

# Eine isotopebasierte Analyse modifizierter tRNA-Nukleoside korreliert die Modifikationsdichte mit der Translationseffizienz\*\*

Caterina Brandmayr, Mirko Wagner, Tobias Brückl, Daniel Globisch, David Pearson, Andrea Christa Kneutinger, Veronika Reiter, Antje Hienzsch, Susanne Koch, Ines Thoma, Peter Thumbs, Stylianos Michalakis, Markus Müller, Martin Biel und Thomas Carell\*

Transfer-RNAs (tRNAs) sind Adaptermoleküle für die Übersetzung der genetischen Information in eine Peptidsequenz.<sup>[1]</sup> Am Ribosom erkennt das Antikodon einer tRNA das passende Kodon der Boten-RNA (mRNA). Diese Kodon-Antikodon-Interaktion ermöglicht es der großen Untereinheit des Ribosoms, die Bildung einer Amidbindung zwischen der Aminosäure am 3'-Ende der Aminoacyl-tRNA und der wachsenden Polypeptidkette zu katalysieren.<sup>[2]</sup> Die für diesen Prozess benötigten tRNA-Adapter sind chemisch überraschend divers.<sup>[3]</sup> Außer den vier kanonischen Nukleosiden A, C, G und U sind noch rund 100 modifizierte Nukleoside Schlüsselbestandteile der tRNA (Abbildung 1).<sup>[4]</sup> Die chemisch komplexesten Strukturen finden sich hierbei in der Antikodonschleife, entweder in der Wobble-Position des Antikodons oder direkt neben der 3'-Position des Antikodons,<sup>[5]</sup> was auf eine Rolle dieser chemischen Komplexität bei der Erhaltung der Translationsgenauigkeit schließen lässt.<sup>[6]</sup> Das Ribosom scheint eine modifizierte Antikodonregion zu benötigen, um eine korrekt gepaarte tRNA von Fehlpaarungen zu unterscheiden und damit z.B. Leserahmensverschiebungen durch verrutschende tRNAs zu vermeiden.<sup>[7]</sup>

Um den Einfluss der Nukleosidmodifikationen auf die Translationseffizienz zu untersuchen, haben wir eine Auswahl

dieser tRNA-Modifikationen in einer Vielzahl von Geweben mithilfe einer Isotopenverdünnungsmethode massenspektrometrisch quantifiziert (Hintergrundinformationen (SI) und Methoden, Tabelle S1 und Abbildung S1 (SI)). Die gemessenen Modifikationsgrade wurden über ein In-vitro-Translationssystem mit der Translationseffizienz korreliert. Für diese Experimente wurden elf repräsentative Modifikationen (Abbildung 1) als isotope markierte Derivate synthetisiert.<sup>[8]</sup> Die Mehrzahl dieser Nukleoside befindet sich im erweiterten Antikodon,<sup>[9]</sup> die restlichen modifizierten Nukleoside kommen an verschiedenen anderen Gerüstpositionen der tRNA vor.<sup>[10]</sup> Als biologisches Material für die Analysen wurde eine Auswahl unterschiedlicher Gewebe von Maus und Schwein verwendet. Die Schweinegewebe boten sich anfänglich wegen der Verfügbarkeit großer Mengen an, während die Mausgewebe später zur Bestätigung der Befunde in einem etablierten Modellsystem herangezogen wurden. Vom Schwein wurden je 5–10 g Material des jeweiligen Organs von zwei Tieren verarbeitet, außerdem wurden vollständige Organe aus zwei Sets mit je fünf Mäusen untersucht. Nach Extraktion und vollständiger enzymatischer Hydrolyse der tRNA bis auf die Nukleosideebene wurde eine Mischung aus isotope markierten tRNA-Modifikationen zugegeben und die Probe massenspektrometrisch analysiert. Die Verhältnisse der LC-MS-Signale von natürlichen zu isotope markierten Nukleosiden wurden bestimmt, was mithilfe zuvor aufgenommener Kalibriergeraden der einzelnen Nukleoside eine genaue parallele Quantifizierung dieser Modifikationen ermöglichte (Abbildung S2 (SI)).<sup>[8a]</sup> Die massenspektrometrische Quantifizierung wurde mindestens dreimal wiederholt, und die für jedes Gewebe erhaltenen Werte wurden gemittelt, sodass der Fehlerbereich auf ca. 5 % beschränkt werden konnte.

Die so erhaltenen Werte von Maus und Schwein sind farbkodiert jeweils in Abbildung 2 A und B wiedergegeben, zusammen mit den ungefähren Positionen der gemessenen Modifikationen in der tRNA-Sequenz. Die Werte geben die Zahl der jeweiligen Modifikation pro 1000 tRNA-Moleküle in % an (die absoluten Werte sind in den Tabellen S2–7 (SI) dargestellt). Damit wird statt der absoluten Konzentration einer bestimmten Modifikation in der Probe vielmehr der Modifikationsgrad des analysierten tRNA-Ensembles bezüglich dieses Nukleosids dargestellt. Für repräsentative Gewebe aus Maus und Schwein wurden zusätzlich die häufig vorkommenden tRNA-Modifikationen m<sup>5</sup>C und Ψ quantifiziert (Abbildung S4 (SI)).

[\*] M. Chem. C. Brandmayr,<sup>[+]</sup> Dipl.-Chem. M. Wagner,<sup>[+]</sup> Dr. T. Brückl,<sup>[+]</sup> Dr. D. Globisch, Dr. D. Pearson, M. Sc. A. C. Kneutinger, Dipl.-Chem. V. Reiter, Dr. A. Hienzsch, M. Sc. I. Thoma, Dipl.-Chem. P. Thumbs, Dr. M. Müller, Prof. Dr. T. Carell  
Center for Integrated Protein Science am Department Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München  
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)  
E-Mail: thomas.carell@cup.lmu.de  
Homepage: <http://www.carellgroup.de>

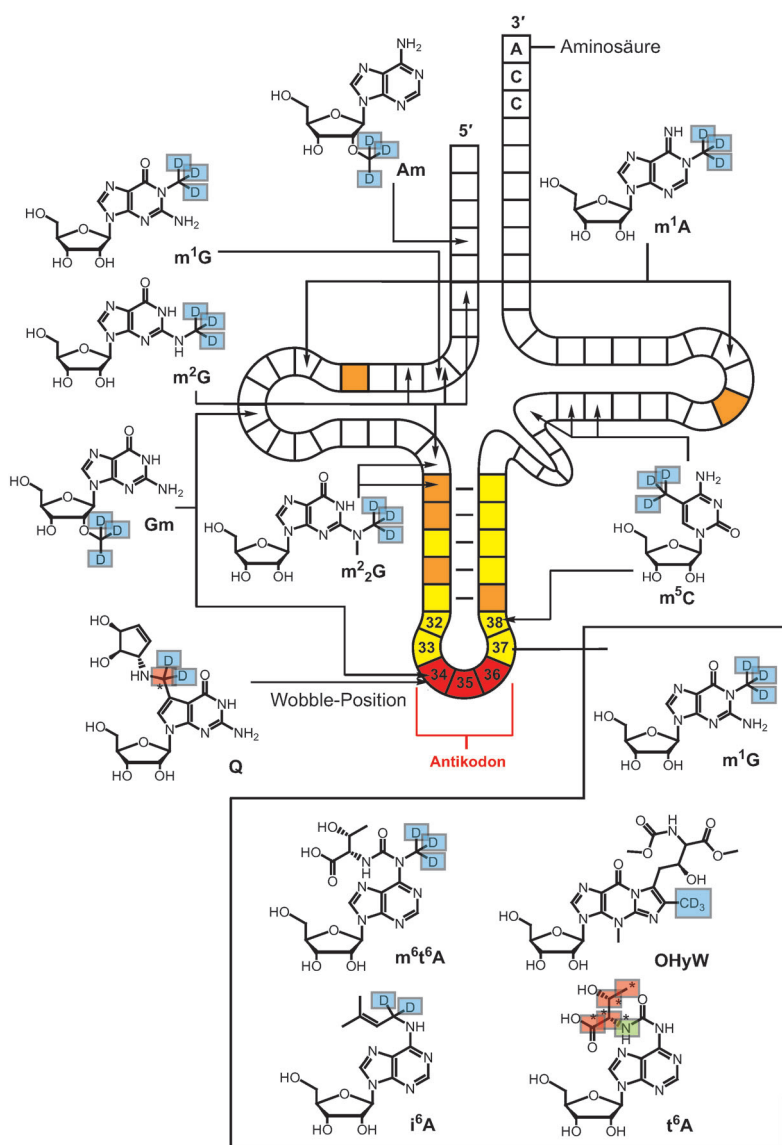
Dipl.-Biol. S. Koch, Dr. S. Michalakis, Prof. Dr. M. Biel  
Center for Integrated Protein Science am Department Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München (Deutschland)

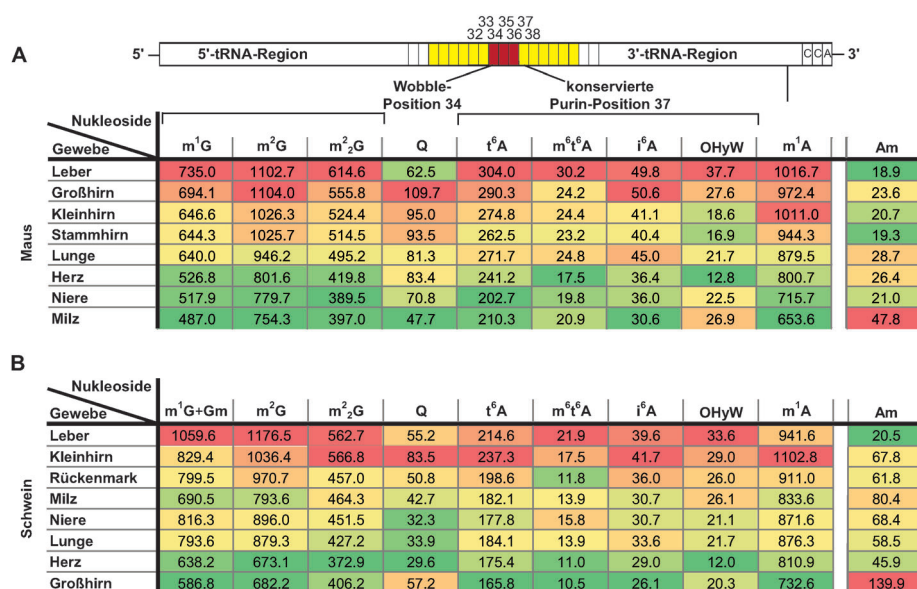
[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[\*\*] Wir danken dem Exzellenzcluster CIPS<sup>M</sup> sowie den SFBs 646 und 749 für großzügige Unterstützung. Für weitere Unterstützung sei dem Fonds der Chemischen Industrie und der Bayer Pharma AG gedankt. C.B. bedankt sich beim Boehringer Ingelheim Fonds für ein Promotionsstipendium.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201203769> zu finden.

Die Wiederverwertung dieses Beitrags ist gestattet in Übereinstimmung mit den Geschäftsbedingungen, die unter <http://angewandte.de/open> aufgeführt sind.





**Abbildung 2.** Quantitative Daten der untersuchten tRNA-Modifikationen in verschiedenen Geweben von Maus (A) und Schwein (B). Die Nukleosidwerte sind pro 1000 tRNA-Moleküle (%) angegeben. Die Daten zeigen einen ähnlichen, gewebespezifischen Modifikationsgrad für alle untersuchten Modifikationen mit Ausnahme von Am. Die Farbkodierung basiert auf der Berechnung der Quantile; rot: Maximalwert, gelb: 50% Quantil, grün: Minimalwert. Zwischenwerte sind als farbliche Abstufungen markiert. Trotz leichter Variation der absoluten Werte ist der beobachtete Trend im Modifikationsgehalt zwischen den biologischen Proben konserviert (sowohl in Maus als auch in Schwein; Tabellen S2–S5 (SI)).

m<sup>1</sup>G, m<sup>1</sup>A, m<sup>2</sup>G, i<sup>6</sup>A und t<sup>6</sup>A tatsächlich häufiger in tRNA-Fragmenten aus der Leber vorkommen und untermauern damit die Resultate der direkten Nukleosidquantifizierung mithilfe unserer auf Isotopenverdünnung basierenden Methode.

Aus den erhaltenen Daten folgerten wir, dass verschiedene Gewebe ihre tRNA unterschiedlich reifen lassen, um den individuellen Bedürfnissen bei der Translation gerecht zu werden. Gestützt wird diese These von publizierten In-vivo-Proteinsyntheseraten unterschiedlicher Säugetierorgane, die ein hohes Maß an Korrelation mit den hier gezeigten Daten vom Schwein aufweisen (Abbildung S5 (SI)).<sup>[12,17]</sup> Dies deutet darauf hin, dass ein höheres allgemeines tRNA-Modifikationsniveau wahrscheinlich mit erhöhten Translationsraten einhergeht. Zur Überprüfung dieser Hypothese haben wir den Einfluss gewebespezifischer tRNA-Ensembles auf die Translationseffizienz in einem gekoppelten In-vitro-Transkriptions-/Translationssystem aus Retikulozytenlysat untersucht.<sup>[18]</sup> Dazu wurden die ursprünglich im System vorhandenen tRNAs säulenchromatographisch mithilfe von Ethanolamin-Sepharose entfernt<sup>[18]</sup> und anschließend durch gereinigte tRNA-Ensembles unterschiedlicher Gewebe ersetzt. Die Translationseffizienz wurde durch Messung der Lumineszenz bestimmt, die mit der Produktion des Enzyms Luziferase einhergeht (Abbildung S7 (SI)). Die Steigung der ermittelten Graphen aus mindestens drei Experimenten wurde dabei auf das effizienteste Ensemble normiert.

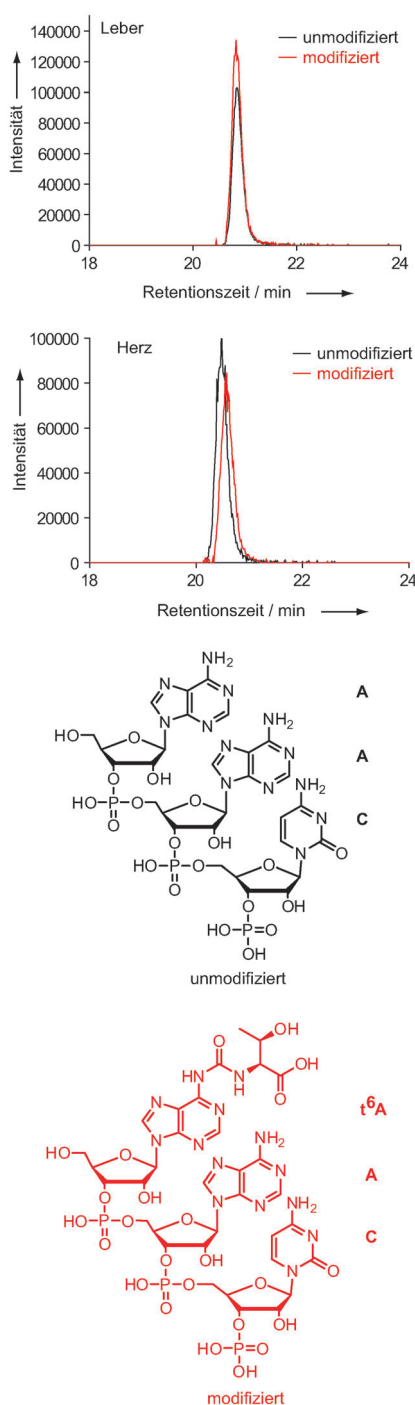
In einem ersten Ansatz wurden komplette tRNA-Ensembles aus Schweinegeweben genutzt. Abbildung 4 zeigt die normierten Translationsraten in Abhängigkeit von den auf

LC-MS-Messungen beruhenden, normierten Modifikationsniveaus aus Abbildung 2B (detaillierte Werte siehe Abbildung S8 (SI)). Aus Abbildung 4 ist bereits eine Korrelation zwischen Translationseffizienz und dem Modifikationsgrad der isolierten tRNA-Ensembles erkennbar, aber diese Korrelation ist längst nicht optimal.

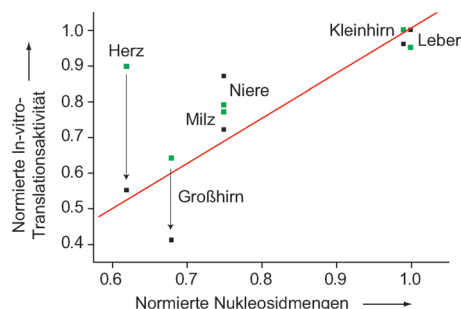
Wir haben beobachtet, dass besonders solche Gewebe vom allgemeinen Trend abweichen, die reich an Mitochondrien sind (vor allem Herz).<sup>[19]</sup> Da mitochondriale tRNAs ihr eigenes Set an modifizierten Nukleosiden aufweisen,<sup>[13]</sup> haben wir in einem Folgeexperiment die Mitochondrien vor der tRNA-Extraktion abgetrennt (Abbildung S6 (SI)).<sup>[20]</sup> Die so gewonnenen Daten für zytosolische tRNA-Ensembles weisen tatsächlich eine höhere Korrelation zwischen Translationsaktivität und Modifikationsgrad auf (schwarze Quadrate in Abbildung 4;  $r = 0.861$ ,  $P = 0.028$ ), was zeigt, dass

der Modifikationsgrad der zytosolischen tRNA die Translationseffizienz beeinflusst. Diese Korrelation konnte weiterhin anhand von Messungen mit der Gesamt-tRNA aus Mausegeweben mit niedrigem Mitochondriengehalt bestätigt werden (Abbildung S9 (SI)). Unsere Befunde sind damit in guter Übereinstimmung mit der allgemeinen Idee, dass bestimmte nichtkanonische Basen für die Feinjustierung der tRNA-Bindung an das Ribosom verantwortlich sind. Da die Translationsrate von der Konkurrenz zwischen ähnlichen und genau passenden Aminoacyl-tRNAs um die Bindung am Ribosom bestimmt wird,<sup>[21]</sup> sorgt ein hoher Modifikationsgrad für eine höhere Affinität der korrekten tRNA zum Ribosom, was zu einer schnelleren Unterscheidung führen sollte.<sup>[22]</sup> Dies verringert die Umsatzzeit am Ribosom und erhöht damit die Proteinsyntheserate.

Wir haben hier von der parallelen Quantifizierung von zwölf modifizierten Nukleosiden in tRNA-Ensembles verschiedener Gewebe von Schwein und Maus berichtet und gezeigt, dass die Modifikationsniveaus zwischen den Geweben stark variieren. Darüber hinaus konnten wir einen Zusammenhang zwischen tRNA-Modifikationsgrad und In-vitro-Translationseffizienz aufzeigen. Die Befunde deuten darauf hin, dass der Grad, zu dem ein tRNA-Ensemble chemisch modifiziert vorliegt, die Translationseffizienz moduliert. Unsere Daten zeigen, dass das tRNA-Modifikationsniveau einer weiteren Informationsebene entspricht, mit der Zellen ihre Translationskapazität programmieren können.



**Abbildung 3.** Repräsentativer, qualitativer Vergleich der Mengen des unmodifizierten RNA-Fragments AAC und dessen modifizierter Variante t<sup>6</sup>AAC in der tRNA aus Leber und Herz nach Rnase-A-Verdau. Die überlagerten LC-MS-Chromatogramme zeigen die detektierten Ionen mit der berechneten Masse des AAC- ( $m/z = 489.5682$ – $489.5742$ ) und des t<sup>6</sup>AAC-Fragments ( $m/z = 562.0863$ – $562.0933$ ) ( $z = -2$ ) und dessen jeweilige Struktur. Das Verhältnis der Flächen von modifizierten zu unmodifizierten Fragmenten ist in Lebergewebe erkennbar höher als im Herz. Weitere identifizierte Fragmentverhältnisse sind in Tabelle S9 (SI) aufgelistet.



**Abbildung 4.** Translationsaktivität von tRNA-Extrakten aus unterschiedlichen Schweinegeweben mit (schwarze Quadrate) und ohne (grüne Quadrate) vorherige Entfernung der mitochondrialen tRNA. Eine lineare Anpassung an die relative Translationsaktivität in Abhängigkeit von den normierten Nukleosidmengen zeigt nach Entfernung der Mitochondrien eine signifikante Korrelation (rote Gerade) ( $r = 0.861$ ,  $P = 0.028$ ).

Eingegangen am 16. Mai 2012,  
veränderte Fassung am 26. Juli 2012  
Online veröffentlicht am 4. Oktober 2012

**Stichwörter:** Isotopenmarkierung · Massenspektrometrie · RNA-Modifikationen · Translation · tRNA

- [1] M. Ibba, D. Söll, *Science* **1999**, 286, 1893–1897.
- [2] a) N. Fischer, A. L. Konevega, W. Wintermeyer, M. V. Rodnina, H. Stark, *Nature* **2010**, 466, 329–333; b) T. M. Schmeing, V. Ramakrishnan, *Nature* **2009**, 461, 1234–1242.
- [3] a) H. Grosjean, *Fine-Tuning of RNA Functions by Modification and Editing*, Springer, Heidelberg, **2005**; b) F. Jühling, M. Mörl, K. Hartmann Roland, M. Sprinzl, F. Stadler Peter, J. Pütz, *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37, D159–D162.
- [4] Y. Motorin, M. Helm, *Biochemistry* **2010**, 49, 4934–4944.
- [5] a) P. F. Agris, F. A. Vendeix, W. D. Graham, *J. Mol. Biol.* **2007**, 366, 1–13; b) A. Ambrogelly, S. Palioura, D. Söll, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 29–35.
- [6] a) L. B. Jenner, N. Demeshkina, G. Yusupova, M. Yusupov, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, 17, 555–560; b) A. L. Konevega, N. G. Soboleva, V. I. Makhno, A. V. Peshekhonov, V. I. Katunin, *Mol. Biol.* **2006**, 40, 597–610; c) K. Nakanishi, L. Bonnefond, S. Kimura, T. Suzuki, R. Ishitani, O. Nureki, *Nature* **2009**, 461, 1144–1148; d) L. A. Sylvers, K. C. Rogers, M. Shimizu, E. Ohtsuka, D. Söll, *Biochemistry* **1993**, 32, 3836–3841.
- [7] J. F. Atkins, G. R. Björk, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2009**, 73, 178–210.
- [8] a) T. Brückl, D. Globisch, M. Wagner, M. Müller, T. Carell, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 8074–8077; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 7932–7934; b) J. J. Dalluge, T. Hashizume, J. A. McCloskey, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 3242–3245.
- [9] M. Yarus, *Science* **1982**, 218, 646–652.
- [10] a) M. Helm, *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 721–733; b) E. M. Phizicky, J. D. Alfonzo, *FEBS Lett.* **2010**, 584, 265–271.
- [11] a) K. A. Dittmar, J. M. Goodenbour, T. Pan, *PLoS Genet.* **2006**, 2, 2107–2115; b) J. B. Plotkin, H. Robins, A. J. Levine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 12588–12591.
- [12] J. C. Waterlow, *Exp. Physiol.* **1984**, 69, 409–438.
- [13] D. Globisch, D. Pearson, A. Hienzsch, T. Brückl, M. Wagner, I. Thoma, P. Thumbs, V. Reiter, A. C. Kneutinger, M. Müller, S. A. Sieber, T. Carell, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 9913–9916; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 9739–9742.



- [14] a) J. A. Kowalak, J. J. Dalluge, J. A. McCloskey, K. O. Stetter, *Biochemistry* **1994**, *33*, 7869–7876; b) Y. Motorin, M. Helm, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2011**, *2*, 611–631.
- [15] a) T. J. Siard, J. R. Katze, W. R. Farkas, *Neurochem. Res.* **1989**, *14*, 1159–1164; b) L. Szabo, S. Nishimura, W. R. Farkas, *Biofactors* **1988**, *1*, 241–244.
- [16] C. M. Castleberry, P. A. Limbach, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, e162.
- [17] a) J. W. Frank, J. Escobar, A. Suryawan, S. R. Kimball, H. V. Nguyen, L. S. Jefferson, T. A. Davis, *J. Nutr.* **2005**, *135*, 1374–1381; b) D. F. Goldspink, S. E. Lewis, F. J. Kelly, *Biochem. J.* **1984**, *217*, 527–534; c) A. Suryawan, P. M. J. O'Connor, J. A. Bush, H. V. Nguyen, T. A. Davis, *Amino Acids* **2009**, *37*, 97–104; d) M. Winick, A. Noble, *Dev. Biol.* **1965**, *12*, 451–466.
- [18] R. J. Jackson, S. Naphthine, I. Brierley, *RNA* **2001**, *7*, 765–773.
- [19] V. Reiter, D. M. S. Matschkal, M. Wagner, D. Globisch, A. C. Kneuttinger, M. Müller, T. Carell, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 6235–6240.
- [20] C. Frezza, S. Cipolat, L. Scorrano, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 287–295.
- [21] J. Ling, N. Reynolds, M. Ibba, *Annu. Rev. Microbiol.* **2009**, *63*, 61–78.
- [22] a) O. Allnér, L. Nilsson, *RNA* **2011**, *17*, 2177–2188; b) V. Dao, R. Guenther, A. Malkiewicz, B. Nawrot, E. Sochacka, A. Kraszewski, J. Jankowska, K. Everett, P. F. Agris, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 2125–2129; c) A. L. Konevega, N. G. Soboleva, V. I. Makhno, Y. P. Semenikov, W. Wintermeyer, M. V. Rodnina, V. I. Katunin, *RNA* **2004**, *10*, 90–101; d) J. Urbonavicius, J. M. B. Durand, G. R. Bjork, *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 5348–5357.