommasse nahm wie erwartet um 1 u von 8-Demethyl-8-aminoriboflavin-5'-phosphat (¹⁴N-AFP) zu [8-¹⁵N]8-Demethyl-8-aminoriboflavin-5'-phosphat ([¹⁵N]AFP) zu (Abbildung S6i und Abbildung S9). Auch die erwartete gleichzeitige Bildung von 2-Oxoglutarat wurde mithilfe eines gekoppelten Enzym-Assays unter Verwendung einer (R)-2-Hydroxyglutarat-Dehydrogenase^[14] validiert. Die Zugabe von NAD⁺ (aber nicht von NADP⁺) zu diesem endgültigen BN159_7989-Enzym-Assay führte zu einer Aktivitätssteigerung um den Faktor 1.7 (siehe Tabelle S1).

Wir schließen aus unseren Daten, dass die Schlüsselreaktionen der RoF-Biosynthese von BN159_7989 katalysiert werden, das den von Riboflavin abgeleiteten Cofaktor RP in AFP überführt. Eine noch unbekannte Phosphatase hydrolysiert AFP zu AF, das dann von RosA zu RoF methyliert wird. Insgesamt werden demnach vier Enzyme für die Umwandlung eines Vitamins in ein hochwirksames Antibiotikum benötigt (Abbildung 1). Als zweites Enzym der RoF-Biosynthese (nach RosA) wurde BN159_7989 RosB genannt. RosB ist eine 8-Demethyl-8-aminoriboflavin-5'-phosphat-Synthase und das erste bekannte Enzym einer neuen Enzymklasse (mit einem neuen Reaktionsmechanismus), deren Vertreter Oxidoreduktasen, Decarboxylasen und Amino-transferasen in einem sind.

Die Sequenzierung des Genoms von *S. cinnabarinus*, dem zweiten bekannten RoF-Produzenten, ergab, dass die Gene *rosA* und *rosB* ebenfalls vorhanden sind. Die Primärstruktur von RosB aus *S. cinnabarinus* ist mit der von RosB aus *S. davawensis* identisch (Abbildung S3).

RosB könnte im Hinblick auf die Entwicklung neuartiger Synthesen sehr nützlich sein. Mittels Mutagenese sollten sich leicht Varianten für die ortsspezifische Substitution einer Methylgruppe durch eine Aminogruppe bei aromatischen Verbindungen mit kommerzieller Bedeutung erzeugen lassen. Wir sind gerade dabei, die räumliche Struktur von RosB aufzuklären, was hoffentlich hilft, den Reaktionsmechanismus zu verstehen. Ein hypothetischer Reaktionsverlauf ist in Abbildung S10 zu sehen.

Stichwörter: Riboflavin · Riboflavin-5'-phosphat · Roseoflavin · *Streptomyces davawensis*

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 6103–6106
Angew. Chem. **2016**, 128, 6208–6212

- [1] D. B. Pedrolli, F. Jankowitsch, J. Schwarz, S. Langer, S. Nakanishi, E. Frei, M. Mack, *Curr. Pharm. Des.* **2013**, 19, 2552–2560.
- [2] L. E. Cooper, S. E. O'Leary, T. P. Begley, *Biochemistry* **2014**, 53, 2215–2217.
- [3] K. Fiehe, A. Arenz, C. Drewke, T. Hemscheidt, R. T. Williamson, E. Leistner, *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 185–189.
- [4] S. Otani, M. Takatsu, M. Nakano, S. Kasai, R. Miura, *J. Antibiot.* **1974**, 27, 88–89.
- [5] F. Jankowitsch, J. Schwarz, C. Ruckert, B. Gust, R. Szczepanowski, J. Blom, S. Pelzer, J. Kalinowski, M. Mack, *J. Bacteriol.* **2012**, 194, 6818–6827.
- [6] A. Gutiérrez-Preciado, A. G. Torres, E. Merino, H. R. Bonomi, F. A. Goldbaum, V. A. García-Angulo, *PLoS One* **2015**, 10, e0126124.
- [7] a) S. Hemberger, D. B. Pedrolli, J. Stolz, C. Vogl, M. Lehmann, M. Mack, *BMC Biotechnol.* **2011**, 11, 119–129; b) V. A. García Angulo, H. R. Bonomi, D. M. Posadas, M. I. Serer, A. G. Torres, A. Zorreguieta, F. A. Goldbaum, *J. Bacteriol.* **2013**, 195, 4611–4619.
- [8] a) D. B. Pedrolli, S. Nakanishi, M. Barile, M. Mansurova, E. C. Carmona, A. Lux, W. Gartner, M. Mack, *Biochem. Pharmacol.* **2011**, 82, 1853–1859; b) S. Grill, S. Busenbender, M. Pfeiffer, U. Kohler, M. Mack, *J. Bacteriol.* **2008**, 190, 1546–1553; c) S. Langer, M. Hashimoto, B. Hobl, T. Mathes, M. Mack, *J. Bacteriol.* **2013**, 195, 4037–4045.
- [9] P. Macheroux, B. Kappes, S. E. Ealick, *Febs J.* **2011**, 278, 2625–2634.

- [10] a) S. Langer, S. Nakanishi, T. Mathes, T. Knaus, A. Binter, P. Macheroux, T. Mase, T. Miyakawa, M. Tanokura, M. Mack, *Biochemistry* **2013**, 52, 4288–4295; b) C. Walsh, J. Fisher, R. Spencer, D. W. Graham, W. T. Ashton, J. E. Brown, R. D. Brown, E. F. Rogers, *Biochemistry* **1978**, 17, 1942–1951; c) K. Yorita, H. Misaki, B. A. Palfey, V. Massey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 2480–2485.
- [11] a) E. R. Lee, K. F. Blount, R. R. Breaker, *RNA Biol.* **2009**, 6, 187–194; b) M. Mansjö, J. Johansson, *RNA Biol.* **2011**, 8, 674–680; c) E. Ott, J. Stolz, M. Lehmann, M. Mack, *RNA Biol.* **2009**, 6, 276–280; d) D. B. Pedrollo, A. Matern, J. Wang, M. Ester, K. Siedler, R. Breaker, M. Mack, *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40, 8662–8673; e) J. A. Howe, H. Wang, T. O. Fischmann, C. J. Balibar, L. Xiao, A. M. Galgoci, J. C. Malinverni, T. Mayhood, A. Villafania, A. Nahvi, N. Murgolo, C. M. Barbieri, P. A. Mann, D. Carr, E. Xia, P. Zuck, D. Riley, R. E. Painter, S. S. Walker, B. Shernborne, R. de Jesus, W. Pan, M. A. Plotkin, J. Wu, D. Rindgen, J. Cummings, C. G. Garlisi, R. Zhang, P. R. Sheth, C. J. Gill, H. Tang, T. Roemer, *Nature* **2015**, 526, 672–677.
- [12] a) K. Matsui, N. Juri, Y. Kubo, S. Kasai, *J. Biochem.* **1979**, 86, 167–175; b) N. Juri, Y. Kubo, S. Kasai, S. Otani, M. Kusunose, K. Matsui, *J. Biochem.* **1987**, 101, 705–711.
- [13] F. Jankowitsch, C. Kuhm, R. Kellner, J. Kalinowski, S. Pelzer, P. Macheroux, M. Mack, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 38275–38285.
- [14] X. Yu, J. Bresser, I. Schall, I. Djurdjevic, W. Buckel, X. Wang, P. C. Engel, *Anal. Biochem.* **2012**, 431, 127–131.

Eingegangen am 20. Januar 2016,
veränderte Fassung am 7. März 2016
Online veröffentlicht am 13. April 2016