

mRNA-Modifizierung

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201507577
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201507577**Eine biokatalytische Kaskade für die vielseitige Eintopf-Modifizierung von mRNA ausgehend von Methioninanalogen**

Fabian Muttach und Andrea Rentmeister*

Professor Ulrich Hahn zum 65. Geburtstag gewidmet

Abstract: Methyltransferasen sind nützlich, um funktionelle Gruppen ortsspezifisch in Biomoleküle einzubauen, wenn Analoga des Kosubstrates S-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet) verfügbar sind. Methyltransferasen wurden eingesetzt, um RNA-Moleküle selektiv und ortsspezifisch zu adressieren, was für biophysikalische und mechanistische Studien sowie die Markierung in der komplexen zellulären Umgebung unerlässlich ist. AdoMet-Analoga sind jedoch nicht zellgängig, sodass diese Strategie nicht in Zellen anwendbar ist. Wir präsentieren eine zweistufige enzymatische Kaskade zur ortsspezifischen mRNA-Modifizierung ausgehend von Methioninanalogen. Unser Ansatz kombiniert die enzymatische Synthese von AdoMet mit der Modifikation der 5'-Kappe durch eine spezifische mRNA-Methyltransferase in einem Eintopfverfahren. Wir zeigen, dass eine Reihe von Substraten, unter anderem mit Alken-, Alkin- und Azidoresten, eingesetzt werden kann und dass die weitere Derivatisierung mit Klick-Reaktionen gelingt.

S-Adenosyl-L-methionin (AdoMet oder SAM) ist nach ATP das zweithäufigste Kosubstrat, das in der Natur genutzt wird, und stellt die Hauptquelle für Methylgruppen in Biomolekülen dar.^[1] Die Methylierung ist an grundlegenden biologischen Prozessen beteiligt, beispielsweise an bakterieller Wirtverteidigung, epigenetischer Stummschaltung und zellulärer Signalübertragung, und in allen Klassen von Biopolymeren sowie in Lipiden und vielen kleinen Molekülen zu finden.^[1,2] Neuere Arbeiten über unterschiedliche Methyltransferasen ergaben, dass diese Enzyme bemerkenswerte Substratpromiskuität zeigen und synthetische AdoMet-Analoga akzeptieren können.^[2d,3] In mehreren Fällen wurde die promiskuite Aktivität signifikant durch einzelne Aminosäuresubstitutionen erhöht.^[4] Die effiziente Übertragung einer Reihe funktioneller Gruppen auf Methyltransferase-Substrate ermöglicht die anschließende, hochselektive Umsetzung in verschiedenen Klick-Reaktionen.^[5]

[*] F. Muttach, Prof. Dr. A. Rentmeister

Universität Münster, Fachbereich Chemie und Pharmazie, Institut für Biochemie
Wilhelm-Klemm-Straße 2, 48149 Münster (Deutschland)
E-Mail: a.rentmeister@uni-muenster.deProf. Dr. A. Rentmeister
Cells-in-Motion Cluster of Excellence (EXC 1003 – CiM)
Universität Münster (Deutschland)Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201507577> zu finden.

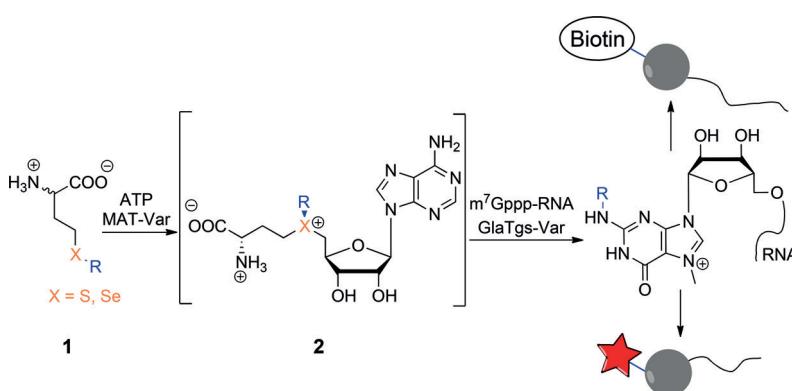
Allerdings sind AdoMet und davon abgeleitete Analoga nicht zellgängig, und spezialisierte Transportproteine wurden in Säugetieren nicht beschrieben. Deshalb liegt in der Bereitstellung von AdoMet-Analoga in der eukaryotischen Zelle eine große Einschränkung des oben erwähnten Ansatzes. Die begrenzte Stabilität von AdoMet in wässriger Lösung verschlimmert dieses Problem.^[6] Darüber hinaus erfordert die chemische Synthese von AdoMet-Analoga saure Bedingungen und resultiert in einer Mischung von Epimeren am Schwefelatom, von denen nur das S,S-Epimer als Substrat von Methyltransferasen akzeptiert wird.^[7]

Diese Beschränkungen von synthetischen AdoMet-Analoga werden umgangen, wenn man auf den Biosyntheseweg ausweicht. In der Natur wird AdoMet aus Methionin und ATP produziert, und die Reaktion wird von Methionin-Adenosyltransferasen (MATs) katalysiert.^[8] MAT wurde bereits genutzt, um enantiomerenreines AdoMet zu produzieren – sowohl durch das isolierte Enzym als auch durch mikrobielle Fermentation.^[9] Methioninanaloge wurden in MAT-katalysierten Reaktionen genutzt, um Quorum Sensing^[10] und Alkyrlandomisierung von Sekundärmetaboliten zu untersuchen^[11] sowie um Methylierungsstellen von Protein-Ariginin-Methyltransferasen bei der Chromatinmodifizierung zu identifizieren,^[12] aber nicht für Nukleinsäuren.

Hier berichten wir über die enzymatische Produktion von AdoMet-Analoga, die an eine RNA-Methyltransferase gekuppelt sind. Unter Verwendung dieser enzymatischen Kaskade können wir direkt und ortsspezifisch eukaryotische Modell-mRNAs an ihrer 5'-Kappe ausgehend von Methioninanalogen anstelle von synthetischen AdoMet-Analoga modifizieren und anschließend die Kappenstruktur mithilfe verschiedener Arten von Klick-Chemie markieren.

Zur Verwirklichung dieses Ansatzes für eine ausgewählte Reihe an Substraten benötigten wir sowohl eine MAT als auch eine RNA-Methyltransferase mit signifikanten Aktivitäten für die jeweiligen Substratanaloga. Wir nutzten eine Variante der RNA-Methyltransferase GlaTgs2 (GlaTgs-Var) aus *Giardia lamblia*, die bekannt dafür ist, Allyl-, Alkin-, Azido- oder Benzylreste auf die *N*²-Position der mRNA-5'-Kappe zu übertragen.^[4a,d,13]

Das Nebenprodukt S-Adenosylhomocystein (SAH) inhibiert Methyltransferasen, kann aber im selben Ansatz enzymatisch abgebaut werden.^[14] Um das benötigte AdoMet-Analogon *in situ* zu produzieren, erforschten wir die Substratpromiskuität von rekombinant produzierter humarer MATIIa I117A (MAT-Var), von der berichtet wurde, Methioninderivate mit längeren Alkylseitenketten zu akzeptieren (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen).^[12b] Da



Schema 1. Enzymatische Modifizierung eukaryotischer mRNA mit 5'-Kappe ausgehend von racemischen Methioninanalogen. Ein AdoMet-Analogon **2** wird in situ aus **1** und ATP unter Nutzung von MAT-Var gebildet und wirkt als ein Kofaktor für die RNA-Methyltransferase GlaTgs-Var, was zur Modifikation der 5'-Kappe an Position N⁷ führt. Die eingeführten Gruppen (R) können weiter mit verschiedenen Arten von Klick-Chemie umgesetzt werden, um Affinitäts- oder Fluoreszenzmarker einzufügen.

MAT eine starke Produktinhibierung zeigt,^[8,9b] bauten wir eine enzymgekoppelte Reaktion auf, um direkt AdoMet (oder seine Analoga) zu verbrauchen und die mRNA-5'-Kappe zu markieren (Schema 1).

Wir realisierten unser gekoppeltes MAT/GlaTgs-System zuerst mit dem natürlichen Substrat L-Methionin, aber auch D-Methionin und einem racemischen Gemisch von beiden und dem mRNA-Kappenanalogen m⁷GpppA als Methylakzeptor (Abbildung S2). Wie erwartet führte L-Methionin zur Bildung von m⁷GpppA, wohingegen D-Methionin nicht verbraucht wurde, aber die Umsetzung nicht behinderte, was in der Folge die Nutzung von racemischem Methionin ermöglichte.^[15]

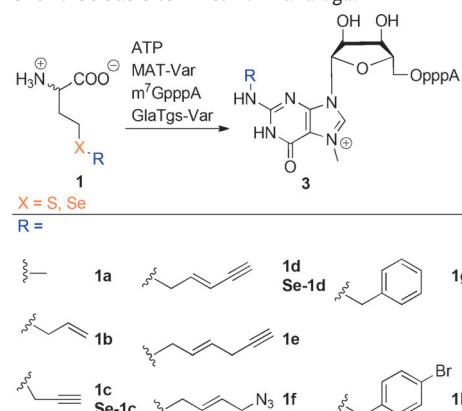
Als nächstes nutzten wir die enzymatische Kaskade, um Methioninanaloge umzusetzen und m⁷GpppA mit verschiedenen funktionellen Gruppen ortsspezifisch an N⁷ zu modifizieren. Wir synthetisierten eine Reihe von S-derivatisierten Homocysteinen, die verschiedene Alken-, Alkin-, Azido-Gruppen (**1a-f**) sowie Benzylreste (**1g,h**) tragen (Tabelle 1 und Abbildung S3). Darüber hinaus synthetisierten wir zwei Analoga basierend auf Selenohomocystein, da die resultierenden Se-AdoMet-Analoga effizienter beim Seitenkettentransfer sind.^[6b,16]

Die racemischen Methioninanaloge wurden direkt in einem Ansatz, der beide Enzyme sowie ATP und m⁷GpppA enthielt, umgesetzt. In einem typischen Experiment wurden 300 μM m⁷GpppA mit einem 8-fachen Überschuss an ATP und einem 20-fachen Überschuss an racemischem Methioninanalogon bei einer Katalysatormenge von 3–7 Mol-% MAT-Var (bezogen auf m⁷GpppA) eingesetzt. Die GlaTgs-Var-Konzentration war normalerweise dreimal so hoch wie die MAT-Var-Konzentration, um zu gewährleisten, dass in situ gebildete AdoMet-Analoga direkt umgesetzt werden.^[4a,12a] Dies ist wichtig, da MAT üblicherweise einer starken Produktinhibierung durch AdoMet unterliegt.^[9b] Anders als bei der chemischen Synthese von AdoMet-Analoga wird nur ein Epimer gebildet (Abbildung S4).

Wir beobachteten den Transfer von Allyl-, Alkin- und Azidoresten mit verschiedenen sterischen Ansprüchen auf

m⁷GpppA in moderaten bis exzellenten Ausbeuten (Tabelle 1 sowie Abbildungen 1 und S5). Die kleine Allylgruppe in **1b** wurde bei 3 Mol-% MAT-Var fast quantitativ übertragen. Die chemisch interessantere Propargylgruppe **1c** lieferte jedoch selbst bei 7 Mol-% MAT-Var nur 11 % Umsatz, höchstwahrscheinlich wegen der geringeren Stabilität des in situ gebildeten AdoMet-Analogons **2c**.^[6b] Diese Einschränkung konnte durch den Wechsel zum Selen-basierten Methioninanalogon beseitigt werden. **Se-1c** erhöhte die Umsetzung drastisch, sodass 91–100 % an N⁷-Propargyl-m⁷GpppA bei 3–7 Mol-% MAT-Var erhalten werden konnten. Diese Befunde sind in Einklang mit solchen, die mit chemisch synthetisiertem **Se-2c** erhalten wurden.^[6b]

Tabelle 1: Enzymatische Eintopf-Modifizierung von m⁷GpppA ausgehend von S- und Se-basierten Methioninanalogen.^[a]



| Nr. | Substr. | MAT [Mol-%] | Prod. | Umsatz [%] |
|-----|--------------|----------------|-----------|---------------|
| 1 | 1a | 3 | 3a | 100 |
| 2 | 1b | 3 | 3b | 95 |
| 3 | 1b | 5 | 3b | 100 |
| 4 | 1c | 3 | 3c | 4 |
| 5 | 1c | 7 | 3c | 11 |
| 6 | Se-1c | 3 | 3c | 91 |
| 7 | Se-1c | 5 | 3c | 100 |
| 8 | Se-1c | 7 | 3c | 100 |
| 9 | 1d | 3 | 3d | 10 |
| 10 | 1d | 7 | 3d | 35 |
| 11 | Se-1d | 3 | 3d | 17 |
| 12 | Se-1d | 7 | 3d | 47 |
| 13 | 1e | 3 | 3e | 38 |
| 14 | 1e | 5 | 3e | 77 |
| 15 | 1e | 7 | 3e | 100 |
| 16 | 1f | 3 | 3f | 12 |
| 17 | 1f | 5 | 3f | 72 |
| 18 | 1g | 3 | 3g | 2 |
| 19 | 1g | 7 | 3g | 5 |
| 20 | 1h | 3 | 3h | Spuren |

[a] Umsätze bei verschiedenen Katalysatormengen (bezogen auf m⁷GpppA) sind gezeigt. Reaktionsbedingungen: 6 mM D/L-**1**, 2.5 mM ATP, 300 μM m⁷GpppA, MAT-Var wie angegeben, GlaTgs-Var 3 × höher als MAT-Var, Inkubation 8–9 h bei 23 °C.

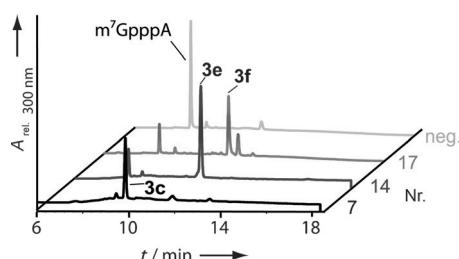


Abbildung 1. Ausgewählte HPLC-Chromatogramme der Reaktionen aus Tabelle 1. neg.: Negativkontrolle ohne **1**.

Die längeren Penteninyl- und Hexeninylgruppen **1d** bzw. **1e** wurden auch übertragen. Umsätze von 35 bzw. 100% konnten bei erhöhten Katalysatormengen (7 Mol-%) erreicht werden. Im Unterschied zu **Se-1c** steigerte die selenobasierte Aminosäure **Se-1d** die Ausbeute an **3d** nur moderat verglichen mit dem schwefelbasierten Gegenstück. Interessanterweise werden mit **1e** trotz der längeren Seitenkette höhere Ausbeuten als mit **1d** erzielt, was ebenso in Kombination mit Proteinmethyltransferasen beobachtet wurde.^[12b] Aromatische Gruppen erwiesen sich hingegen als schlechte Substrate. Das Benzyl-modifizierte Methioninanalogon **1g** gab nur 2–5% Umsatz, und das *para*-substituierte **1h** lieferte nur Spuren von **3h**.

Nachdem diese biokatalytische Kaskade zur ortsspezifischen Modifizierung der 5'-Kappe erfolgreich geprüft worden war, wollten wir testen, ob sich die eingebrachten funktionellen Gruppen an der N²-Position für eine weitere Derivatisierung eignen. Deshalb setzten wir **3c** (aus der Umsetzung von **Se-1c**) und **3e** mit Biotin-Azid in einer Kupfer(I)-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) um (Abbildung 2A) und bestätigten die Bildung des jeweils erwarteten Produktes, **Biotin-4c** bzw. **Biotin-4e** mittels HPLC und

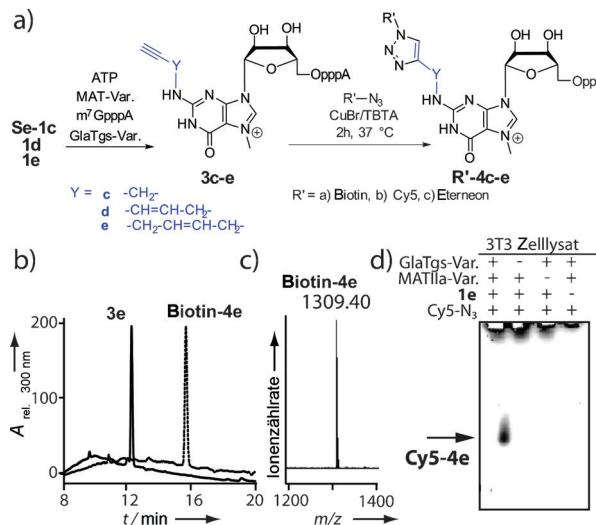


Abbildung 2. Postsynthetische Markierung von Alkin-funktionalisiertem m⁷GpppA. a) Enzymatische Einführung von verschiedenen terminalen Alkinen, gefolgt von CuAAC, mit verschiedenen Markierungen R'. b–c) HPLC- und MS-Analyse bestätigen CuAAC von **3e** mit Biotin-Azid. d) Fluoreszenz von **Cy5-4e** im Gel nach Trennung auf einem 10-proz. denat. PAGE (1.5 h bei 25 W).

MALDI-TOF-MS (Abbildungen 2B,C, S10 und S11). Zwei Fluoreszenzfarbstoffe, Cy5-Azid und Eterneon-Azid, wurden auch mit **3c** bzw. **3e** umgesetzt. Die Gelanalyse zeigte, dass nur dann eine Fluoreszenzbande resultiert, wenn beide Enzyme und die benötigte Aminosäure (**1e** oder **Se-1c**) vorhanden waren (Abbildung S12 A,B). Wichtig ist, dass wir die enzymatische Kaskadenreaktion auch in eukaryotischem Zelllysat durchführen konnten, was darauf schließen lässt, dass die enzymatische Kaskade auch selektiv in der Gegenwart von zellulären Komponenten funktioniert (Abbildungen 2D und S13).

Um unseren Ansatz für intrazelluläre Anwendungen nutzbar zu machen, wollten wir funktionelle Gruppen in einer wirklich bioorthogonalen Reaktion einfügen. Wir entwickelten das Methioninanalogon **1f**, um eine Azidogruppe zu übertragen, die in einer spannungsgetriebenen Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) reagieren sollte. Die Reaktion von **1f** mit m⁷GpppA ergab 72% **3f** bei 5 Mol-% MAT, und das Produkt wurde mittels MALDI-TOF-MS bestätigt (Tabelle 1 sowie Abbildungen 1 und S14). Die anschließende SPAAC-Reaktion von **3f** mit Dibenzocyclooctin-Sulforhodamin B (DBCO-SRB) ergab eine fluoreszenzmarkierte 5'-Kappe, die nach PAGE-Trennung nur dann eine fluoreszente Bande zeigte, wenn alle Komponenten vorhanden waren. Der enzymatische Transfer war auch wieder in eukaryotischem Zelllysat erfolgreich (Abbildung S15).

Um sicherzustellen, dass unser Ansatz für die Markierung eukaryotischer mRNAs geeignet ist, produzierten wir 24 und 106 nt lange RNAs durch In-vitro-Transkription und Capping mit dem Vaccinia Capping System^[17] und setzten sie in unserer biokatalytischen MAT/GlaTgs-Kaskade ein (Abbildungen 3 und S22). Ausgehend von **1e** resultierte die nach-

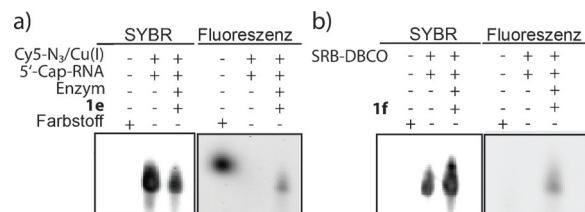


Abbildung 3. Markierung einer 24 nt langen Modell-mRNA mit 5'-Kappe ausgehend von Methioninanalogen **1e** oder **1f**, gefolgt von CuAAC bzw. SPAAC. a) Gelanalyse nach CuAAC durch SYBR-Färbung und Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex}} = 628 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 716 \text{ nm}$). Als Kontrolle ist RNA mit 5'-Kappe gezeigt, die nicht mit **1e** behandelt wurde. b) Gelanalyse nach SPAAC durch SYBR-Färbung und Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 609 \text{ nm}$). Als Kontrolle ist RNA mit 5'-Kappe gezeigt, die nicht mit **1f** behandelt wurde. Bromphenolblau wurde als Farbmärker verwendet und wird bei $\lambda = 590 \text{ nm}$ angeregt. Trennung auf einem 15-proz. denat. PAGE (1.5 h bei 25 W).

folgende Markierung mit Cy5-Azid in einer spezifischen Fluoreszenzmodifikation der Alkin-modifizierten RNA (Abbildung 3A; Abbildung S16 für 106 nt RNA). Biotin-Azid reagierte in analoger Weise (Abbildung S17).

Ausgehend von **1f** wurde die SPAAC-Reaktion auch mit DBCO-SRB für die 24 nt lange RNA mit 5'-Kappe durchgeführt. Die resultierende SRB-modifizierte RNA wurde

mittels Fluoreszenz im Gel analysiert. Vergleich mit RNA-Färbung mithilfe von SYBR zeigte, dass die SPAAC-Reaktion auch mit 5'-Kappen-tragender RNA, die in einer enzymatischen Kaskade ausgehend von **1f** (Abbildung 3B) modifiziert wurde, funktioniert. Die Massenanalysen der unmodifizierten 24-nt-RNA und der mit 5'-Kappe versehenen 24-nt-RNA sind in den Hintergrundinformationen gezeigt (Abbildung S18).

Zusammenfassend ermöglicht unser Kaskadenansatz den ortsspezifischen Transfer einer Reihe von chemischen Funktionalitäten auf die mRNA-Kappenstruktur ausgehend von stabilen und einfach herstellenden Methioninanalogen. Alkin-tragende Seitenketten verschiedener Länge und Azidoreste wurden effizient auf die 5'-Kappe sowie RNA mit 5'-Kappe übertragen. Die nachfolgenden Klick-Reaktionen eröffnen den Zugang zu Biotin- und Fluorophor-modifizierten mRNAs. Da Methioninanaloge zellgängig sind^[12b,18] und die enzymatischen Schritte auch selektiv in eukaryotischem Zellsatz funktionieren, gehen wir davon aus, dass unser Ansatz auch für eine intrazelluläre Markierung von RNA funktionieren wird. In Kombination mit anderen RNA- oder DNA-Methyltransferasen sollte unser Ansatz ein generelles Konzept für die ortsspezifische intrazelluläre Nukleinsäuremodifikation darstellen. Angesichts der jüngsten Entdeckungen von reversibler Adenosinmethylierung in bakterieller und eukaryotischer mRNA^[19] erwarten wir eine breite Palette von Anwendungen in der nahen Zukunft.

Danksagung

A.R. dankt der DFG und dem FCI für Unterstützung (RE 2796/2-1). F.M. wird durch das DFG-Schwerpunktprogramm SPP 1784 (RE 2796/3-1) unterstützt. Wir danken Dr. Daniela Stummer, Stephan H. H. Schiefelbein, Henning Klaasen, Kathrin Kirchhoff und Dr. Wolfgang Dörner für exzellente technische Assistenz. Unser Dank gilt außerdem der Massenspektrometrie- und der NMR-Abteilung des Instituts für Organische Chemie.

Stichwörter: 5'-Kappen · Klick-Chemie · Markierungen · RNA · SAM-Synthetasen

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1917–1920
Angew. Chem. **2016**, *128*, 1951–1954

- [1] M. Fontecave, M. Atta, E. Mulliez, *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29*, 243–249.
- [2] a) L. A. Wessjohann, J. Keim, B. Weigel, M. Dippe, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 229–235; b) K. K. Biggar, S. S. C. Li, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 5–17; c) A. Jeltsch, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 274–293; d) Y. Motorin, J. Burhenne, R. Teimer, K. Koynov, S. Willnow, E. Weinhold, M. Helm, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 1943–1952; e) E. Staudacher, *Biol. Chem.* **2012**, *393*,

- 675–685; f) D. E. Vance, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2014**, *1838*, 1477–1487.
- [3] C. Dalhoff, G. Lukinavicius, S. Klimasauskas, E. Weinhold, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 31–32.
- [4] a) J. M. Holstein, D. Stummer, A. Rentmeister, *Protein Eng. Des. Sel.* **2015**, *28*, 179–186; b) K. Islam, W. Zheng, H. Yu, H. Deng, M. Luo, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 679–684; c) R. Wang, W. Zheng, H. Yu, H. Deng, M. Luo, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7648–7651; d) D. Schulz, J. M. Holstein, A. Rentmeister, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7874–7878; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 8028–8032.
- [5] a) R. Wang, K. Islam, Y. Liu, W. Zheng, H. Tang, N. Lailler, G. Blum, H. Deng, M. Luo, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1048–1056; b) D. Stummer, C. Herrmann, A. Rentmeister, *ChemistryOpen* **2015**, *4*, 295–301; c) J. M. Holstein, D. Stummer, A. Rentmeister, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 1362–1369.
- [6] a) G. Lukinavičius, M. Tomkuvienė, V. Masevičius, S. Klimasauskas, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1134–1139; b) S. Willnow, M. Martin, B. Lüscher, E. Weinhold, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1167–1173; c) C. Dalhoff, G. Lukinavičius, S. Klimasauskas, E. Weinhold, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1879–1886.
- [7] P. K. Chiang, R. K. Gordon, J. Tal, G. C. Zeng, B. P. Doctor, K. Pardhasaradhi, P. P. McCann, *FASEB J.* **1996**, *10*, 471–480.
- [8] G. D. Markham, M. A. Pajares, *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 636–648.
- [9] a) J. Chu, J. Qian, Y. Zhuang, S. Zhang, Y. Li, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 41–49; b) M. Kotb, N. M. Kredich, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3923–3930.
- [10] S. P. Zano, P. Bhansali, A. Luniwal, R. E. Viola, *Arch. Biochem. Biophys.* **2013**, *536*, 64–71.
- [11] S. Singh, J. J. Zhang, T. D. Huber, M. Sunkara, K. Hurley, R. D. Goff, G. J. Wang, W. Zhang, C. M. Liu, J. Rohr, S. G. Van Lanen, A. J. Morris, J. S. Thorson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3965–3969; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 4046–4050.
- [12] a) R. Wang, W. Zheng, M. Luo, *Anal. Biochem.* **2014**, *450*, 11–19; b) R. Wang, K. Islam, Y. Liu, W. Zheng, H. Tang, N. Lailler, G. Blum, H. Deng, M. Luo, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1048–1056.
- [13] J. M. Holstein, D. Schulz, A. Rentmeister, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 4478–4481.
- [14] D. Schulz, A. Rentmeister, *RNA Biol.* **2012**, *9*, 577–586.
- [15] C. T. Holloway, R. C. Greene, C. H. Su, *J. Bacteriol.* **1970**, *104*, 734–747.
- [16] a) M. Tomkuvienė, B. Clouet-d'Orval, I. Cerniauskas, E. Weinhold, S. Klimasauskas, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 6765–6773; b) I. R. Bothwell, M. K. Luo, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 3056–3059.
- [17] S. Shuman, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 11960–11966.
- [18] J. Xie, P. G. Schultz, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 775–782.
- [19] a) X. Deng, K. Chen, G.-Z. Luo, X. Weng, Q. Ji, T. Zhou, C. He, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 6557–6567; b) D. Dominissini, S. Moshitch-Moshkovitz, S. Schwartz, M. Salmon-Divon, L. Ungar, S. Osenberg, K. Cesarkas, J. Jacob-Hirsch, N. Amarliglio, M. Kupiec, R. Sorek, G. Rechavi, *Nature* **2012**, *485*, 201–206; c) K. D. Meyer, Y. Saletore, P. Zumbo, O. Elemento, C. E. Mason, S. R. Jaffrey, *Cell* **2012**, *149*, 1635–1646.

Eingegangen am 13. August 2015,
veränderte Fassung am 22. Oktober 2015
Online veröffentlicht am 22. Dezember 2015