

- 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. Irahata, 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, A. 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.

rung: Einerseits sind extrem kleine Probenmengen zu analysieren, da die Kopienzahl solcher RNA in einer komplexen RNA-Präparation aus biologischen Proben eine harte intrinsische Barriere ist, die bisher nur moderne Sequenzieretechniken durchbrechen können.⁸⁾ Andererseits ist die chemische Struktur der Modifikation nachzuweisen, was angesichts der Fülle möglicher Alternativen^{2a)} nur mit der Massenspektrometrie eindeutig gelingt. Ähnlich einem tryptischen Verdau bei Proteinen werden die Nucleinsäuren typischerweise enzymatisch fragmentiert. Daraus resultieren Nucleoside, Mononucleotide oder Oligonucleotide, letztere je nach

eingesetzter Nuclease mit einer Größenverteilung zwischen zwei und zwanzig Nucleotiden.⁹⁾

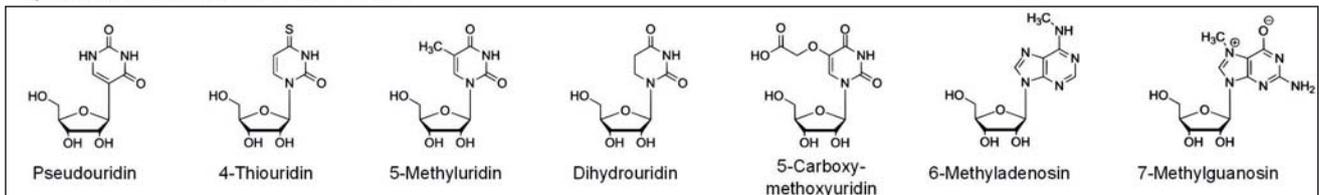
Die empfindlichste Analytik basiert derzeit auf Nucleosiden, geht aber leider einher mit dem vollständigen Verlust von Sequenzinformation (Abbildung 1b). Beim Übergang zu Oligonucleotiden offenbart sich ein Problem, das in der massenspektrometrischen Proteinanalytik bereits besser gelöst ist: Die Empfindlichkeit der Detektion von Oligonucleotiden ist im Vergleich zu Nucleosiden deutlich geringer, weil die Phosphatreste die Desorption ins Vakuum erschweren. Weiterhin ist das Auslesen von Sequenzinformation aus solchen

Fragmenten (Abbildung 1c) schwierig. Hier befindet sich das Feld in einem Umbruch, von dem wir hier einige neuere Arbeiten vorstellen. Diese beginnen mit Nucleosidanalytik, gefolgt von Ansätzen zur Analyse immer größerer Oligonucleotide bis hin zu einer Top-Down-Methode, die ohne Nucleaseverdau auskommt.

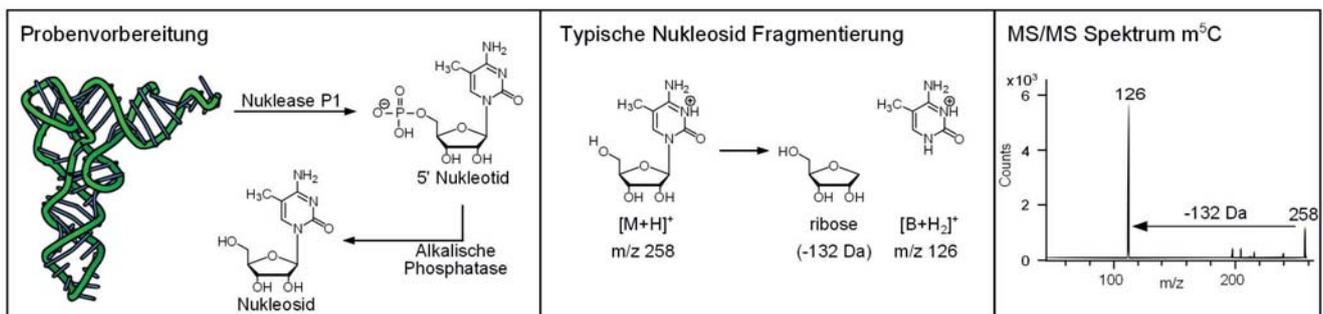
Nucleosidanalytik

◆ Die bewährteste Methode, ein modifiziertes Nucleosid in einer Nucleinsäureprobe zu quantifizieren, beruht auf einer vollständigen enzymatischen Hydrolyse aller Phosphodiesterbindungen und ei-

a) natürliche Nucleinsäuremodifikationen



b) Nucleosid-Massenspektrometrie



c) Oligonucleotid-Massenspektrometrie

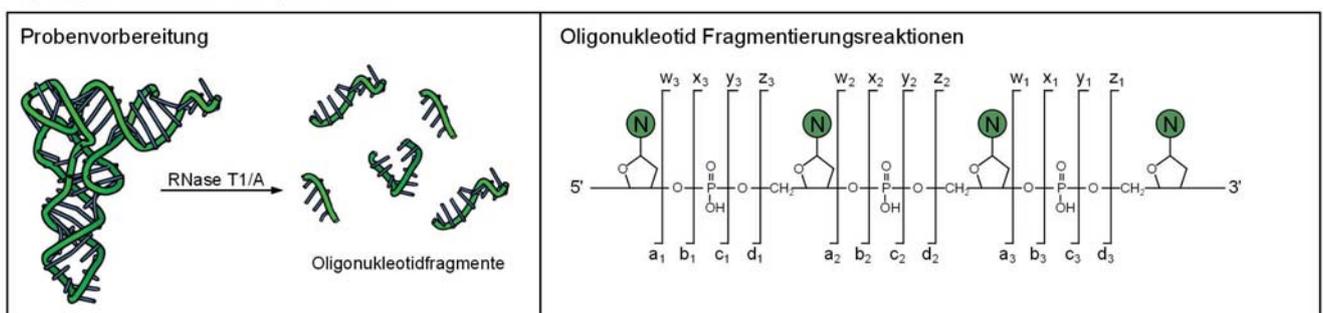


Abb. 1. Massenspektrometrie von Nucleinsäuren. a) Einige natürlich vorkommende, modifizierte Ribonucleoside von besonderem Interesse. b) Typische Nucleosidanalytik per LC-MS/MS basiert auf enzymatischer Hydrolyse aller Phosphodiesterbindungen und massenspektrometrischer Detektion nach chromatographischer Trennung. Das Beispiel von 5-Methylribocytidin zeigt die typische Fragmentierung der glycosidischen Bindung und den entsprechenden Massenübergang.

c) Größere RNAs werden häufig durch spezifische Nucleasen in definierte Oligonucleotidfragmente hydrolysiert. Deren Fragmentierung im Massenspektrometer geschieht an verschiedenen Stellen der Phosphodiesterbindung und produziert charakteristische Ionen, für die sich die rechts dargestellte Nomenklatur durchgesetzt hat. 5'-ladungstragende Fragmente werden von a bis d benannt, wobei ein zum 3'-Ende steigender Index die genaue Position im Oligonucleotid angibt. Umgekehrt werden Fragmente, welche die Ladung am 3'-Fragment tragen mit w bis z bezeichnet, wobei der Index dann am 3'-Ende beginnt.

ner Auftrennung des resultierenden Nucleosidgemisches durch Flüssigchromatographie an einer Umkehrphase. Diese Methode wurde bereits in den 1970er Jahren entwickelt¹⁰⁾ und alsbald an LC-MS-Geräte angepasst.¹¹⁾

Besonders hohe Empfindlichkeit erreichen LC-MS/MS-Kopplungen (Abbildung 1) und wenn die Massen und Massenübergänge eines Nucleosids einmal bekannt sind, sind Triple-Quadrupol-Geräte immer noch der Goldstandard an Empfindlichkeit. Hier gab es kürzlich einen Technologiesprung, in dessen Folge diese Geräte Detektions- und Quantifikationsgrenzen im einstelligen Femtomol- und bisweilen sogar im zwei- bis dreistelligen Attomol-Bereich aufweisen. Damit kommen diese Geräte in einen Bereich, der auch für die Analyse relativ seltener RNA-Spezies interessant ist. Zur Einschätzung: Je nach Zell- oder Gewebetyp ergeben 1 g Zellen (10^9 Zellen) etwa 100 µg totale RNA, wovon etwa zehn Prozent totale tRNAs etwa 4 nmol eines Gemischs von etwa 40 tRNA-Spezies darstellen. Moderne Geräte könnten also aus einer solchen Präparation beispielsweise nichtkodierende RNAs (ncRNAs) analysieren, deren Kopienzahlen um einen Faktor 10^5 unterhalb der einer einzelnen tRNA-Spezies liegen, vorausgesetzt, diese ncRNAs lassen sich sauber isolieren.

Das steigende Interesse an Nucleosidmodifikationen rückt auch tRNAs wieder in den Fokus, die als am stärksten modifizierten RNAs überhaupt gelten. Neue Arbeiten, die auf Massenspektrometrie basieren, zeigten, dass die komplexe Modifikationsausstattung von tRNAs je nach Spezies, Zelltyp und Umwelteinfluss variiert. Die Gruppe um Carell hat in einer Quantifizierung unter Zuhilfenahme von isopenmarkierten Standards Modifikationsprofile von tRNA-Populationen aus verschiedenen Spezies erstellt und aufgrund dieser Daten deren Phylogenie nachvollzogen.¹²⁾ Mit der gleichen Methode erstellte sie Modifikationsprofile aus verschiedenen Gewebetypen, die na-

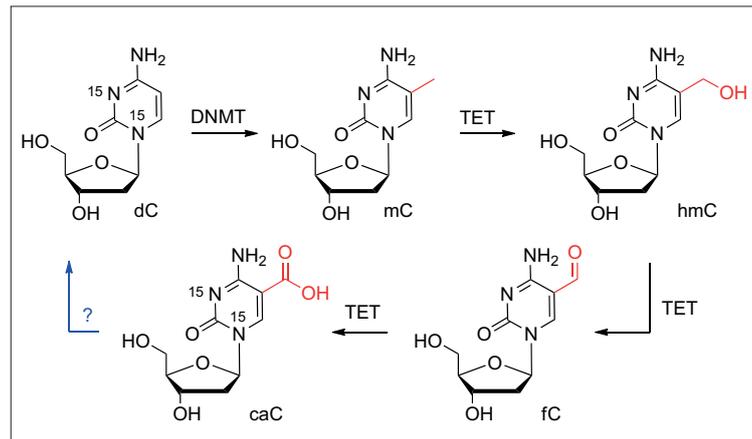


Abb. 2. Die in Stammzellen gefundene Oxidation von mC zu hmC, fC und caC mit TET-Enzymen. Umsetzung von [^{15}N] $_2$ -caC-enhaltenden Oligonucleotiden mit Stammzell-extrakten und Nachweis von [^{15}N] $_2$ -C in der Probe erbrachte den Beweis, dass caC zu C decarboxylieren kann (blauer Pfeil).

helegen, dass tRNAs aus Zellen mit hoher Proteinsyntheseaktivität ein besonders ausgeprägtes Modifikationsmuster zeigen.¹³⁾

Dass tRNA-Modifikationsprofile sich dynamisch unter dem Einfluss von oxidativem Stress und im Zusammenspiel mit Komponenten der DNA-Reparatur verändern, zeigten die Gruppen von Begley und Dedon.¹⁴⁾ Hierbei trat ein besonderer Einfluss von $m^5\text{C}$ in tRNAs auf die Translation bestimmter mRNA hervor.^{14b)}

Die Gruppe um Lyko stellte ein Zusammenspiel zweier $m^5\text{C}$ -Methyltransferasen bei der Regulation der Proteinbiosynthese in der Maus fest.¹⁵⁾ Dies geschieht vermutlich durch einen kooperativen Einfluss der resultierenden Methylierungen auf die Stabilität einer Untergruppe von tRNA-Spezies, die damit zu einem limitierenden Faktor der Proteinbiosynthese werden.

Eine weitere Arbeit der Carell-Gruppe identifizierte eine enzymatische Aktivität in einem Proteinextrakt aus embryonalen Mausstammzellen, welche 5-Carboxycytosin (caC) in Cytosin umwandelt.³⁾ Weil mehrere alternative Mechanismen in der Literatur diskutiert werden,⁴⁾ besteht das Kernstück dieser Arbeit aus dem Einsatz eines zweifach mit ^{15}N markierten caC-Substrats, das über Phosphoramiditsynthese in ein Oligodesoxynucleotidsubstrat eingebaut wurde.

Nach Inkubation mit dem Proteinextrakt wurde die DNA isoliert und einer Nucleosidanalyse per HPLC-MS unterzogen. Ein hochauflösendes Orbitrap-Massenspektrometer zeigte, dass die Nucleobase des entstehenden Cytosins die Stickstoffmarkierung noch enthält, wodurch ein Basenaustausch ausgeschlossen ist (Abbildung 2). Dementsprechend war eine direkte Decarboxylierung nachweisbar, deren Katalyse höchstwahrscheinlich durch eine Michaeladdition an die 5,6-Doppelbindung des Pyrimidinrings eingeleitet wird.

Kleine und mittlere Oligonucleotide nach Nucleasefragmentierung

◆ Aus dem Labor von David Liu kam im vergangenen Jahr die aufsehenerregende Entdeckung von geranylierten Uridinen an der Wobble-Position 34 von tRNA^{Glu}_{UUC} und weiterer tRNAs. Diese sind offenbar eine Subpopulation mehrerer differenziell modifizierter tRNAs aus *E. coli* und möglicherweise mit Membranen assoziiert.¹⁶⁾ Ungewöhnlich an der Methode, die letztendlich zur Entdeckung der Geranylierung – inklusive Vollsynthese, Kristallstruktur und Aufklärung der Biogenese der Modifikation – führte, ist ein nicht ganz vollständiger Verdau mit Nuclease P1 und eine anschließende Auftrennung per Umkehrphase eines Ge-

mischs aus Mono- und Dinukleotiden relativ kleiner Masse (Abbildung 3).

Diese besondere Vorgehensweise erlaubte es auch besonders lipophile Nukleotide zu erfassen, die bei oben beschriebenen Standardanalysen nicht effizient erfasst werden. Für eine Strukturanalyse mit MS³-Techniken diente eine UPLC-Quadrupol-TOF-Kombination. Zur Identifizierung des lipophilen Nukleotids wurden RNAs aus Bakterienkulturen in ¹³C- und ¹⁵N-haltigen Medien verwendet, um die Summenformel der unbekanntem Modifikation zu erhalten. Dadurch wurde klar, dass es sich bei dem neuen Nukleotid um das bekannte mnm⁵s²U (Abbildung 3 oben) mit einer zusätzlichen Geranyl-Funktion handelte. Die Position von mnm⁵ges²U in der tRNA wurde anhand von Fragmenten eines RNase T1-Verdau ermittelt. RNase T1 schneidet den RNA-Strang nach jedem ungepaarten Guanosin und erzeugt so aus einer RNA bekannter Sequenz eindeutig zuzuordnende Oligonukleotid-Fragmente. Das MS/MS-Spektrum des RNase-T1-Ver-

daus zeigt überwiegend c- und y-Ionenfragmente (Definition siehe Abbildung 1c) des entsprechenden kurzen Oligonukleotids. Nach Auswertung und Interpretation des Spektrums wurde das neue modifizierte Nukleotid mnm⁵ges²U an Position 34 der isolierten tRNA^{Glu}_{UUC} eingeordnet.

Isotopenbasierte Methoden eröffnen auch bei Oligonukleotiden besondere Möglichkeiten der Analytik. Die Gruppe um Limbach entwickelte eine Methode, RNA-Fragmente, die während der gezielten Fragmentierung durch RNase T1 entstehen, mit isotopenreinem ¹⁸O- oder ¹⁶O-Wasser spezifisch zu markieren. Aufgrund des katalytischen Mechanismus von RNase T1, der über ein cyclischen Phosphordiester verläuft, wird die Sauerstoffmarkierung spezifisch am 3'-Ende des neu generierten Fragmentes eingebaut. Sie erleichtert dadurch Identifikation und Zuordnung von Fragmenten und Ionen und ermöglicht in einem Bottom-Up-Schema die Rekonstruktion einer tRNA-Sequenz und ihrer Nukleotidmodifikationen durch Ver-

gleich mit einer ähnlichen RNA bekannter Sequenz.¹⁷⁾

Top-down-Massenspektrometrie von modifizierter RNA

◆ Während Top-down-MS eine weit verbreitete Form der Proteinsequenzanalytik ist, findet sie bisher erstaunlich wenig Anwendung in der RNA-Analytik. Umfangreiche Untersuchungen zur Top-down-MS von RNA im Labor von Kathrin Breuker zeigen deren weitreichende Anwendungsmöglichkeiten. Zum einen kann Top-down-MS Pseudouridine in kleinen 22-nt-Oligonukleotiden gleichzeitig identifizieren, lokalisieren und relativ quantifizieren.¹⁸⁾ Zum anderen lassen sich die gesamte Sequenzinformation sowie Identität und Position von modifizierten Nukleotiden in tRNA durch diese Form der Analytik gewinnen.¹⁹⁾

Ihren hohen Informationsgehalt erreicht die Top-down-MS-Analytik durch die Kombination spezieller Fragmentierungstechniken mit einem hochauflösenden und sehr

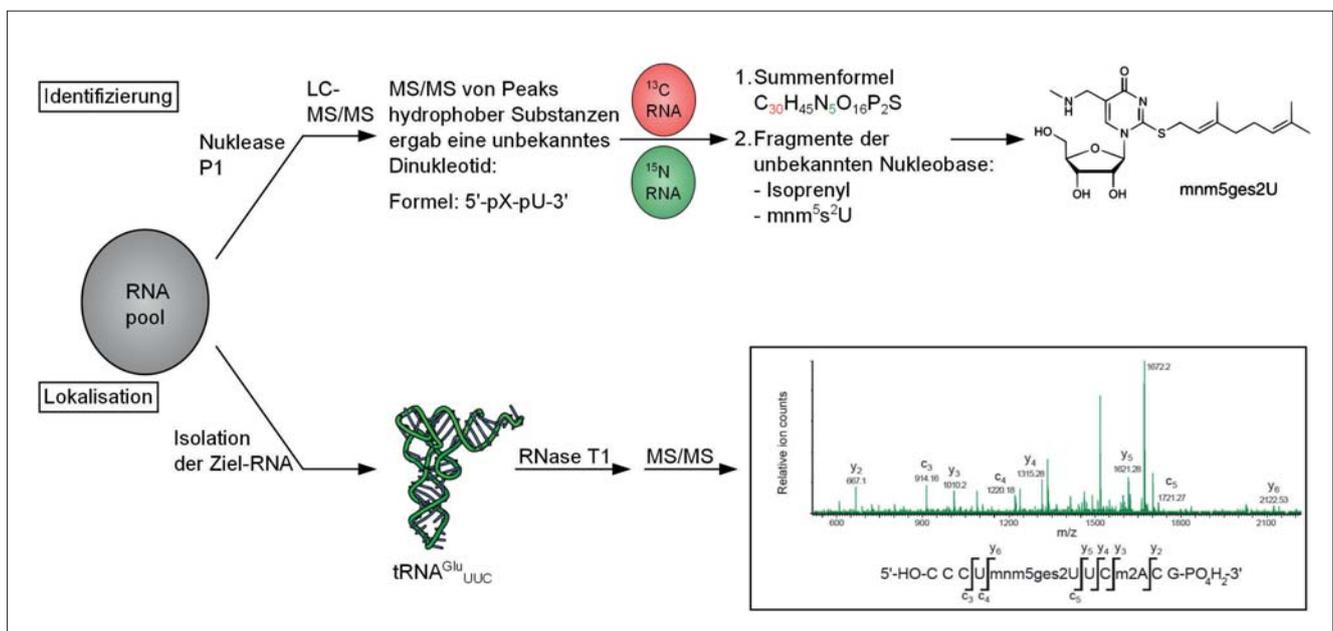


Abb. 3. Identifikation und Lokalisation unbekannter modifizierter Nucleotide. Oben: Gesamt-RNA wird mit Nuklease P1 verdaut, wobei Mononucleotide und Dinucleotide entstehen. Diese werden anschließend chromatographisch getrennt und massenspektrometrisch untersucht. Der spät eluierende Peak einer stark hydrophoben Verbindung mit der Masse eines uridinhaltigen Dinucleotids war Ausgangspunkt umfassender Untersuchungen. RNA, isoliert aus Bakterienkulturen in ¹³C- und ¹⁵N-Wachstumsmedium erlaubt eine Bestimmung der Summenformel des Dinucleotids. Durch weitere Fragmentierungen, etwa MS², war es möglich die Masse der unbekanntem Nucleobase und durch MS³ deren Fragmente zu identifizieren. Die Nucleobase mnm⁵ges²U ist demnach das bekannte modifizierte Nucleosid mnm⁵s²U, an dem ein Geranylrest an den Schwefel gebunden vorliegt. Unten: Lokalisation des neuen modifizierten Nucleotids an Position 34 (Wobbe-Position) von beispielsweise tRNA^{Glu}_{UUC} durch RNase T1-Verdau in kurze Oligonucleotide und anschließende MS/MS-Untersuchung der RNA-Fragmente.¹⁶⁾

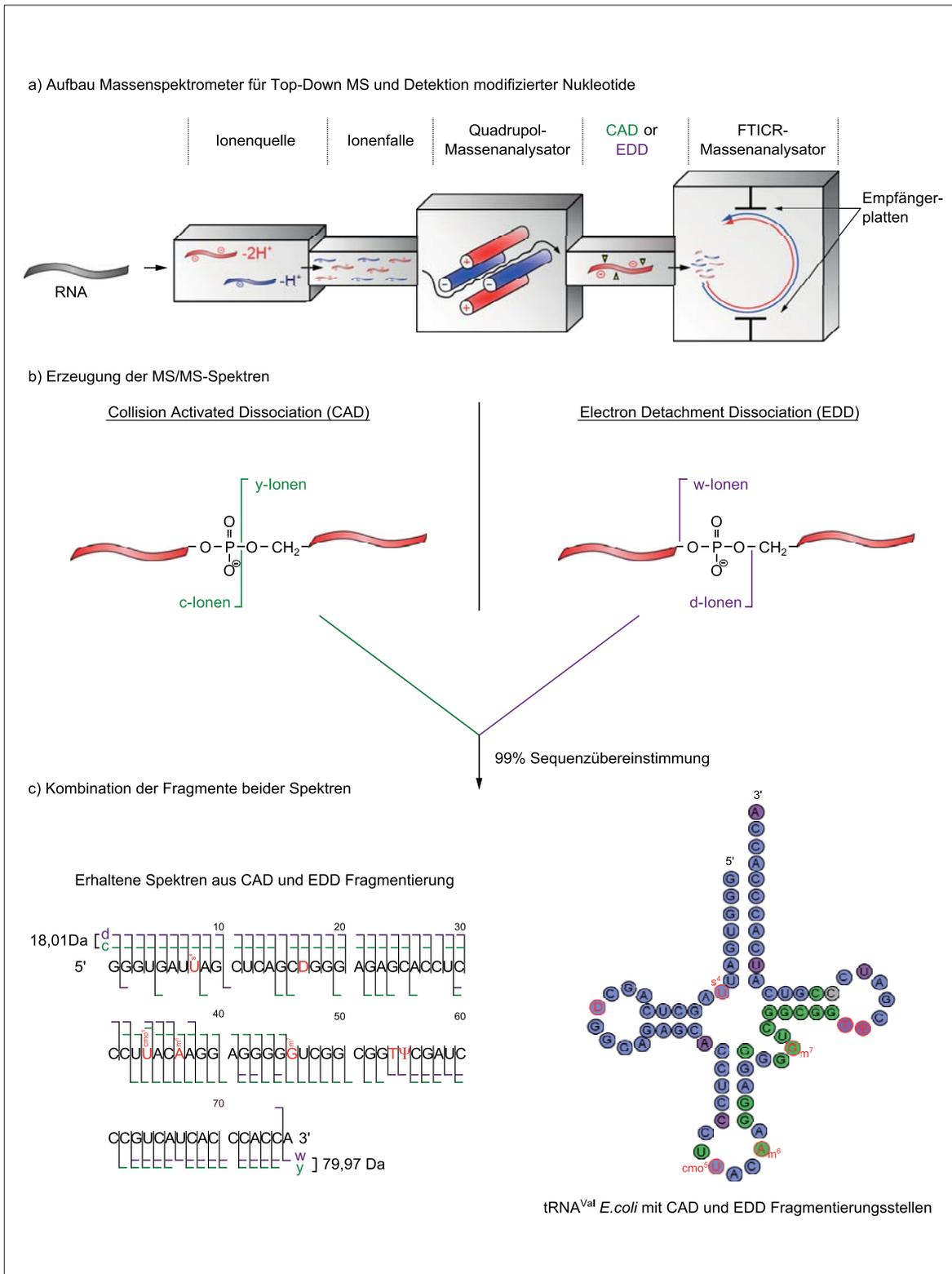


Abb. 4. a) Aufbau eines Massenspektrometers zur Top-down-MS-Analytik von RNA. Die unverdaute RNA wird in der Ionenquelle durch Protonenentzug (mehrfach) ionisiert und in der anschließenden Ionenfalle angereichert. Im Quadrupol-MS erfolgt dann die Auswahl der Precursorionen für CAD- oder EDD-Fragmentierung. Die Produktionen werden dann im hochauflösenden FTICR anhand ihrer Frequenz registriert. b) Typische Fragmentierungsstellen von CAD- und EDD-Fragmentierungstechniken. c) Auswertung der CAD- und EDD-Spektren von tRNA^{Val} aus *E. coli* ergibt eine 99%ige Sequenzübereinstimmung. Auf der linken Seite ist die vollständige Sequenz mit allen produzierten und detektierten Fragmentionen aus CAD und EDD Fragmentierung dargestellt. Rechts ist die untersuchte tRNA abgebildet. Blau markierte Nucleotide: An dieser Stelle werden sowohl CAD- als auch EDD-Ionen gefunden. Grün markierte Nucleotide: nur CAD-Ionen. Violett markierte Nucleotide: nur EDD-Ionen. Rot: gefundene modifizierte Nucleotide. Die Strukturen der auf der tRNA eingezeichneten modifizierten Nucleoside zeigt Abbildung 1a.

schnellen Massenanalysator (Abbildung 4a, S. 311). Die unverdaute, RNA-haltige Probe wird mit einer HPLC-Anlage oder einer Spritzenpumpe in die Elektrospray-Ionenquelle (ESI) überführt. Hier wird die RNA durch Entzug von Protonen negativ ionisiert und in der direkt anschließenden Ionenfalle angereichert. Ein folgender Quadrupol-Massenanalysator dient der Selektion der Precursor-Ionen für die anschließenden Fragmentierungsreaktionen. Collision-Activated-Dissociation (CAD) wird in der Ionenfalle mit Argon und Spannungen von -90 V erzeugt. Für diese Fragmentierungsreaktionen müssen Precursor-Ionen mit zirka 0,2 Ladungen je Nukleotid gewählt werden, um zuverlässig RNA-Fragmentierungen in c- und y-Ionen zu erhalten (Abbildung 4b).

Für eine vollkommene Sequenzabdeckung ist das Gerät zusätzlich mit einem IR-Laser zur Fragmentierung per Electron-Detachment-Dissociation (EDD) ausgestattet. EDD produziert fast ausschließlich w- und d-Ionen, wenn Precursor-Ionen mit zirka 0,5 Ladungen je Nukleotid ausgewählt wurden. Die Fragmentationen erreichen dann den Fourier-Transform-Ion-Cyclotron-Resonance (FTICR)-Massenanalysator. Hier bringen ein magnetisches und elektrisches Feld die Ionen in eine Orbitalbahn. Das Spektrum wird zunächst als Frequenz der Ionen durch einen gepulsten Wechselstromimpuls an den Empfängerplatten registriert und anschließend durch Fourier-Transformation in das Spektrum umgerechnet.

Das FTICR ist aufgrund der Registrierung der Ionen als Frequenz und nicht als m/z in der Lage, schnell und exakt einen weiten Frequenzbereich zu scannen und hochauflösende Spektren zu erzeugen. Diese unter allen Massenanalysatoren einzigartige Messtechnik ermöglicht schnell und mit geringen Probenmengen Top-down-Analytik von RNA und Proteinen. Die Kombination der Spektren aus CAD- und EDD-fragmentierten RNA-Ionen ermöglicht es, die de-

tektierten Ionen der RNA-Sequenz zuzuordnen, da sich beispielsweise y- und w-Ionen um genau 79,97 Da (HPO_3) unterscheiden und c- und d-Ionen um genau 18,01 Da (H_2O). Abbildung 4c zeigt eine solche Ionenzuordnung von tRNA^{Val} aus *E. coli*. In der 2D-Struktur wird deutlich, dass fast alle Positionen der tRNA durch CAD und EDD fragmentiert sind (blaue Nukleotide). Nur wenige wurden entweder durch CAD (grüne Nukleotide) oder EDD (lila Nukleotide) alleine fragmentiert. Die gezeigte Sequenzierung und Zuordnung aller modifizierter Nukleotide in tRNA^{Val} *E. coli* wurde mit einer $2 \mu\text{M}$ tRNA-Lösung durchgeführt.

Fazit und Ausblick

◆ Fortschritte in der Chemie und Biochemie von natürlich modifizierten Nucleinsäuren gehen mit aktuellen Entwicklungen der Massenspektrometrie Hand in Hand. Dieser Flaschenhals bietet auch in naher Zukunft Raum für Fortschritte in beiden Feldern.

Mark Helm, Jahrgang 1969, ist seit dem Jahr 2009 Professor für pharmazeutische/medizinische Chemie an der Universität Mainz. Er promovierte im Jahr 1999 in Molekularbiologie an der Universität Straßburg. Es folgten Postdoktorate am California Institute of Technology und an der FU Berlin. Danach war er Forschungsgruppenleiter in der Abteilung Chemie am Institut für Pharmazie und molekulare Biotechnologie der Universität Heidelberg, wo er sich im Jahr 2008 in Pharmazeutischer Chemie und Biochemie habilitierte. Seine Forschungsgebiete: Ribonukleotidmodifikationen, Strukturdynamik von RNAs, Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von siRNA, RNA-Biokonjugate. mhelm@uni-mainz.de



Stefanie Kellner, Jahrgang 1984, studierte Pharmazie in Heidelberg. Die anschließende Promotion im Arbeitskreis von Mark Helm behandelte die Funktionalisierung und Detektion von RNA und ihren Modifikationen. Derzeit beschäftigt sie sich mit der massenspektrometrischen Untersuchung und Quantifizierung von modifizierten Nucleinsäuren.



Literatur

- 1) G. R. Wyatt, *Nature* 1950, 166, 237.
- 2) a) M. A. Machnicka, K. Milanowska, O. Osman Oglou, E. Purta, M. Kurkowska, A. Olchowik, W. Januszewski, S. Kalinowski, S. Dunin-Horkawicz, K. M. Rother, M. Helm, J. M. Bujnicki, H. Grosjean, *Nucl. Acids Res.* 2013, 41 (D1), D262-D267; b) T. Carell, C. Brandmayr, A. Hienzsch, M. Muller, D. Pearson, V. Reiter, I. Thoma, P. Thumbs, M. Wagner, *Angew. Chem.* 2012, 124, 7220.
- 3) S. Schiesser, B. Hackner, T. Pfaffeneder, M. Muller, C. Hagemeyer, M. Truss, T. Carell, *Angew. Chem.* 2012, 124, 6622.
- 4) C. Höbartner, *Nachr. Chem.* 2012, 60, 308.
- 5) G. Jia, Y. Fu, X. Zhao, Q. Dai, G. Zheng, Y. Yang, C. Yi, T. Lindahl, T. Pan, Y. G. Yang, C. He, *Nat. Chem. Biol.* 2011, 7, 885.
- 6) a) K. D. Meyer, Y. Saletore, P. Zumbo, O. Elemento, C. E. Mason, S. R. Jaffrey, *Cell* 2012, 149, 1635; b) D. Dominissini, S. Moshitch-Moshkovitz, S. Schwartz, M. Salmon-Divon, L. Ungar, S. Osenberg, K. Cesarkas, J. Jacob-Hirsch, N. Amariglio, M. Kupiec, R. Sorek, G. Rechavi, *Nature* 2012, 485, 201.
- 7) Y. Saletore, K. Meyer, J. Korlach, I. D. Vilfan, S. Jaffrey, C. E. Mason, *Genome Biol.* 2012, 13, 175.
- 8) M. Helm, M. Morl, P. F. Stadler, S. Hoffmann, *Nachr. Chem.* 2012, 60, 300.
- 9) C. Wetzel, P. A. Limbach, *J. Proteomics* 2012, 75, 3450.
- 10) G. E. Davis, R. D. Suits, K. C. Kuo, C. W. Gehrke, T. P. Waalkes, E. Borek, *Clin. Chem.* 1977, 23, 1427.
- 11) S. C. Pomerantz, J. A. McCloskey, *Methods Enzymol.* 1990, 193, 796.
- 12) D. Globisch, D. Pearson, A. Hienzsch, T. Bruckl, M. Wagner, I. Thoma, P. Thumbs, V. Reiter, A. C. Kneuttinger, M. Muller, S. A. Sieber, T. Carell, *Angew. Chem.* 2011, 123, 9913.
- 13) C. Brandmayr, M. Wagner, T. Bruckl, D. Globisch, D. Pearson, A. C. Kneuttinger, V. Reiter, A. Hienzsch, S. Koch, I. Thoma, P. Thumbs, S. Michalakakis, M. Muller, M. Biel, T. Carell, *Angew. Chem.* 2012, 124, 11324.
- 14) a) A. Patil, M. Dyavaiah, F. Joseph, J. P. Rooney, C. T. Chan, P. C. Dedon, T. J. Begley, *Cell Cycle* 2012, 11, 3656; b) C. T. Chan, Y. L. Pang, W. Deng, I. R. Babu, M. Dyavaiah, T. J. Begley, P. C. Dedon, *Nat. Commun.* 2012, 3, 937.
- 15) F. Tuorto, R. Liebers, T. Musch, M. Schaefer, S. Hofmann, S. Kellner, M. Frye, M. Helm, G. Stoecklin, F. Lyko, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012, 19, 900.
- 16) C. E. Dumelin, Y. Chen, A. M. Leconte, Y. G. Chen, D. R. Liu, *Nat. Chem. Biol.* 2012, 8, 913.
- 17) S. Li, P. A. Limbach, *Anal. Chem.* 2012, 84, 8607.
- 18) M. Taucher, B. Ganisl, K. Breuker, *Int. J. Mass. Spectrom.* 2011, 304, 91.
- 19) M. Taucher, K. Breuker, *Angew. Chem.* 2012, 124, 11451.