



Ein chemo-enzymatischer Ansatz zur regiospezifischen Modifizierung der RNA-Kappe**

Daniela Schulz, Josephin Marie Holstein und Andrea Rentmeister*

Die Verknüpfung von RNA mit Reportermolekülen ist von besonderer Bedeutung, um die Produktion, den Transport und die Dynamiken dieser Biomoleküle im biologischen Kontext effizient untersuchen zu können. Innerhalb der verschiedenen RNA-Klassen ist die Markierung von Messenger-RNAs (mRNAs) von besonderem Interesse, da diese Informationen über die Genexpression enthalten, die mit Entwicklungsvorgängen oder der Entstehung von Krankheiten in Zusammenhang stehen kann. Außerdem liegt ein großer Anteil der mRNAs lokalisiert in distinkten Bereichen innerhalb der Zelle vor, was darauf schließen lässt, dass die Lokalisation verschiedener mRNAs in bestimmten subzellulären Regionen ein Mechanismus zur zeitlichen und räumlichen Regulierung der Genexpression sein könnte.^[1] Sowohl die Analyse der Genexpression mithilfe von RNA-Sequenzierungen als auch Untersuchungen zur subzellulären mRNA-Lokalisation sind derzeit von enormer Bedeutung. Strategien zur Markierung von mRNA, die diesen Gesamtprozess verbessern könnten, werden daher dringend benötigt.

Für die Markierung von RNA wurden zwei Hauptstrategien entwickelt: a) der direkte Einbau kleiner, chemischer Reportergruppen während der chemischen oder enzymatischen Synthese, gefolgt von postsynthetischer Modifizierung,^[2] und b) die Modifizierung nativer RNA-Moleküle, die meist chemo-enzymatisch erfolgt.^[3] Die erste Strategie wurde beispielsweise genutzt, um während der Transkription 5-Ethynyluridin in naszierende RNA einzubauen, das in weiterer Folge mithilfe der Cu^I-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) modifiziert werden konnte.^[4] Dadurch

ließen sich sowohl die Synthese als auch der Umsatz und Transport endogener RNAs visualisieren. Azid-derivatisierte Nukleotide konnten mithilfe von Nukleotidyltransferasen, insbesondere Poly(A)-Polymerasen, in beliebige Ziel-RNAs eingebaut und anschließend modifiziert werden, wofür entweder die Cu^I- oder die spannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition genutzt wurde.^[5] Abgesehen von unterschiedlichen Versionen der Azid-Alkin-Cycloaddition wurde auch die inverse Diels-Alder-Reaktion eingesetzt, um das 5'-Ende von RNA zu modifizieren.^[6]

In der alternativen, chemo-enzymatischen Strategie werden Enzyme genutzt, um native Nukleinsäuren zu modifizieren. Methyltransferasen katalysieren den Transfer einer Methylgruppe von S-Adenosyl-L-methionin (AdoMet oder SAM) auf ihr jeweiliges Substrat, in vielen Fällen zeigen diese Enzyme jedoch Promiskuität gegenüber AdoMet-Analoga. Im Fall von DNA-, RNA- und Protein-Methyltransferasen konnte diese Seitenaktivität zur Umsetzung verschiedener AdoMet-Analoga genutzt werden.^[3,7]

In der RNA-Forschung wurden tRNAs durch eine tRNA-Methyltransferase mit einer längeren Alkynylgruppe versehen und anschließend durch CuAAC fluoreszenzmarkiert.^[7d] Eine sequenzspezifische Markierung von RNA gelang durch Rekstitution eines kleinen nukleolären Box-C/D-Ribonukleoproteins (snoRNP), das aus drei Proteinen (darunter eine RNA-Methyltransferase) sowie einer Box-C/D-guide-RNA bestand. Durch die Verwendung unterschiedlicher guide-RNAs konnten tRNAs und in vitro transkribierte prä-mRNAs sequenzspezifisch durch Einbau eines terminalen Alkins modifiziert und anschließend mithilfe von CuAAC markiert werden.^[7e]

Trotz dieser beachtlichen Erfolge zielt keiner der oben genannten Ansätze auf typische Merkmale von mRNA ab, obwohl dadurch eine spezifische Modifizierung von mRNAs innerhalb der Vielzahl in der Zelle vorkommenden RNA-Arten möglich würde. Die Markierung eukaryotischer mRNAs könnte neue Optionen im Bereich der mRNA-Isolierung und -Visualisierung schaffen.

Wir haben eine chemo-enzymatische Strategie entwickelt, die es ermöglicht, die 5'-Kappe – ein Kennzeichen eukaryotischer mRNAs – gezielt zu markieren (Abbildung 1). Um selektiv mRNAs innerhalb der Gesamtheit aller zellulär vorliegenden RNAs zu markieren, haben wir Enzyme gesucht, die in der Lage sind, mRNA-Charakteristika (wie die N⁷-methylierte Kappe oder den Poly(A)-Schwanz) zu erkennen und zu modifizieren. Trimethylguanosinsynthasen (Tgs) sind passende Anwärter hierfür, da sie die für mRNAs typische 5'-Kappe spezifisch an der Position N² methylieren. Die humane Tgs1 (hTgs1) ist für die Hypermethylierung der m⁷G-Kappen zu 2,2,7-Trimethylguanosin(TMG)-Kappen

[*] D. Schulz, J. M. Holstein, Dr. A. Rentmeister
Universität Hamburg, Department Chemie,
Institut für Biochemie und Molekularbiologie
Martin-Luther-King Platz 6, 20146 Hamburg (Deutschland)
E-Mail: rentmeister@chemie.uni-hamburg.de

[**] A.R. dankt der DFG für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Emmy Noether-Programms (RE 2796/2-1) sowie dem FCI für den Sachkostenzuschuss. J.M.S. dankt dem FCI für ein Chemiefonds-Stipendium. Wir danken der MS-Abteilung des Departments Chemie, Universität Hamburg (Dr. M. Trusch, C. Christ, G. Graack) für die Hilfe bei MALDI-TOF-MS-Messungen. Wir danken Prof. Hahn und seiner Gruppe für die Bereitstellung des DNA-Templats für die Transkription. Prof. Hahn danken wir außerdem für die Korrekturen der deutschen Übersetzung. Dank gilt Prof. R. Ficner (Universität Göttingen) für das Plasmid für hTgs1_{618–853} und Prof. Z. Zhou (Northeastern University, Boston, USA) sowie Prof. B. Dräger (Universität Halle) für die Plasmide für MTAN und LuxS. Die Autoren erklären konkurrierende finanzielle Interessen. Details sind in den Hintergrundinformationen zu finden.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (experimentelle Details) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201302874> zu finden.

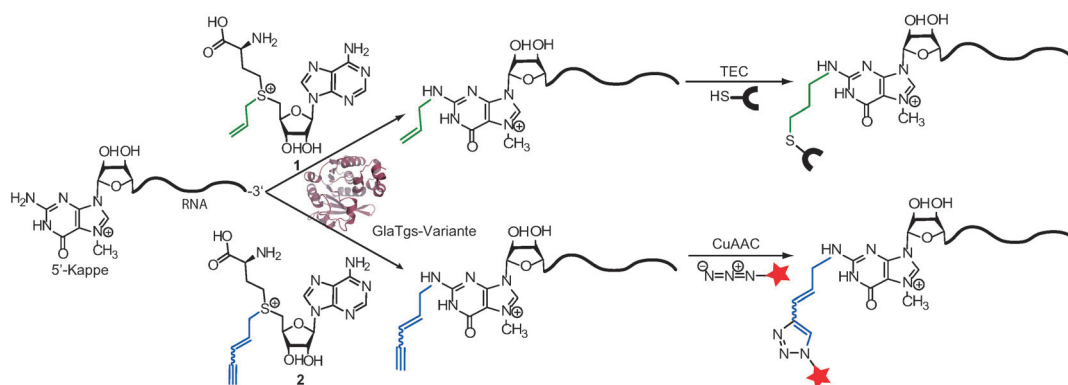


Abbildung 1. Chemo-enzymatische Modifizierung Kappen-tragender RNAs. In einem zweistufigen Prozess wird zunächst eine reaktive Gruppe mit Hilfe des Kappen-spezifischen Enzyms GlaTgs2 eingeführt, die anschließend durch Klick-Reaktionen modifiziert werden kann. Oben: GlaTgs2-Varianten ermöglichen die Herstellung einer N^2 -Allyl-modifizierten Kappe, wenn AdoPropen (1) als Cosubstrat eingesetzt wird. Die Alkenylfunktion kann anschließend mithilfe von Thiol-En-Klick (TEC)-Chemie markiert werden. Unten: GlaTgs2-Varianten ermöglichen auch die Modifizierung der Kappe unter Verwendung von AdoEnYn (2) als Cosubstrat. Die übertragene funktionelle Gruppe ermöglicht die weitere Modifizierung durch CuAAC.

verantwortlich, wobei letztere charakteristisch für kleine nukleoläre RNAs (snoRNAs) und kleine nukleäre RNAs (snRNAs) sind.^[8] Die Hypermethylierung der m^7G -Kappe von UsnRNAs führt zu deren Anreicherung in nuklearen Foci, einer Kollaboration mit Coilin sowie der Bildung kanonischer Cajal Bodies.^[9] Im Unterschied zu hTgs1 überträgt die Trimethylguanosinsynthase aus *Giardia lamblia* (GlaTgs2) nur eine einzelne Methylgruppe auf die Position N^2 von m^7GDP , m^7GTP und m^7GpppA .^[10] Die genaue Funktion von GlaTgs2 in vivo ist bisher nicht bekannt.

Wir haben die Trimethylguanosinsynthasen von *Homo sapiens* (hTgs1) und *Giardia lamblia* (GlaTgs2) rekombinant produziert und in vitro auf promiskuitive Aktivität gegenüber AdoMet-Analoga AdoPropen (1) und AdoEnYn (2) getestet, die nach literaturbekannten Methoden synthetisiert worden waren.^[3a,7c] Für die Aktivitätstests wurde das Dinukleotid m^7GpppA (3) als Kappen-Analogon eingesetzt. Die Aktivität mit dem natürlichen Cosubstrat AdoMet wurde analysiert wie bei Monecke et al. beschrieben.^[11] Beide Cofaktor-Analoga (1 und 2) enthalten eine ungesättigte Bindung in β -Position zum Schwefelatom, die vermutlich dazu dient, den Übergangszustand der Transalkylierungsreaktion zu stabilisieren. Die entsprechenden AdoMet-Analoga sind somit bevorzugte Substrate für diesen Reaktionsverlauf.^[3b] AdoPropen sollte die Übertragung einer Allylgruppe auf die Position N^2 von 3 und folglich die Bildung von N^2 -Allyl- m^7GpppA (4) ermöglichen. Die Verwendung von (*E/Z*)-AdoEnYn (im Folgenden als AdoEnYn bezeichnet) sollte durch Transfer eines Pentenylrestes auf die Kappe 3 zur Bildung von N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7GpppA (5) führen. Beide Alkylgruppen sollten für weitere Modifizierung durch literaturbekannte Klick-Reaktionen zugänglich sein.^[12]

Während Tgs1 aus *Homo sapiens* keine Aktivität gegenüber den getesteten AdoMet-Analoga zeigte (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen (SI)), konnte für GlaTgs2 eine geringe promiskuitive Aktivität gegenüber 1 nachgewiesen werden. In der HPLC-Analyse machte sich dies durch ein neues Signal mit einer Retentionszeit von 10.6 min bemerkbar (Abbildung 2 A), das massenspektrometrisch 4 zugeordnet

werden konnte (Abbildung S2 (SI)). Wie erwartet konnte GlaTgs2 nur einen einzelnen Alkylrest auf die Position N^2 des Substrats transferieren.^[13]

Bei 2.5 Mol-% GlaTgs2-WT wurden 4 % m^7GpppA mit 1 zum Allyl-modifizierten Produkt 4 umgesetzt, was einer katalytischen Produktivität (total turnover number, TTN) von ca. 1 entspricht (Abbildung 2 A). Unter optimierten Bedingungen wurde für GlaTgs2-WT eine TTN von 3 ± 2 mit 1 als Cosubstrat bestimmt. Die Umsetzung von 3 mit dem sterisch anspruchsvolleren Cosubstrat 2 durch GlaTgs2-WT resultierte in der Bildung eines sehr schwachen Signals, das zunächst nicht zugeordnet werden konnte (Abbildung 2 B).

Um GlaTgs2-Varianten mit verbesserten promiskuitiven Aktivitäten hinsichtlich der AdoMet-Analoga 1 und 2 zu erhalten, wurde ein Homologiemodell von GlaTgs2 auf Basis von hTgs1 (pdb-Code: 3GDH^[11]) mithilfe von SWISS-MODEL^[14] erstellt, um Aminosäurepositionen zu identifizieren, die die Aufnahme der sperrigeren Cosubstrate möglicherweise behindern (Abbildung S3 A (SI)). Hierzu suchten wir in einem Radius von 8 Å ausgehend vom Schwefelatom des *S*-Adenosylhomocysteins (SAH), des Coprodukts der Reaktion, nach Aminosäureresten, deren Substitution durch weniger voluminöse Aminosäuren die Aufnahme der AdoMet-Analoga erleichtern könnte. Position V34 in GlaTgs2 wurde für die Substitution gewählt, nachdem Reste ausgeschlossen worden waren, die zu 100 % konserviert waren oder deren Substitution bekanntermaßen die Faltung oder Aktivität beeinträchtigte.^[8,11,15]

Die beste Variante, GlaTgs2-Var1 (V34A) zeigte bei identischen Reaktionsbedingungen eine mehr als dreimal höhere katalytische Produktivität mit 1 als das Wildtyp-Enzym (TTN 10 ± 2 gegenüber 3 ± 2 für WT) (Abbildung 2 A und Tabelle S1 (SI)). Kinetische Analysen zeigten, dass sowohl der k_{cat} - als auch der K_M -Wert für AdoPropen verbessert waren. GlaTgs2-Var1 zeigte für AdoPropen $K_M = (57 \pm 29) \mu M$, was einer nahezu dreifach höheren Substrataffinität als beim Wildtyp-Enzym entspricht ($K_M = (151 \pm 19) \mu M$ für WT), sowie $k_{cat} = (0.18 \pm 0.08) \text{ min}^{-1}$ (vgl.: $k_{cat} = (0.09 \pm 0.08) \text{ min}^{-1}$ für WT). Bei Reaktionen mit dem natür-

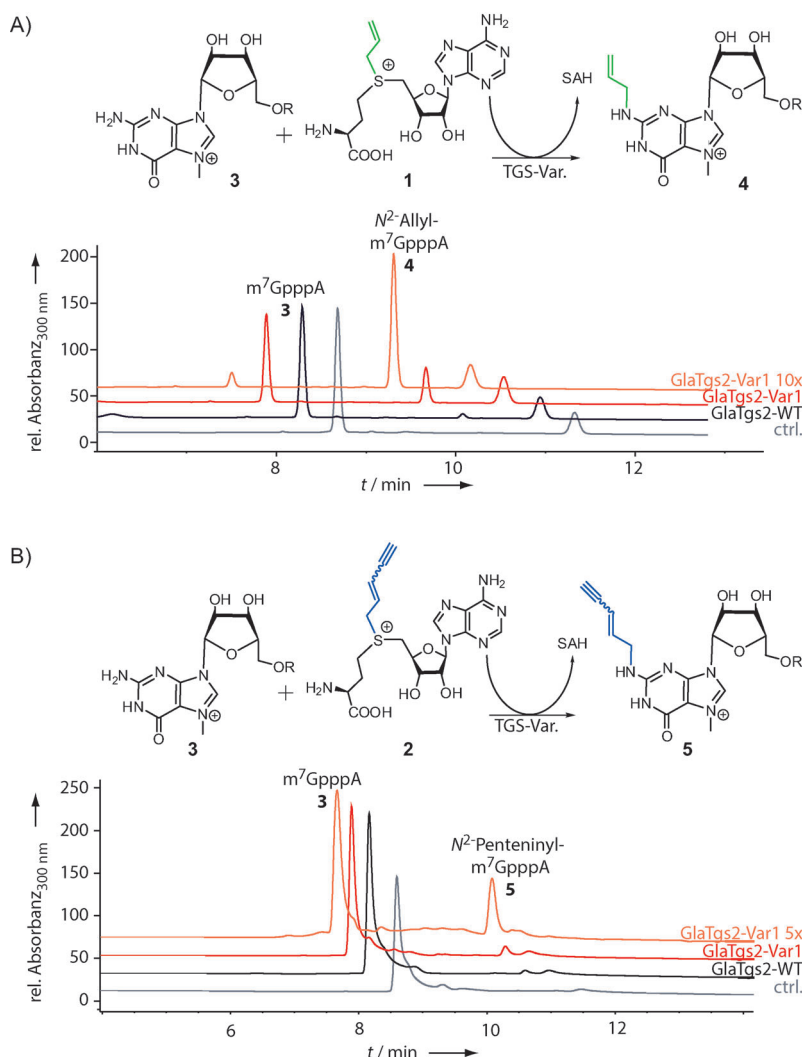


Abbildung 2. Enzymatische Modifizierung des mRNA-Kappen-Analogons m⁷GpppA (**3**) durch GlaTgs2-WT und Var1 unter Verwendung der Cosubstrate AdoPropen (**1**) und AdoEnYn (**2**). Die Abbildung zeigt die HPLC-Analysen der beschriebenen Reaktionen. A) Reaktionen mit **1**: GlaTgs2-WT (6 μ M; WT = Wildtyp) bildet 11 μ M **4** (t_R = 10.6 min) in 3 h (schwarz), GlaTgs2-Var1 (12 μ M) produziert 83 μ M **4** (rot). Wegen des höheren Produktionslevels (bis zu 30x) konnte Var1 in höheren Konzentrationen (120 μ M) eingesetzt werden, was zur Generierung von bis zu 250 μ M **4** (91 % Umsatz) führte (orange). Die Kontrolle zeigt die Var1-katalysierte Reaktion bei $t = 0$ (ctrl., grau). B) Reaktionen mit **2**: GlaTgs2-WT (18 μ M) bildet 5 μ M **5** (t_R = 11.3 min) in 3 h (schwarz). Var1 (26 μ M) bildet 18 μ M **5** (rot). Eine fünffach höhere Var1-Konzentration ermöglichte 25 % Konversion (orange). Die Kontrolle zeigt die durch Var1 katalysierte Reaktion bei $t = 0$ (ctrl., grau). R = pppA.

lichen Substrat AdoMet war die TTN der Var1 gegenüber der des WT reduziert (108 ± 6 bzw. 296 ± 38), wogegen der k_{cat} -Wert durch die Mutation unbeeinflusst blieb ((7.6 ± 4.7) bzw. $(8.5 \pm 5.7) \text{ min}^{-1}$).

Des Weiteren bestimmten wir T_{50} -Werte, um die Thermostabilität der Enzyme zu charakterisieren. Als T_{50} bezeichnet man die Temperatur, die nach einer 15-minütigen Inkubation zu einer 50-prozentigen Reduzierung der enzymatischen Aktivität führt.^[16] Die T_{50} -Werte der Tgs-Enzyme waren niedrig (hTgs1 (38.5 ± 0.5) °C, GlaTgs2 (39.9 ± 0.2) °C), was darauf hindeutet, dass ihre Evolvierbarkeit gering ist.^[17] Für die aktivste Variante GlaTgs2-Var1 wurde $T_{50} = (40.4 \pm$

0.2) °C ermittelt. Somit bleibt die Thermostabilität durch die eingeführte Substitution unbeeinträchtigt, in Einklang mit den verbesserten TTN-Werten. Bemerkenswert war, dass die Produktion von GlaTgs2-Var1 bis zu 30-mal besser als beim WT war. Daher konnte die Enzymkonzentration in den Reaktionen erhöht werden, wodurch problemlos Umsätze von bis zu 91 % **3** mit **1** erzielt wurden (Abbildung 2A).

Als nächstes wurde untersucht, ob Var1 auch in Bezug auf **2** verbesserte Merkmale aufweist und somit einen effizienten Transfer der vergleichsweise großen Pentenylgruppe ermöglicht. In der Tat konnte der Umsatz von **3** mit **2** verdoppelt werden, wenn unter identischen Reaktionsbedingungen GlaTgs2-Var1 anstelle des WT verwendet wurde (Abbildung 2B). Wegen des höheren Produktionslevels der Variante konnte die Enzymkonzentration erhöht und ein Umsatz von 25 % erreicht werden (Abbildung 2B).

Wir konnten nachweisen, dass die enzymatische Modifizierung von **3** unter Verwendung der Cosubstrate **1** und **2** mit GlaTgs2-Var1 regiospezifisch an Position N² erfolgt (Abbildungen S4 und S5 (SI)). Die modifizierten Kappen **4** und **5** konnten mit einer GlaTgs2-Variante also effizient und mit exzellenter Regiospezifität hergestellt werden.

Die AdoMet-Analoga **1** und **2** wurden gewählt, da sie zu Kappenstrukturen führen, die mit einer terminalen Alken- oder Alkinfunktionalität versehen und daher für eine Modifizierung mithilfe verschiedener Klick-Reaktionen geeignet sind. Die Thiol-En-Klick-Reaktion kann genutzt werden, um eine Thiolgruppe mithilfe eines Radikalmechanismus, der durch einen chemischen Radikalinitiator oder Licht initiiert wird, an eine terminale Alkengruppe zu knüpfen.^[12b] Die Reaktion kann photochemisch oder thermisch gestartet werden und führt zur Bildung eines stabilen Thioethers.^[12b,18] Wir haben den thermisch aktivierbaren Katalysator VA-044 (2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]dihydrochlorid)

sowie das Biotin-tragende Thiol **6** eingesetzt, um N²-Allyl-m⁷GpppA (**4**) unter milden Bedingungen (44 °C, wässriges Milieu) in das N²-biotinylierte Kappenderivat **7** umzuwandeln (Abbildung 3A). Die Reaktion wurde mit HPLC analysiert, wobei ein neues Signal bei 13.6 min detektiert wurde (Abbildung 3B). Die Identität der biotinylierten Kappe konnte durch MS bestätigt werden (Abbildung 3C). Die Thiol-En-Reaktion ist höchst spezifisch für Olefine und verläuft in wässrigem Milieu.^[18a] Dennoch ist sie nicht für Reaktionen in zellulärer Umgebung anwendbar, da dort freie, konkurrierende Thiole auftreten.

Daher nutzten wir die CuAAC für die weitere Modifizierung. Da weder Azide noch terminale Alkingruppen in

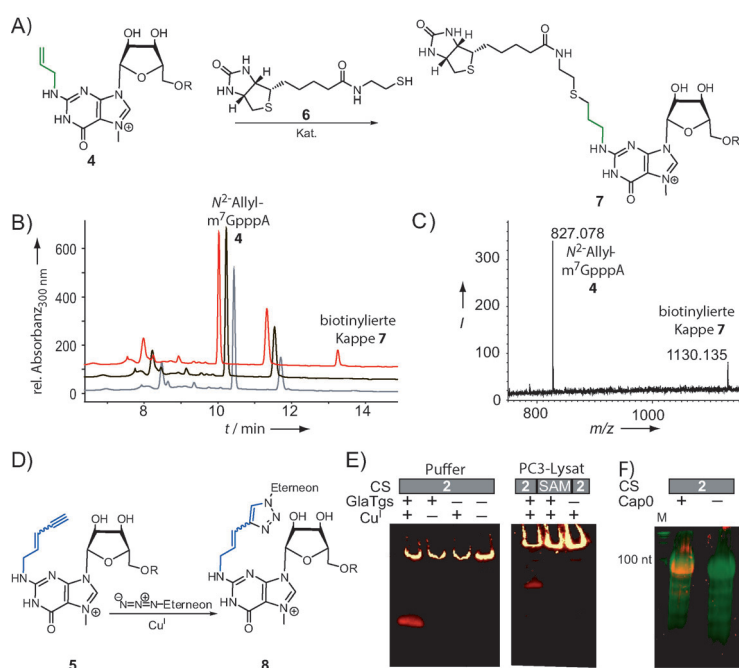


Abbildung 3. Markierung enzymatisch modifizierter mRNA-Kappen durch Klick-Reaktionen. A) Markierung von **4** durch TEC-Chemie mit Biotin-Thiol **6**. B) HPLC-Analyse der TEC-Reaktion. Die Bildung eines neuen Signals ($t_R = 13.6$ min) durch das biotinylierte N^2 -Allyl- m^7 GpppA (**7**) wurde nach 4 h Inkubation beobachtet (rot). Bei den Negativkontrollen ($t = 0$ h (grau) und ohne Katalysator (schwarz)) wurde kein Produkt gebildet. C) MALDI-TOF-MS-Analyse der TEC-Reaktion. Klick-Produkt **7** (m/z 1130), N^2 -Allyl-modifizierte Kappe **4** (m/z 827). D) Markierung von **5** mit Eterneon480/635-Azid durch CuAAC sollte zur Bildung der modifizierten Kappe **8** führen. E) Der Erfolg der CuAAC wurde mithilfe von Polyacrylamid-(PAA)-Gelen und Eterneon480/635-Fluoreszenz analysiert. Eine fluoreszierende Bande wurde nach einer Inkubation von 60 min bei 37 °C in der Probe, die sowohl Penteniny- m^7 GpppA als auch Cu^I enthält, nicht jedoch bei den Negativkontrollen ($t = 0$ h, oder Kontrollen, denen jeweils eine Komponente fehlte) detektiert. Die chemo-enzymatische Modifizierung von m^7 GpppA mit **2** und anschließende CuAAC wurde auch in Lysat von PC3-Zellen durchgeführt (rechtes Gel). CS: Cosubstrat der enzymatischen Reaktion, **2** oder SAM als Kontrolle. Nicht umgesetzter Eterneon-Farbstoff verbleibt in den Taschen des Gels und verursacht das fluoreszierende Signal am oberen Ende aller Bahnen. F) Chemo-enzymatische Markierung Kappen-tragender mRNA durch CuAAC mit Eterneon480/635-Azid. In vitro transkribierte Kappen-tragende RNA wurde unter Verwendung von **2** und GlaTgs-Var1 enzymatisch modifiziert und anschließend mit CuAAC markiert. PAA-Gele wurden hinsichtlich Eterneon480/635-Fluoreszenz (rot) analysiert und auch mit Ethidiumbromid gefärbt (grün). Die erhaltenen Bilder wurden überlagert. Die Negativkontrolle (–) enthält RNA derselben Länge, die in der gleichen Weise wie die Kappen-tragende RNA behandelt, allerdings nur mit einem unmethylierten Guanosinrest versehen wurde. Marker (M) wurde in der ersten Bahn aufgetragen, und die Bande, die einer 100-nt-RNA entspricht, ist angezeigt.

natürlichen Systemen vorkommen, handelt es sich dabei um eine bioorthogonale Klick-Reaktion.^[2,18a,19] Diese Reaktion wurde schon für postsynthetische Modifizierungen von DNA^[20] und RNA^[7d,e] eingesetzt. Wir verwendeten diese Reaktion, um ein käufliches, Fluorophor-tragendes Azid (Eterneon480/635-Azid) an N^2 -Penteniny- m^7 GpppA (**5**; Abbildung 3D) anzubringen, um so eine N^2 -fluoreszenzmarkierte Kappe **8** zu erhalten. Die Bildung von **8** wurde nach PAA-Gelelektrophorese durch Detektion der Fluoreszenz analysiert (Abbildung 3E). Lediglich Reaktionen, die aus-

gehend von der enzymatisch modifizierten Kappe **5** mit Eterneon-Azid sowie dem Kupferkatalysator umgesetzt wurden, führten zur Bildung einer fluoreszierenden Bande (Abbildung 3E).

Zudem konnten die Bildung von **5** sowie die anschließende CuAAC auch in Lysaten von *E. coli* und PC3-Zellen durchgeführt werden (Abbildungen S7 (SI) und 3E). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die chemo-enzymatische Modifizierung in den komplexen Umgebungen pro- und vor allem auch eukaryotischer Zellen möglich ist, wobei letztere Kappen-bindende Proteine enthalten.

In der Folge fragten wir uns, ob unsere Methode auch geeignet sein könnte, um längere, Kappen-tragende RNAs zu modifizieren, die eher eukaryotischen mRNAs als das bisher genutzte m^7 GpppA entsprechen (Abbildung 1). Zu diesem Zweck stellten wir eine 106 nt lange, Kappen-tragende RNA durch In-vitro-Transkription und anschließendes Capping her und testeten daran unser chemo-enzymatisches Markierungsverfahren. Die Modifizierung der RNA mit AdoEnYn (**2**), katalysiert durch GlaTgs-Var1, und anschließende CuAAC führten zur Bildung fluoreszierender RNA, die in PAA-Gelen nachgewiesen wurde (Abbildung 3F). Die Überlagerung der Bilder zeigte die fluoreszierende Bande an derselben Position wie die durch Ethidiumbromidfärbung detektierte, was darauf hindeutet, dass die modifizierte RNA intakt ist.

Um zu testen, ob die RNA-Markierung spezifisch hinsichtlich der modifizierten Kappenstruktur ist, stellten wir eine Kontroll-RNA derselben Länge her, allerdings ohne AdoMet in der Capping-Reaktion zuzusetzen. Die Kontroll-RNA sollte somit am 5'-Ende ein Guanosin enthalten, das über eine Triphosphatbrücke verknüpft, aber nicht an N^7 methyliert ist. Da die N^7 -Methylierung eine Voraussetzung für die weitere Modifizierung durch GlaTgs2 darstellt, sollte die Kontroll-RNA keine N^2 -Penteniny-Modifizierung der 5'-Kappe erhalten. Erwartungsgemäß zeigte die Kontroll-RNA keine fluoreszierende Bande im Gel, nachdem die chemo-enzymatische Modifizierung unter identischen Bedingungen wie zuvor durchgeführt worden war, was darauf schließen lässt, dass die Modifizierung spezifisch für die 5'-Kappe ist (Abbildung 3F). Daher kann unsere Methode genutzt werden, um spezifisch Kappen-tragende RNAs zu markieren.

Wir haben einen neuen Ansatz entwickelt, um Kappen-tragende RNA regiospezifisch zu modifizieren. Da die Kappe mRNAs kennzeichnet, hat unsere Methode ein breites potenzielles Anwendungsgebiet, wie die Isolierung oder Anreicherung von mRNAs aus eukaryotischer Total-RNA oder die selektive Markierung von mRNAs. Wir nutzen die Fähigkeit der Trimethylguanosinsynthasen, das m^7 G-Triphosphat am 5'-Ende des Biopolymers RNA zu erkennen, um eine bioorthogonale Reportergruppe einführen zu können, die in weiterer Folge die Verknüpfung mit einer frei wählbaren funktionalen Einheit ermöglicht – wie anhand der

Einführung eines Biotins und eines Fluorophors gezeigt wurde. Mithilfe der CuAAC konnten wir die Kappe sogar in der komplexen Umgebung zellulären Lysats modifizieren.

Unsere Strategie umfasst die enzymatische Modifizierung der mRNA-Kappe mit einem Alkenyl- oder Alkynylrest, gefolgt von einer geeigneten Klick-Reaktion, beispielsweise TEC oder CuAAC. Während zahlreiche Enzyme für die Modifizierung von DNA sowie nichtkodierenden RNAs (besonders tRNAs und rRNAs)^[21] bekannt sind, ist das Spektrum mRNA-spezifischer Methyltransferasen begrenzt, was die Auswahl an möglichen Enzymen für diesen Zweck einschränkt. Außerdem scheint die promiskuitive Aktivität der Tgs-Enzyme gegenüber AdoMet-Analoga gering gegenüber der anderer Methyltransferasen, die bereits für chemo-enzymatische Modifizierungen von Proteinen,^[7c,f] DNA,^[3,7a] tRNA^[7d,e] und prä-mRNA^[7e] genutzt wurden. Wir mussten GluTgs-Varianten generieren, um eine gute Aktivität bezüglich der AdoMet-Analoga zu erhalten. Die beste Variante, GluTgs-Var1, zeigte nicht nur eine erhöhte spezifische Aktivität gegenüber **1** und **2**, sondern auch ein bemerkenswert höheres Produktionslevel. GluTgs2-Var1 war in der Lage, bis zu 91 % m⁷GpppA (**3**) mit AdoPropen als Substrat und bis zu 25 % mit AdoEnYn umzusetzen.

Besonders erwähnenswert ist, dass unser Ansatz auch genutzt werden kann, um längere, Kappen-tragende RNAs zu modifizieren, was wir durch Markierung einer transkribierten und Kappen-tragenden, 106 nt langen RNA zeigen konnten. Dieses Ergebnis könnte ein Wegbereiter für nützliche Anwendungen dieses Verfahrens im Bereich der mRNA-Isolierung und -Markierung sein. Es ist vorstellbar, durch Erweiterung des Cosubstrat-Spektrums mithilfe von Protein-Engineering chemo-enzymatische Modifizierungen unter Verwendung Kupfer-freier Klick-Reaktionen zu erreichen. Für intrazelluläre Anwendungen müssen mögliche Probleme, wie eine Interferenz mit der snRNA/snoRNA-Maschinerie oder induzierte Veränderung in der zellulären Lokalisation durch die 5'-Modifizierung, untersucht und gelöst werden.

Eingegangen am 7. April 2013

Online veröffentlicht am 21. Juni 2013

Stichwörter: AdoMet-Analoga · Enzymkatalyse · Klick-Chemie · mRNA · Trimethylguanosinsynthase

- [1] K. C. Martin, A. Ephrussi, *Cell* **2009**, *136*, 719–730.
- [2] P. M. E. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8478–8487; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350–8358.
- [3] a) C. Dalhoff, G. Lukinavicius, S. Klimasauskas, E. Weinhold, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1879–1886; b) C. Dalhoff, G. Lukinavicius, S. Klimasauskas, E. Weinhold, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 31–32.
- [4] C. Y. Jao, A. Salic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 15779–15784.

- [5] M.-L. Winz, A. Samanta, D. Benzinger, A. Jäschke, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, e78.
- [6] J. Schoch, S. Ameta, A. Jäschke, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12536–12537.
- [7] a) G. Pljevaljčić, F. Schmidt, E. Weinhold, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 265–269; b) G. Lukinavicius, V. Lapienė, Z. Staševskij, C. Dalhoff, E. Weinhold, S. Klimasauskas, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2758–2759; c) W. Peters, S. Willnow, M. Duisken, H. Kleine, T. Macherey, K. E. Duncan, D. W. Litchfield, B. Luscher, E. Weinhold, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5296–5299; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5170–5173; d) Y. Motorin, J. Burhenne, R. Teimer, K. Koynov, S. Willnow, E. Weinhold, M. Helm, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 1943–1952; e) M. Tomkuvienė, B. Clouet-d'Orval, I. Cerniauskas, E. Weinhold, S. Klimasauskas, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 6765–6773; f) S. Willnow, M. Martin, B. Luscher, E. Weinhold, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1167–1173; g) R. Wang, W. Zheng, H. Yu, H. Deng, M. Luo, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7648–7651; h) R. Wang, K. Islam, Y. Liu, W. Zheng, H. Tang, N. Lallier, G. Blum, H. Deng, M. Luo, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1048–1056.
- [8] S. Hausmann, S. Zheng, M. Costanzo, R. L. Brost, D. Garcin, C. Boone, S. Shuman, B. Schwer, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 31706–31718.
- [9] I. Lemm, C. Girard, A. N. Kuhn, N. J. Watkins, M. Schneider, R. Bordonne, R. Luhrmann, *Mol. Biol. Cell* **2006**, *17*, 3221–3231.
- [10] a) S. Hausmann, S. Shuman, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 32101–32106; b) S. Hausmann, M. A. Altura, M. Witmer, S. M. Singer, H. G. Elmendorf, S. Shuman, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 12077–12086.
- [11] T. Monecke, A. Dickmanns, R. Ficner, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 3865–3877.
- [12] a) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021; b) C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1584–1617; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1540–1573.
- [13] D. Benarroch, M. Jankowska-Anyszka, J. Stepinski, E. Darzynkiewicz, S. Shuman, *RNA* **2010**, *16*, 211–220.
- [14] a) F. Kiefer, K. Arnold, M. Kunzli, L. Bordoli, T. Schwede, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D387–392; b) K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, *Bioinformatics* **2006**, *22*, 195–201.
- [15] a) J. Chang, B. Schwer, S. Shuman, *RNA* **2010**, *16*, 1018–1031; b) S. Hausmann, A. Ramirez, S. Schneider, B. Schwer, S. Shuman, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 1411–1420.
- [16] M. A. Smith, A. Rentmeister, C. D. Snow, T. Wu, M. F. Farrow, F. Mingard, F. H. Arnold, *FEBS J.* **2012**, *279*, 4453–4465.
- [17] J. D. Bloom, S. T. Labthavikul, C. R. Otey, F. H. Arnold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 5869–5874.
- [18] a) Y.-X. Chen, G. Triola, H. Waldmann, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 762–773; b) F. Wojcik, A. G. O'Brien, S. Götze, P. H. Seeberger, L. Hartmann, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 3090–3098.
- [19] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644–648.
- [20] a) R. L. Weller, S. R. Rajski, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2141–2144; b) J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639–3642.
- [21] H. Grosjean, *DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution* (Hrsg.: H. Grosjean), Landes Bioscience, Austin, **2009**.