

- 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). 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



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.¹⁾

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,²⁾ Fluorophore,³⁾ photoaktivierbare Aminosäuren,⁴⁾ Photo-Crosslinker,⁵⁾ Metall-Chelatoren,⁶⁾ isotoopenmarkierte Aminosäuren für NMR-Studien⁷⁾ oder posttranslationale Modifikationen.⁸⁾

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.¹⁾ 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.⁹⁾ →

Weitere Mutationen an der Bindungsstelle des Release Faktor 1 (RF1) im Ribosom wirkten erstmals einer zentralen Einschränkung der Amber-Suppressions-Methode entgegen, nämlich die Konkurrenz der Suppressor-tRNA mit RF1 um die Bindung des Amber-Codons. Dies verbesserte die Amber-Suppressionseffizienz und erlaubte den Einbau zweier ncAA in ein Protein mit akzeptablen Ausbeuten.¹⁰⁾ Durch ein weiteres orthogonales Ribosom (Ribo-Q) stieg zudem die Effizienz der Prozessierung von Quadruplett-dekodierenden tRNAs. Mit diesem Ansatz wurden durch die Kombination der Amber- und Quadruplett-Suppression zwei unterschiedliche ncAA selektiv in ein Protein inkorporiert.¹¹⁾ Die Codierung von ncAA durch Quadruplett-Codons eröffnet zumindest theoretisch die Möglichkeit, 256 neue Codons zu generieren. Dies könnte für die ribosomale Synthese von Proteinen mit einer Vielzahl unterschiedlicher ncAAs wertvoll sein. Die tatsächliche Anwendungsbreite in Bezug auf unterschiedliche Quadruplett-dekodierende tRNAs ist jedoch noch unbekannt.

Neuere Trends beschäftigen sich mit RF1-defizienten *E. coli*-Stämmen für die Inkorporation mehrerer ncAA in Abhängigkeit des Amber-Codons. RF1 ist in *E. coli* nicht essenziell, wenn eine höher exprimierte Mutante des Release Faktor 2 (RF2) für die Terminierung durch Opal und Ochre Stopp-Codons verwendet wird.¹²⁾

In einem anderen Ansatz wird das Amber-Codon von einigen essenziellen Genen in ein anderes Stopcodon mutiert. Dies führt zu Stämmen, die bei gleichzeitiger Amber-Suppression durch ein orthogonales tRNA/aaRS-Paar wachstumsfähig sind.¹³⁾ Im Zug dieser Entwicklungen zeigten mehrere Beispiele, dass Proteine mit bis zu zehn identischen ncAA-Positionen in akzeptablen Ausbeuten exprimiert werden können.

Eine weitere Perspektive bieten Entwicklungen zur Erhöhung des Durchsatzes viraler Rekombinationsmethoden.¹⁴⁾ Durch Deletion einzelner Codons (und eventuell entsprechender tRNAs) im gesamten *E. coli*-Genom durch Rekombination könnten Codons vollständig neuen ncAA zugewiesen werden.

Dieser Ansatz hat prinzipiell erhebliches Potenzial für die Verwendung größerer Zahlen von Codons. Er umgeht Schwierigkeiten bei der Veränderung der generellen Translationskomponenten für die Prozessierung unnatürlicher quadruplett-dekodierender tRNAs. Ein echter Funktionsnachweis steht allerdings noch aus.

Höhere Organismen

◆ Seit 2001 der genetische Code von *E. coli* erstmals erweitert wurde,¹⁵⁾ gab es in den letzten Jahren, vor allem im Hinblick auf die Installation von orthogonalen tRNA/aaRS-Paaren in höheren Organismen, weitere Meilensteine. Nach den ersten Eukaryoten (Säugerzellen und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, Abbildung 2)^{5b,16)} wurden zunächst die genetischen Codes der methylophilen Hefe *Pichia pastoris* für großtechnische Proteinexpression¹⁷⁾ und des Tuberkuloseerregers *Mycobacterium tuberculosis*¹⁸⁾ erweitert.

Im Jahr 2011 gelang es am Beispiel des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* das erste Mal, den ge-

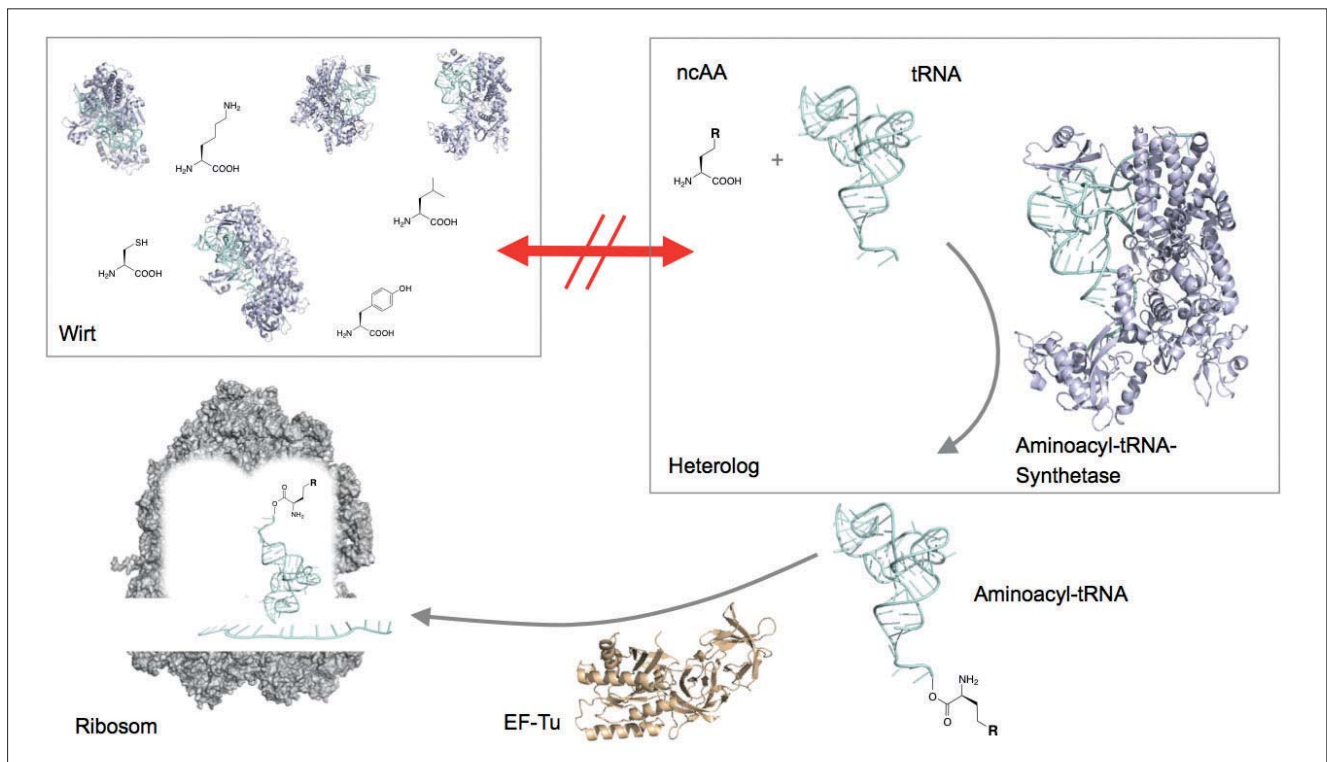


Abb. 1. Prinzip der Erweiterung des genetischen Codes in *E. coli* durch heterologe Expression von orthogonalen tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetasen.

netischen Code eines multizellulären Organismus zu erweitern.¹⁹⁾ Ein Jahr später wurde der genetische Code der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* erweitert, wobei verschiedene ncAA in Proteine in Fruchtfliegenzellen sowie in Geweben von embryonalen und adulten Fliegen eingebaut wurden.²⁰⁾

Diese Entwicklungen lassen hoffen, dass das erste Säugetier mit einem erweiterten genetischen Code schon bald Einblicke in biologische Prozesse liefern wird, die noch mehr Relevanz für die Humanbiologie besitzen könnten.

Strukturelle Einschränkungen überwinden

◆ Forschungen zur Code-Erweiterung sind stark anwendungsgetrieben und die durch ncAA inkorporierbaren chemischen Funktionen stehen dabei im Vordergrund. Trotzdem ist auch ein Blick auf die rein strukturellen Spielräume der ncAA-Prozessierung durch aaRS und andere benötigte Translationskomponenten hilfreich. Hier existieren immer noch Einschränkungen, die der genetischen Codierung bestimmter Funktionen im Weg stehen.

Die ersten orthogonalen tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Paare für die ncAA-Inkorporation waren Tyrosyl-Paare aus *Methanococcus jannaschii* oder *E. coli*, die jeweils in *E. coli* und *S. cerevisiae* genutzt wurden. Obwohl sehr viele Funktionen mit neu evolvierten Tyrosylpaaren in Proteine inkorporiert wurden, waren diese bisher meist auf para-substituierte Phenylalanin-Derivate beschränkt, die in der Regel sehr klein und nur in Einzel-

fällen sterisch anspruchsvoller sind, etwa wenn ein zusätzlicher aromatischer Ring vorliegt.^{4b,6,21)} Ein späteres Paar, das in *S. cerevisiae* eingeführt wurde, war ein orthogonales Leucylpaar aus *E. coli*,^{4c)} das deutlich flexibler ist. Mit diesem wurden erstmals ncAA inkorporiert, die stark von der kanonischen Vorläufer-Aminosäure abweichen, z. B. fluoreszente ncAA mit zwei aromatischen Ringen³⁾ oder mit längeren Alkylketten.

Die bisher größte Flexibilität in Bezug auf unterschiedliche ncAA-Strukturen weist jedoch das tRNA^{Pyl}/Pyrrolysyl-tRNA-Synthetase-(PylRS)-Paar auf. Mit diesem wurden bisher zwei große Gruppen von ncAA inkorporiert, die entweder auf N ϵ -modifiziertem Lysin oder Phenylalanin beruhen. Die bei weitem häufigste Grundstruktur sind hierbei N ϵ -Carbamat-verknüpfte Lysine, die hinsichtlich des Substituenten variabel sind. So wurde z. B. eine Reihe sehr großer, (bi)cyclischer Alkene und Alkine für schnelle, bioorthogonale Cycloadditionsreaktionen eingebaut.²²⁾

N ϵ -Amid-verknüpfte ncAA sind eine weitere Gruppe, die bisher allerdings größere Einschränkungen beim Substituenten aufzuweisen scheint als Carbamate.²³⁾ Insgesamt zeigen sowohl der Wildtyp von PylRS als auch bestimmte Mutanten ein gewisses Maß an Polyspezifität, was die Einführung neuer ncAA vereinfacht. Interessanterweise trifft dies auch auf eine Reihe von PylRS-Mutanten zu, die verschiedene Phenylalaninderivate als Substrat akzeptieren, welche sich von TyrRS-prozessierbaren ncAA deutlich unterscheiden.²⁴⁾

Trotz der Verfügbarkeit verschiedener polyspezifischer aaRS und wirkungsvoller Methoden für das evolutive Design neuer Mutanten existieren Gemeinsamkeiten zwischen bisher inkorporierten ncAA, die Limitierungen bisher entwickelter aaRS nahelegen. Die offensichtlichste ist die begrenzte Größe von ncAA, insbesondere bei rigiden, aromatischen Strukturen mit mehr als zwei Ringsystemen. Dies verhinderte bis heute die genetische Codierung von Fluorophoren mit besseren photophysikalischen Eigenschaften aber auch z. B. von Nukleinsäure-Interkalatoren.

Zudem sind die meisten bisher inkorporierten ncAA eher unpolar und es existieren keine Beispiele für vielfach geladene oder sehr polare ncAA, die viele gerichtete Wasserstoffbrücken für die Erkennung durch die aaRS benötigen. Solche ncAA könnten interessante neue Fähigkeiten, etwa bei der Metallionenkomplexierung aufweisen. Ob diese Limitierungen auf Seite der aaRS oder anderer Translationskomponenten liegen und ob sie überwunden werden können, bleibt abzuwarten.

Integrierte Biosynthese und genetische Codierung von ncAA

◆ Ein weiteres Feld mit Potenzial ist die direkte In-vivo-Synthese von ncAA aus einfachen Grundbausteinen über heterologe Aminosäure-Biosynthesewege. Obwohl die chemische Synthese von ncAA im Labor deutlich mehr Flexibilität bietet, können hohe Kosten oder aufwendige Syntheserouten bestimmte Anwendung einschränken, insbesondere im Hinblick auf die

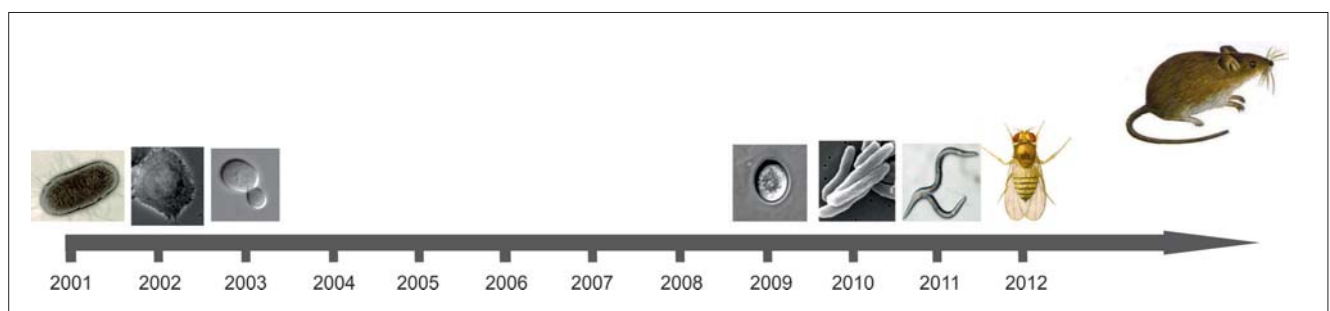


Abb. 2. Erweiterung des genetischen Codes in unterschiedlichen Organismen.

großtechnische Herstellung von modifizierten Proteinen. Ein frühes Beispiel zeigte die Biosynthese und genetische Codierung von p-Aminophenylalanin in *E. coli*. Kürzlich wurde zudem die Biosynthese von Pyrrolysin (1) durch Experimente in *E. coli* aufgeklärt (Abbildung 3).²⁵⁾ Daran sind die drei Gene *pylBCD* beteiligt. Der natürliche Vorläufer L-Lysin (2) wird durch PylB unter Beteiligung von S-Adenosyl-Methionin zu Methylornithin (3) isomerisiert,²⁶⁾ durch PylC mit einem zweiten L-Lysin-Molekül zum Pseudopeptid (4) acyliert.²⁷⁾ Dieses wird anschließend unter Beteiligung von PylD oxidiert (5) und cyclisiert.

Gleichzeitig wurde entdeckt, dass die Zugabe von L-Ornithin und die Deletion des *PylB*-Gens auf dem gleichen Weg zur Biosynthese und selektiven Protein-Inkorporation von Pyrrolin-Carboxylisin führt. Diese Aminosäure wurde für effiziente, bioorthogonale Konjugationschemie mit unterschiedlich substituierten 2-Aminobenzaldehyden und 2-Aminoacetophenonen verwendet.²⁸⁾

Evolutives Design von Peptiden und Proteinen

◆ Ein weiteres aufkommendes Feld ist außerdem die Nutzung von Organismen mit erweitertem genetischen Code für das evolutive Design von Peptiden und Proteinen.

Experimente in dieser Richtung betreffen die Frage, ob Organismen mit erweitertem Code Selektionsvorteile in der kompetitiven Evolution mit bisherigen Organismen haben. Zudem bieten sie die Möglichkeit, neue Proteinfunktionen zu erzeugen, die mit kanonischen Peptiden oder Proteinen nicht zugänglich wären. Solche Funktionen könnten – wie in natürlichen Proteinen – durch unvorhersehbare Wechselwirkungen zwischen ncAA mit kanonischen Aminosäuren entstehen. Sie können aber auch die Wirkung von ncAA mit autarken chemischen Funktionen ermöglichen oder verbessern, wenn diese von der exakten räumlichen Anordnung der ncAA abhängen und diese nur schwer vorhersehbar und durch rationales Design darstellbar ist.

In einem ersten Beispiel wurden Antikörper durch ein Phagen-Display evolviert, die ein genetisch kodiertes Sulfotyrosin enthielten und das HIV-Protein gp120 mit höherer Affinität erkannten als kanonische Antikörper.²⁹⁾ In weiteren Beispielen wurden reaktive, boronophenylalaninhaltige Antikörper evolviert, die ein azyklisches Aminosaccharid erkannten,³⁰⁾ sowie HIV-Protease-Inhibitoren auf Basis von reaktiven, benzoylphenylalaninhaltigen cyclischen Peptiden.³¹⁾

Diese Studien zeigen, dass ncAA Selektionsvorteile gegenüber kanonischen Proteinen bieten können und deshalb zum Design verbesser-

ter Wirkstoffe beitragen. In diesem neuen Feld sind noch viele Entwicklungen zum Design neuer Protein- und Organismusfunktionen zu erwarten.

Literatur

- 1) a) C. C. Liu, P. G. Schultz, *Ann. Rev. Biochem.* 2010, 79, 413–444; b) L. Davis, J. W. Chin, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012, 13, 168–182.
- 2) a) A. Deiters, T. A. Cropp, M. Mukherji, J. W. Chin, J. C. Anderson, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 11782–11783; b) J. W. Chin, S. W. Santoro, A. B. Martin, D. S. King, L. Wang, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 9026–9027; c) S. Virdee, P. B. Kapadnis, T. Elliott, K. Lang, J. Madrzak, D. P. Nguyen, L. Riechmann, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 10708–10711.
- 3) D. Summerer, S. Chen, N. Wu, A. Deiters, J. W. Chin, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 9785–9789.
- 4) a) E. A. Lemke, D. Summerer, B. H. Geierstanger, S. M. Brittain, P. G. Schultz, *Nat. Chem. Biol.* 2007, 3, 769–772; b) A. Deiters, D. Groff, Y. Ryu, J. Xie, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* 2006, 118, 2794–2797; c) N. Wu, A. Deiters, T. A. Cropp, D. King, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 14306–14307.
- 5) a) E. M. Tippmann, W. Liu, D. Summerer, A. V. Mack, P. G. Schultz, *ChemBioChem* 2007, 8, 2210–2214; b) J. W. Chin, T. A. Cropp, J. C. Anderson, M. Mukherji, Z. Zhang, P. G. Schultz, *Science* 2003, 301, 964–967.
- 6) J. M. Xie, W. S. Liu, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* 2007, 119, 9399–9402.
- 7) a) D. H. Jones, S. E. Cellitti, X. Hao, Q. Zhang, M. Jahnz, D. Summerer, P. G. Schultz, T. Uno, B. H. Geierstanger, *J. Biomol. NMR* 2010, 46, 89–100; b) A. Deiters, B. H. Geierstanger, P. G. Schultz, *ChemBioChem* 2005, 6, 55–58.

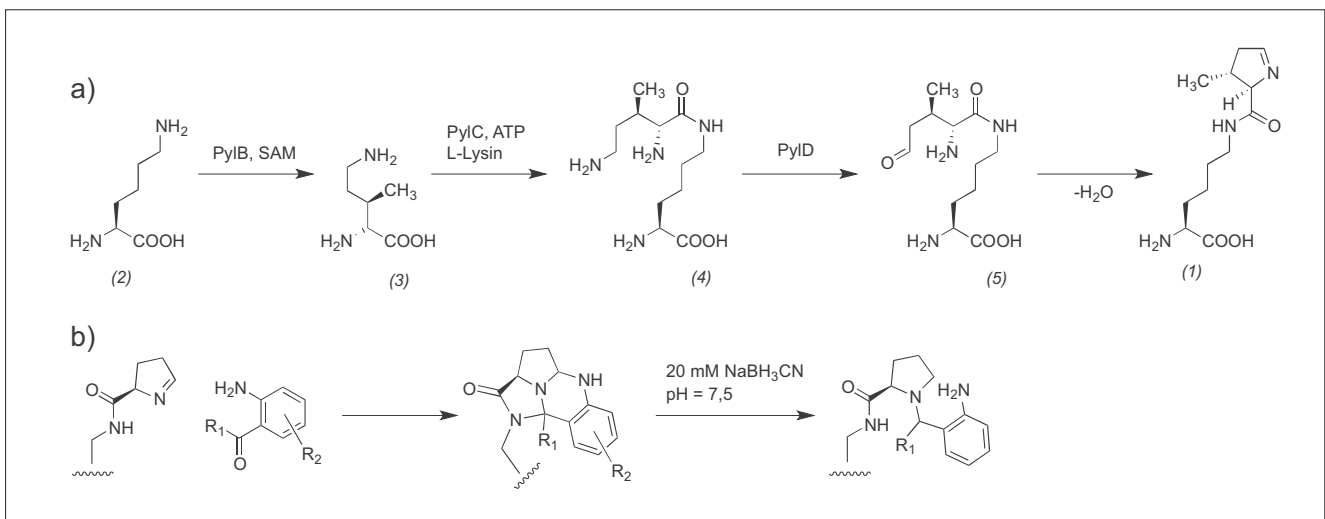


Abb. 3. a) Biosynthese von Pyrrolysin; b) Nutzung von Pyrrolin-Carboxylisin für bioorthogonale Konjugation.

- 8) a) H. Neumann, J. L. Hazen, J. Weinstein, R. A. Mehl, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 4028–4033; b) C. C. Liu, P. G. Schultz, *Nat. Biotechnol.* 2006, 24, 1436–1440; c) C. H. Kim, M. Kang, H. J. Kim, A. Chatterjee, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* 2012, 124, 7358–7361.
- 9) O. Rackham, J. W. Chin, *Nat. Chem. Biol.* 2005, 1, 159–166.
- 10) K. Wang, H. Neumann, S. Y. Peak-Chew, J. W. Chin, *Nat. Biotechnol.* 2007, 25, 770–777.
- 11) H. Neumann, K. Wang, L. Davis, M. Garcia-Alai, J. W. Chin, *Nature* 2010, 464, 441–444.
- 12) a) D. B. F. Johnson, J. F. Xu, Z. X. Shen, J. K. Takimoto, M. D. Schultz, R. J. Schmitz, Z. Xiang, J. R. Ecker, S. P. Briggs, L. Wang, *Nat. Chem. Biol.* 2011, 7, 779–786; b) D. B. Johnson, C. Wang, J. Xu, M. D. Schultz, R. J. Schmitz, J. R. Ecker, L. Wang, *ACS Chem. Biol.* 2012, 7, 1337–1344.
- 13) a) K. Ohtake, A. Sato, T. Mukai, N. Hino, S. Yokoyama, K. Sakamoto, *J. Bacteriol.* 2012, 194, 2606–2613; b) T. Mukai, A. Hayashi, F. Iraha, A. Sato, K. Ohtake, S. Yokoyama, K. Sakamoto, *Nucleic Acids Res.* 2010, 38, 8188–8195.
- 14) F. J. Isaacs, P. A. Carr, H. H. Wang, M. J. Lajoie, B. Sterling, L. Kraal, A. C. Tolonen, T. A. Gianoulis, D. B. Goodman, N. B. Reppas, C. J. Emig, D. Bang, S. J. Hwang, M. C. Jewett, J. M. Jacobson, G. M. Church, *Science* 2011, 333, 348–353.
- 15) L. Wang, A. Brock, B. Herberich, P. G. Schultz, *Science* 2001, 292, 498–500.
- 16) a) K. Sakamoto, A. Hayashi, K. Sakamoto, D. Kiga, H. Nakayama, A. Soma, T. Kobayashi, M. Kitabatake, K. Takio, K. Saito, M. Shirouzu, I. Hirao, S. Yokoyama, *Nucleic Acids Res.* 2002, 30, 4692–4699; b) W. S. Liu, A. Brock, S. Chen, S. B. Chen, P. G. Schultz, *Nat. Methods* 2007, 4, 239–244.
- 17) T. S. Young, I. Ahmad, A. Brock, P. G. Schultz, *Biochemistry* 2009, 48, 2643–2653.
- 18) F. Wang, S. Robbins, J. Guo, W. Shen, P. G. Schultz, *PLoS One* 2010, 5, e9354.
- 19) a) S. Greiss, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 14196–14199; b) A. R. Parrish, X. She, Z. Xiang, I. Coin, Z. Shen, S. P. Briggs, A. Dillin, L. Wang, *ACS Chem. Biol.* 2012, 7, 1292–1302.
- 20) A. Bianco, F. M. Townsley, S. Greiss, K. Lang, J. W. Chin, *Nat. Chem. Biol.* 2012, 8, 748–750.
- 21) J. W. Chin, A. B. Martin, D. S. King, L. Wang, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 11020–11024.
- 22) a) M. J. Schmidt, D. Summerer, *ChemBioChem* 2012, 13, 1553–1557; b) T. Plass, S. Milles, C. Koehler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem.* 2011, 123, 3964–3967; c) T. Plass, S. Milles, C. Koehler, J. Szymanski, R. Mueller, M. Wiessler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem.* 2012, 124, 4242–4246; d) E. Kaya, M. Vrabell, C. Deiml, S. Prill, V. S. Fluxa, T. Carell, *Angew. Chem.* 2012, 124, 4542–4545;
- e) K. Lang, L. Davis, J. Torres-Kolbus, C. Chou, A. Deiters, J. W. Chin, *Nat. Chem.* 2012, 4, 298–304.
- 23) T. Fekner, M. K. Chan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2011, 15, 387–391.
- 24) a) Y. S. Wang, X. Fang, H. Y. Chen, B. Wu, Z. U. Wang, C. Hilty, W. R. Liu, *ACS Chem. Biol.* 2012, doi: 10.1021/cb300512r; b) Y. S. Wang, X. Q. Fang, A. L. Wallace, B. Wu, W. S. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 2950–2953.
- 25) a) M. A. Gaston, L. Zhang, K. B. Green-Church, J. A. Krzycki, *Nature* 2011, 471, 647–650; b) S. E. Cellitti, W. Ou, H. P. Chiu, J. Grunewald, D. H. Jones, X. Hao, Q. Fan, L. L. Quinn, K. Ng, A. T. Anfora, S. A. Lesley, T. Uno, A. Brock, B. H. Geierstanger, *Nat. Chem. Biol.* 2011, 7, 528–530.
- 26) F. Quttterer, A. List, W. Eisenreich, A. Bacher, M. Groll, *Angew. Chem.* 2012, 124, 1367–1370.
- 27) F. Quttterer, A. List, P. Beck, A. Bacher, M. Groll, *J. Mol. Biol.* 2012, 424, 270–282.
- 28) W. Ou, T. Uno, H. P. Chiu, J. Grunewald, S. E. Cellitti, T. Crossgrove, X. Hao, Q. Fan, L. L. Quinn, P. Patterson, L. Okach, D. H. Jones, S. A. Lesley, A. Brock, B. H. Geierstanger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 10437–10442.
- 29) C. C. Liu, A. V. Mack, M. L. Tsao, J. H. Mills, H. S. Lee, H. Choe, M. Farzan, P. G. Schultz, V. V. Smider, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 17688–17693.
- 30) C. C. Liu, A. V. Mack, E. M. Brustad, J. H. Mills, D. Groff, V. V. Smider, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 9616–9617.
- 31) T. S. Young, D. D. Young, I. Ahmad, J. M. Louis, S. J. Benkovic, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 11052–11056.

Daniel Summerer, Jahrgang 1975, studierte Chemie in Bonn und promovierte über die chemische Biologie von DNA-Polymerasen. Nach einem Postdoc am Scripps Research Institute bei Peter G. Schultz im Bereich der Erweiterung des Genetischen Codes forschte er in Managementpositionen in der Biotech-Industrie im Bereich Genomics und Next-Generation Sequencing in Heidelberg und Boston. Seit 2010 ist er Gruppenleiter am Zukunftskolleg der Universität Konstanz. Sein Forschungsgebiet ist die synthetische Biologie funktioneller Protein-Nukleinsäure-Komplexe. daniel.summerer@uni-konstanz.de



Moritz J. Schmidt, Jahrgang 1986, studierte Life Sciences mit chemischen Schwerpunkt an der Universität Konstanz. Seit 2012 promoviert er bei Daniel Summerer als Fast-Track-Stipendiat der Konstanz Research School Chemical Biology. Seine Forschungsinteressen liegen in den Gebieten der Erweiterung des genetischen Codes, RNA-Erkennung und evolutiver Strategien des molekularen Designs.



Massenspektrometrie von modifizierten Nukleinsäuren

◆ Während die Massenspektrometrie von Proteinen vor allem unter dem Schlagwort Proteomics Erfolge verzeichnet, ist die vergleichbare Entwicklung bei den Nukleinsäuren ins Hintertreffen geraten. In jüngster Zeit zeichnet sich jedoch ein Aufwärtstrend auf diesem Gebiet ab. Einen wesentlichen Anteil daran haben die Forschungstrends zu modifizierten Nukleinsäuren. Tatsächlich wurden natürliche Modifikationen von Nukleinsäuren noch vor der DNA-Doppelhelix beschrieben, und seit der Identifikation von 5-Methylcytosin in DNA (m^5dC) durch Wyatt¹⁾ ist die Zahl bekannter natürlich vorkommender DNA- und RNA-Nukleoside bis auf nun über 160 gestiegen.²⁾

Gesteigerte Aufmerksamkeit widerfährt Nukleosiden vor allem im Zusammenhang mit der Beschreibung einer oxidativen Decarboxylierung von $m^5C^3)$ (siehe auch Trendberichte Biochemie 2011),⁴⁾ weil sowohl Synthese als auch Abbau von m^5dC als zentral für die Epigenetik und Entwicklungsbiologie gelten unter anderem in der Manifestation der Pluripotenz von Stammzellen. Das Konzept einer oxidativen Demethylierung wurde im vergangenen Jahr auch für 6-Methyladenosin (m^6A , Abbildung 1a) in mRNA beschrieben.⁵⁾ Durch zwei transkriptomweite Analysen der Verteilung von m^6A ,⁶⁾ die eine Anhäufung an regulatorisch wichtigen Stellen von mRNA beschreiben, rücken jetzt auch RNA-Modifikationen in den Fokus der Epigenetik.⁷⁾

Warum sind diese Entwicklungen wichtig für die Massenspektrometrie (MS) – und umgekehrt? Die eindeutige Identifizierung und Quantifizierung eines modifizierten Nukleosids – beispielsweise in einer mRNA oder einer regulatorischen, nicht-kodierenden RNA – ist in mehrfacher Hinsicht eine gewaltige technische Herausforderung.