

Parallele isotopenbasierte Quantifizierung modifizierter tRNA-Nucleoside**

Tobias Brückl, Daniel Globisch, Mirko Wagner, Markus Müller und Thomas Carell*

Transfer-RNAs (tRNAs) sind Adaptermoleküle, die die am Ribosom ablaufende Translation des genetischen Codes in Peptidsequenzen vermitteln. Menschliche Zellen enthalten 49 unterschiedliche Isoakzeptor-tRNAs, die am 3'-Ende eine spezifische Aminosäure tragen.^[1] Alle tRNA-Moleküle bestehen aus 70–100 Ribonucleotiden, von denen bis zu 20 % modifiziert sind. Die große Zahl von Modifikationen (> 95), die bis heute bekannt sind,^[2,3] und insbesondere ihre strukturelle Vielfalt birgt eine zweite Ebene der molekularen Information, die vermutlich für den Decodierungsprozess notwendig ist.^[4] Bis heute stehen nur begrenzt Informationen zur Verfügung, wie diese Modifikationen die Translation der genetischen Information,^[5] die Faltung^[4,6] und die Funktion der tRNA^[7] beeinflussen.

Ein zentraler wissenschaftlicher Ansatz der „Oomics“-Forschung besteht darin, die zellulären Bestandteile nicht individuell, sondern aus ihrem Zusammenhang heraus zu untersuchen.^[8] Unserer Meinung nach ist eine Methode zur quantitativen Analyse von modifizierten tRNA-Nucleosiden notwendig.^[3,9] In der Literatur gibt es Hinweise, dass Tumorzellen eine andere Zusammensetzung an tRNA-Modifikationen als normale Zellen aufweisen,^[10,11] insbesondere in den Mitochondrien.^[12] Eine solche Methode würde zur besseren Charakterisierung von Tumorzellen beitragen und könnte einen tieferen Einblick in den Stoffwechsel von Tumorzellen ermöglichen.^[11] Hier berichten wir über eine isotopenbasierte, massenspektrometrische Methode, die die direkte und parallele Quantifizierung von grundsätzlich allen tRNA-Modifikationen mit höchster Empfindlichkeit ermöglicht. Erste Daten zeigen eine überraschend große Variation zwischen unterschiedlichen Tumorzellen, genauso wie zwischen Tumorzellen und gesundem Gewebe.

Die Methode ist in Abbildung 1 dargestellt. Die gesamte tRNA wird hierbei nach einem modifizierten Literaturprotokoll aus den Zellen oder dem Gewebe isoliert^[13] und anschließend vollständig verdaut, wobei eine Mischung aus allen tRNA-Nucleosiden erhalten wird.^[14] Zur Quantifizie-

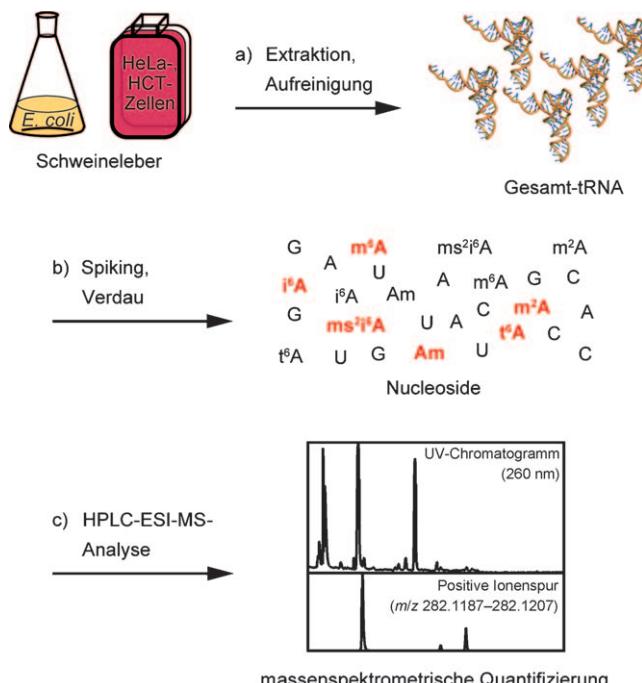


Abbildung 1. Prinzip der Methode zur quantitativen Analyse von modifizierten tRNA-Nucleosiden. a) Extraktion: Phenol-Extraktion; Aufreinigung: PD10-Chromatographie, Anionenaustauschchromatographie; b) Spiking: Zugabe von isotopenmarkierten Standards; Verdau: enzymatischer Verdau der gesamten tRNA; schwarze Symbole kennzeichnen natürliche Nucleoside, rote Symbole zugesetzte, isotopenmarkierte Nucleoside; c) HPLC-ESI-MS-Analyse: chromatographische Trennung und massenspektrometrische Analyse (experimentelle Details in den Hintergrundinformationen).

rung bestimmter Modifikationen wurden isotopenmarkierte modifizierte tRNA-Nucleoside synthetisiert und zum Verdau hinzugefügt. Messungen von Kalibriergeraden für jede einzelne Modifikation ermöglichen eine exakte Quantifizierung. Zur Entwicklung der Methode quantifizierten wir zunächst die tRNA-Modifikationen m^6A , m^2A , Am, t^6A , i^6A und $ms^{2,6}A$,^[15] da diese Modifikationen hauptsächlich 3'-benachbart zum Anticodon vorkommen^[2,3] und dadurch höchstwahrscheinlich direkt am Decodierungsprozess beteiligt sind.^[16] Das Nucleosid $ms^{2,6}A$ ist von besonderem Interesse, weil es nur in Prokaryoten und mitochondrialer tRNA vorkommt.^[2,3] Deshalb könnte eine Untersuchung dieses Nucleosids einen Einblick in die Mitochondrien-Aktivität einer Zelle geben. Alle genannten modifizierten Nucleoside wurden als isotopenmarkierte (*) Derivate synthetisiert, wie in Abbildung 2 gezeigt.^[17] Die verdaute tRNA-Probe mit den

[*] T. Brückl,^[14] D. Globisch,^[14] M. Wagner, Dr. M. Müller, Prof. Dr. T. Carell
Center for Integrated Protein Science (CiPSM)
Department Chemie und Biochemie, LMU München
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-77756
E-Mail: thomas.carell@cup.uni-muenchen.de

[†] Diese Autoren haben den gleichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet.

[**] Wir danken dem CiPSM Cluster, dem SFB 749, dem Fonds der Chemischen Industrie und Bayer-Schering für finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200902740> zu finden.

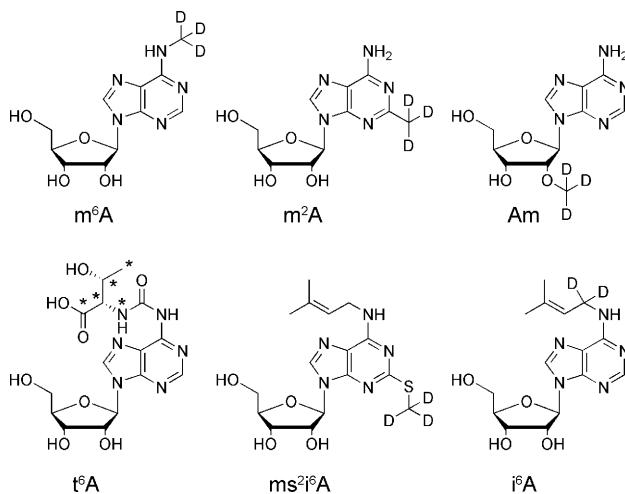


Abbildung 2. Schweratommarkierte Adenosin-Modifikationen, die in dieser Studie untersucht wurden. Sterne (*) markieren ein ¹⁵N- oder ¹³C-Atom; D = Deuterium. Basenmodifizierte Nucleoside kommen 3'-benachbart zum Anticodon in Position 37 vor. Das ribosemodifizierte Nucleosid Am ist in Position 4 der tRNA vorhanden.

zugesetzten isotopenmarkierten Nucleosiden wird anschließend mit HPLC-ESI-MS analysiert.

Typische UV-Spuren für *E. coli* und Schweineleber sind in Abbildung 3a und b dargestellt. Neben den dominanten Signalen der kanonischen RNA-Nucleoside sind die modifizierten Nucleoside entweder als kleine Signale zu erkennen oder in der Grundlinie versteckt. Die eindeutige Zuordnung der Modifikationen erfolgt durch MS-Analyse. In Abbildung 3c sind als Beispiel die Ionenspuren von m²A und m⁶A im Vergleich mit den zugesetzten, isotopenmarkiert synthetisierten Derivaten dargestellt. Wegen der Massendifferenz erscheinen die Massenspektren als zwei getrennte Signale und können durch Integration der Flächen unter den Massensignalen quantifiziert werden. Die hohe Qualität der erhaltenen Daten mit einer mittleren Standardabweichung von nur 5 % beweist, dass die Isotopenverdünnungsmethode für die Analyse von tRNA-Modifikationen angewendet werden kann, sofern die isotopenmarkierten modifizierten tRNA-Nucleoside verfügbar sind.^[18]

Mit der neuen Methode zur tRNA-Analyse begannen wir Untersuchungen, wie sich die Modifikationszusammensetzungen von verschiedenen Tumorzelllinien und von gesundem Gewebe unterscheiden. In einem ersten Test untersuchten wir die menschlichen Epithel-Zelllinien HCT-116 und HeLa, die aus einem kolorektalen Tumor bzw. aus einem Adenokarzinom des Gebärmutterhalses gewonnen wurden. Zum Vergleich haben wir zusätzlich die Modifikationszusammensetzung von Schweineleber und *E. coli* analysiert. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Abbildung 4 zusammengefasst. In Übereinstimmung mit Literaturdaten konnten wir die Modifikation m²A nur in *E. coli*, nicht aber in eukaryotischen Zellen finden. Demgegenüber kommt die Modifikation Am^[19] nur in eukaryotischen Zellen vor.^[2,3,20] Zu unserer Überraschung entdeckten wir, dass die Stoffmenge von t⁶A in gesunder Schweineleber geringer ist als in beiden Tumorzelllinien. Dies deutet auf eine mögliche Hochregu-

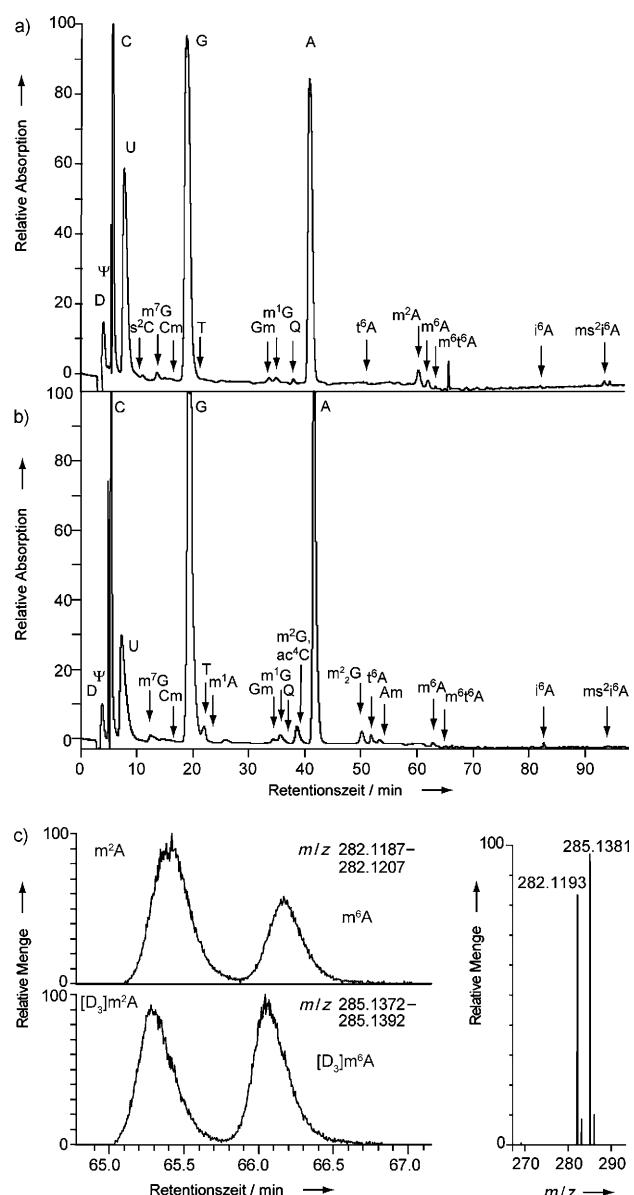


Abbildung 3. a,b) HPL-Chromatogramme des tRNA-Verdaus von *E. coli* ($\lambda = 260 \text{ nm}$) (a) und von Schweineleber ($\lambda = 260 \text{ nm}$) (b). c) Links: positive Ionenspuren der protonierten Nucleoside m²A und m⁶A mit den entsprechenden isotopenmarkierten Derivaten; rechts: entsprechende hochaufgelöste massenspektrometrische Daten für das natürliche und markierte Nucleosid m²A.

lierung der Biosynthese dieser Modifikation in den Zelllinien HeLa und HCT-116 hin. Weitere deutliche Unterschiede zwischen den Tumorzelllinien wurden für m⁶A und i⁶A beobachtet. HeLa-Zellen enthalten doppelt so viel m⁶A wie HCT-116-Zellen oder Schweinelebergewebe. Von der Modifikation i⁶A enthalten sowohl HeLa-Zellen als auch gesundes Lebergewebe 30 % weniger als die HCT-116-Zellen. Diese Ergebnisse stützen die Annahme, durch Analyse von modifizierten tRNA-Nucleosiden zwischen Krebszellen und gesunden Zellen unterscheiden zu können. Darüber hinaus könnte sogar die Unterscheidung zwischen unterschiedlichen Krebszelllinien möglich sein – hierzu müsste die Analyse auf

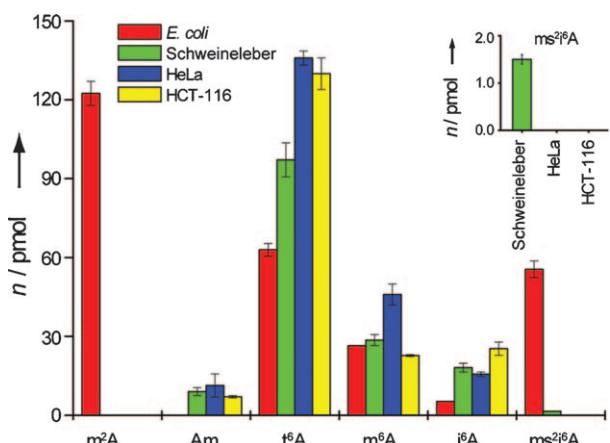


Abbildung 4. Stoffmengenvergleich der modifizierten Nucleoside in *E. coli* und Schweineleber sowie HeLa- und HCT-116-Zelllinien; Fehlerbalken stehen für die berechneten Standardabweichungen aus mehreren Experimenten.

eine größere Anzahl an modifizierten Nucleosiden ausgeweitet werden.

Als nächstes befassten wir uns mit der Frage, wie sich die tRNA-Zusammensetzung in den Mitochondrien ändert. Es ist seit längerem bekannt, dass Tumore eine reduzierte oxidative Phosphorylierungsaktivität haben und ihre Energie hauptsächlich aus der Glykolyse gewinnen,^[21,22] was mit einem reduzierten pH-Wert in Tumorgeweben einhergeht.^[21] Um dieses Phänomen zu untersuchen, wendeten wir die hier vorgestellte Isotopenmethode zur Quantifizierung des Nucleosids ms^2i^6A an.

Das Ergebnis dieser Analyse ist im Einschub von Abbildung 4 dargestellt. Wie erwartet, ist die Modifikation ms^2i^6A im Bakterium *E. coli* vorhanden. Sie ist außerdem in geringen, aber nachweisbaren Mengen in Schweineleber zu finden. Dass wir in der Lage sind, die Menge der mitochondrialen Modifikation ms^2i^6A zu bestimmen, belegt erneut die hohe Empfindlichkeit der isotopenbasierten Methode.

Überraschenderweise ergab die Analyse, dass die Modifikation ms^2i^6A in Tumorzellen nicht vorhanden ist. Dies zeigt, dass sich mitochondriale tRNAs in Tumorzellen und normalen Zellen eindeutig unterscheiden. Diese ersten Hinweise zeigen, dass eine veränderte Mitochondrien-Aktivität in Tumorzellen (Warburg-Hypothese)^[23] mithilfe unserer Isotopenmarkierungsmethode bestätigt werden kann.

Bislang stützt sich unsere Interpretation auf die Auswertung von erst sechs tRNA-Modifikationen, dennoch zeigen die Ergebnisse bereits deutlich, dass die beschriebene Isotopenmarkierungsmethode schnell quantitative Daten über Modifikationsmuster in tRNAs aus Zellen und Gewebe liefern kann. Auch die Quantifizierung von Modifikationen, die nur in Mitochondrien vorkommen, ist möglich. Davon ausgehend, dass unterschiedliche Spezies, unterschiedliche Säugetierge webe und unterschiedliche Tumorgewebe eine erheblich unterschiedliche Zusammensetzung an tRNA-Nucleosiden aufweisen,^[24] bietet die hier vorgestellte Isotopenmethode eine neue Möglichkeit für die detaillierte Zell- und Gewebeanalyse. Dieser wissenschaftliche Ansatz, für den wir den Namen „Modomics“ vorschlagen, könnte den Weg für

eine detaillierte Analyse der Funktion und Biosynthese von modifizierten tRNA-Nucleosiden ebnen.

Eingegangen am 22. Mai 2009
Online veröffentlicht am 11. September 2009

Stichwörter: Bioanalytische Verfahren · Centralsierung · Isotopenmarkierung · Modomics · tRNA

- [1] J. M. Goodenbour, T. Pan, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 6137–6146.
- [2] F. Juehling, M. Moerl, R. K. Hartmann, M. Sprinzl, P. F. Stadler, J. Puetz, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D159–D162; J. Rozenski, P. F. Crain, J. A. McCloskey, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 196–197; H. Grosjean, M. Sprinzl, S. Steinberg, *Biochimie* **1995**, *77*, 139–41.
- [3] A. Czerwoniec, S. Dunin-Horkawicz, E. Purta, K. H. Kaminska, J. M. Kasprzak, J. M. Bujnicki, H. Grosjean, K. Rother, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D118–D121.
- [4] M. Helm, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 721–733.
- [5] G. R. Bjork, J. M. B. Durand, T. G. Hagervall, R. Leipuviene, H. K. Lundgren, K. Nilsson, P. Chen, Q. Qian, J. Urbonavicius, *FEBS Lett.* **1999**, *452*, 47–51; E. M. Gustilo, F. A. P. Vendeix, P. F. Agris, *Curr. Opin. Microbiol.* **2008**, *11*, 134–140; W. F. Waas, Z. Druzina, M. Hanan, P. Schimmel, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 26026–26034.
- [6] L. Randau, B. J. Stanley, A. Kohlway, S. Mechta, Y. Xiong, D. Soell, *Science* **2009**, *324*, 657–659.
- [7] U. Z. Littauer, H. Inouye, *Annu. Rev. Biochem.* **1973**, *42*, 439–70; B. C. Persson, *Mol. Microbiol.* **1993**, *8*, 1011–16; M. Buck, B. N. Ames, *Cell* **1984**, *36*, 523–31.
- [8] R. Aebersold, M. Mann, *Nature* **2003**, *422*, 198–207; B. F. Cravatt, G. M. Simon, J. R. Yates III, *Nature* **2007**, *450*, 991–1000; L. Assogba, A. Ahamada-Himidi, N. M. B. Habich, D. Aoun, L. Boukli, F. Massicot, C. M. Mounier, J. Huet, A. Lamouri, J. E. Ombetta, J. J. Godfroid, C. Z. Dong, F. Heymans, *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 850–861; S. Broder, J. C. Venter, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 581–585; D. J. Lockhart, E. A. Winzeler, *Nature* **2000**, *405*, 827–836.
- [9] H. Grosjean, C. Gaspin, C. Marck, A. Decatur Wayne, V. de Crecy-Lagard, *BMC Genomics* **2008**, *9*, 470.
- [10] G. Dirheimer, W. Baranowski, G. Keith, *Biochimie* **1995**, *77*, 99–103.
- [11] A. Frickenschmidt, H. Froehlich, D. Bullinger, A. Zell, S. Laufer, C. H. Gleiter, H. Liebich, B. Kammerer, *Biomarkers* **2008**, *13*, 435–449.
- [12] K. Watanabe, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2007**, *80*, 1253–1267.
- [13] M. Buck, M. Connick, B. N. Ames, *Anal. Biochem.* **1983**, *129*, 1–13.
- [14] P. F. Crain, *Methods Enzymol.* **1990**, *193*, 782–90.
- [15] Abkürzungen: m^6A : N^6 -Methyladenosin, m^2A : 2-Methyladenosin, Am: 2'-O-Methyladenosin, t^6A : N^6 -Threonylcarbamoyl-adenosin, ms^2i^6A : 2-Methylthio- N^6 -isopentenyladenosin, i^6A : N^6 -Isopentenyladenosin.
- [16] F. V. Murphy, V. Ramakrishnan, A. Malkiewicz, P. F. Agris, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 1186–1191; J. M. B. Durand, G. R. Bjork, A. Kuwae, M. Yoshikawa, C. Sasakawa, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 5777–5782.
- [17] Über die Synthese der isotopenmarkierten Verbindungen werden wir an anderer Stelle berichten. Beispiele für tRNA-Nucleosid-Synthesen: C. Hoebartner, C. Kreutz, E. Flecker, E. Ottenschlaeger, W. Pils, K. Grubmayr, R. Micura, *Monatsh. Chem.* **2003**, *134*, 851–873; M. Sundaram, P. F. Crain, D. R. Davis, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5609–5614; R. M. Hyde, A. D. Broom, R. W. Buckheit, Jr., *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1878–1885;

- K. Hirota, Y. Kitade, Y. Kanbe, Y. Maki, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5268–70; M. H. Fleysher, *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 187–91; E. Kierzek, R. Kierzek, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 4461–4471; F. Klepper, E.-M. Jahn, V. Hickmann, T. Carell, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2377–2379; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2325–2327; T. Brückl, F. Klepper, K. Gutsmiedl, T. Carell, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3821–5.
- [18] J. J. Dalluge, T. Hashizume, J. A. McCloskey, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3242–3245. Isotopenmarkierte tRNA-Nukleoside können vom Korrespondenzautor dieser Studie (T.C.) bezogen werden.
- [19] M. L. Wilkinson, S. M. Crary, J. E. Jackman, E. J. Grayhack, E. M. Phizicky, *RNA* **2007**, *13*, 404–413.
- [20] C. W. Gehrke, K. C. Kuo, *J. Chromatogr.* **1989**, *471*, 3–36.
- [21] R. A. Gatenby, R. J. Gillies, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 891–899.
- [22] I. Samudio, M. Fiegl, M. Andreeff, *Cancer Res.* **2009**, *69*, 2163–2166; C. Frezza, E. Gottlieb, *Semin. Cancer Biol.* **2009**, *19*, 4–11; V. Gogvadze, S. Orrenius, B. Zhivotovsky, *Trends Cell Biol.* **2008**, *18*, 165–173.
- [23] M. A. Kiebish, X. Han, H. Cheng, J. H. Chuang, T. N. Seyfried, *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 2545–2556.
- [24] M. W. Taylor, G. A. Granger, C. A. Buck, J. J. Holland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, *57*, 1712–19; A. Costa, J.-P. Pais de Barros, G. Keith, W. Baranowski, J. Desgres, *J. Chromatogr. B* **2004**, *801*, 237–247.