

# Modifizierung der 5'-Kappe eukaryotischer mRNA für Klick-Reaktionen und zur Beeinflussung der Translationseffizienz in lebenden Zellen

Josephin M. Holstein, Lea Anhäuser und Andrea Rentmeister\*

**Abstract:** Die 5'-Kappe ist ein Charakteristikum eukaryotischer mRNAs und nimmt im RNA-Metabolismus entscheidende Rollen ein, die sich von der Qualitätskontrolle über den Export bis hin zur Translation erstrecken. Die Modifizierung der 5'-Kappe könnte daher die Modulierung dieser Prozesse und die Erforschung verschiedener biologischer Funktionen ermöglichen. Wir präsentieren einen direkten Ansatz zur Erzeugung einer Auswahl N7-modifizierter Kappen basierend auf der hoch promiskuitiven Methyltransferase Ecm1. Wir zeigen, dass diese sowie N<sup>2</sup>-modifizierte 5'-Kappen zur Steuerung der Translation entsprechender mRNAs *in vitro* und in Zellen genutzt werden können. Entsprechende Modifikationen ermöglichen die anschließende Anwendung bioorthogonaler Reaktionen, z. B. die intrazelluläre Markierung einer Ziel-mRNA in lebenden Zellen. Die effiziente und vielseitige Manipulierung des N7-Atoms der mRNA-Kappe ist ein wertvoller Beitrag zum Methodenrepertoire der chemischen Biologie.

Die eukaryotische Boten-RNA (mRNA) hat sich bei der exogenen Proteinexpression in eukaryotischen Zellen zu einer nützlichen Alternative zu DNA-basierten Vektoren entwickelt. Die Vorteile beruhen auf dem nahezu direkten Start der Translation und den typischerweise höheren Transfektionseffizienzen, da es ausreicht, ins Zytosol zu gelangen. Obwohl die im Vergleich zu DNA geringe Stabilität von mRNA durchaus eine Rolle spielen kann, wird die Tatsache, dass mRNA das Genom der Zelle nicht permanent verändert, als Vorteil für therapeutische Anwendungen gesehen.<sup>[1]</sup> Demzufolge finden Ansätze zur Steuerung der Translationseffizienz und Stabilität spezifischer Transkripte immer mehr Beachtung.<sup>[2]</sup> Ein wesentlicher Faktor für die Initiation der Translation von mRNAs ist die Wechselwirkung der 5'-Kappe mit dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor eIF4E, und Veränderungen der 5'-Kappe können die Translation direkt beeinflussen.<sup>[3]</sup> Zusätzlich zur allgemeinen Bedeutung für die Translation können mRNAs in eukaryotischen Zellen asymmetrisch verteilt und in vielen Fällen lokal translatiert werden.<sup>[4]</sup> Die molekularen Details

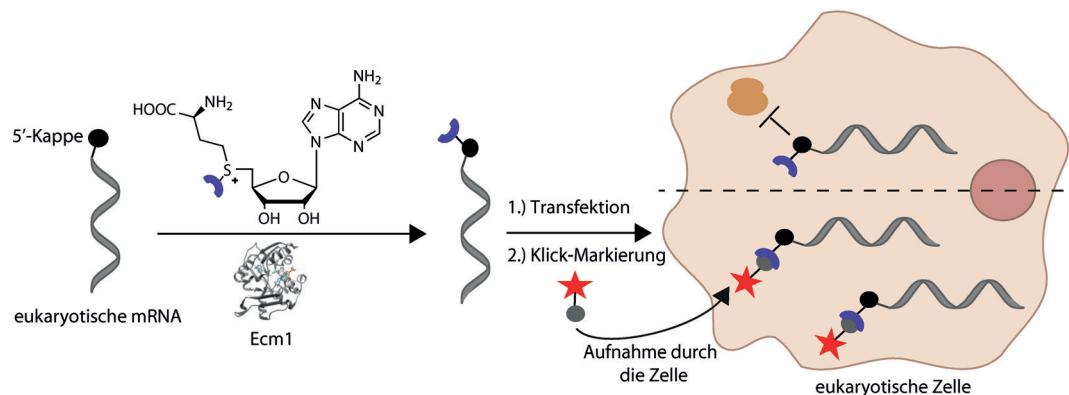
dieser Mechanismen, wie dem zur subzellulären Lokalisation führenden aktiven Transport, sind jedoch kaum verstanden.<sup>[5]</sup> Um diese dynamischen Prozesse zu erforschen, werden Methoden zur Markierung von mRNAs benötigt. Idealerweise sollte die Ziel-mRNA so wenig wie möglich verändert werden, sodass zweistufige chemo-enzymatische Ansätze<sup>[6]</sup> eine attraktive Alternative zum derzeit weit verbreiteten Einsatz fluoreszenzmarkierter RNA-bindender Proteine bilden (Übersichtsartikel in Lit. [7]).

Bislang wird die eigentliche Klick-Reaktion mit RNA typischerweise in fixierten Zellen durchgeführt, abgesehen von einem Bericht, bei dem eine Tetrazin-Ligation einer kurzen synthetischen RNA in lebenden Zellen durchgeführt wurde.<sup>[8]</sup>

Wir zeigen zum ersten Mal die Manipulierung einer bestimmten eukaryotischen mRNA in lebenden Zellen. Die Translationseffizienz dieser mRNA kann ohne Veränderung der Sequenz und ohne den Einsatz von RNA-bindenden Proteinen einfach aufgrund der enzymatischen Anfügung einer kleinen funktionellen Gruppe entweder in die N7-Position oder die exocyclische Aminofunktion (N<sup>2</sup>) der Kappe gesteuert werden. Diese Modifikationen wurden für Klick-Reaktionen in lebenden Zellen genutzt und ermöglichen daher sowohl die Markierung eines Biomoleküls als auch die Steuerung seiner biologischen Funktion in lebenden Zellen (Abbildung 1).

Wir haben kürzlich über einen chemo-enzymatischen Ansatz zur Markierung der N<sup>2</sup>-Position der 5'-Kappe *in vitro* produzierter und mit einer Kappe versehener RNAs unter Verwendung einer Variante der Trimethylguanosin-Synthase aus *Giardia lamblia* (GlaTgs2-V34A) berichtet.<sup>[9]</sup> Die Aktivität dieser Methyltransferase erfordert die vorherige Methylierung des N7-Atoms, und selbst mittels Protein-Engineering veränderte Varianten zeigten nur eine eingeschränkte Aktivität auf größere AdoMet-Analoga, wodurch die Ausbeute von Markierungen auf ca. 30 % begrenzt ist.<sup>[9b,c]</sup> Bei der Suche nach einem geradlinigeren und effizienteren Ansatz wurden wir auf Ecm1 aufmerksam – eine Kappen-(Guanin-N7)-Methyltransferase aus dem Microsporidia-Parasiten *Encephalitozoon cuniculi* – dessen aktives Zentrum eher in einer Bindungsfurche als in einer Bindungstasche lokalisiert ist (Abbildung S1).<sup>[10]</sup> Basierend auf der Kristallstruktur haben wir vermutet, dass Ecm1 möglicherweise hoch promiskuitiv bezüglich des Cosubstrats ist, weil größere Substituenten am S-Atom aus der Bindungsfurche herausragen könnten (Abbildung S1). Tatsächlich stellten wir fest, dass rekombinant produziertes Ecm1 nicht nur, wie kürzlich beschrieben,<sup>[10a]</sup> in der Lage war, eine Methylgruppe auf das N7-Atom des Minimalsubstrates GpppA (**1**) zu übertragen

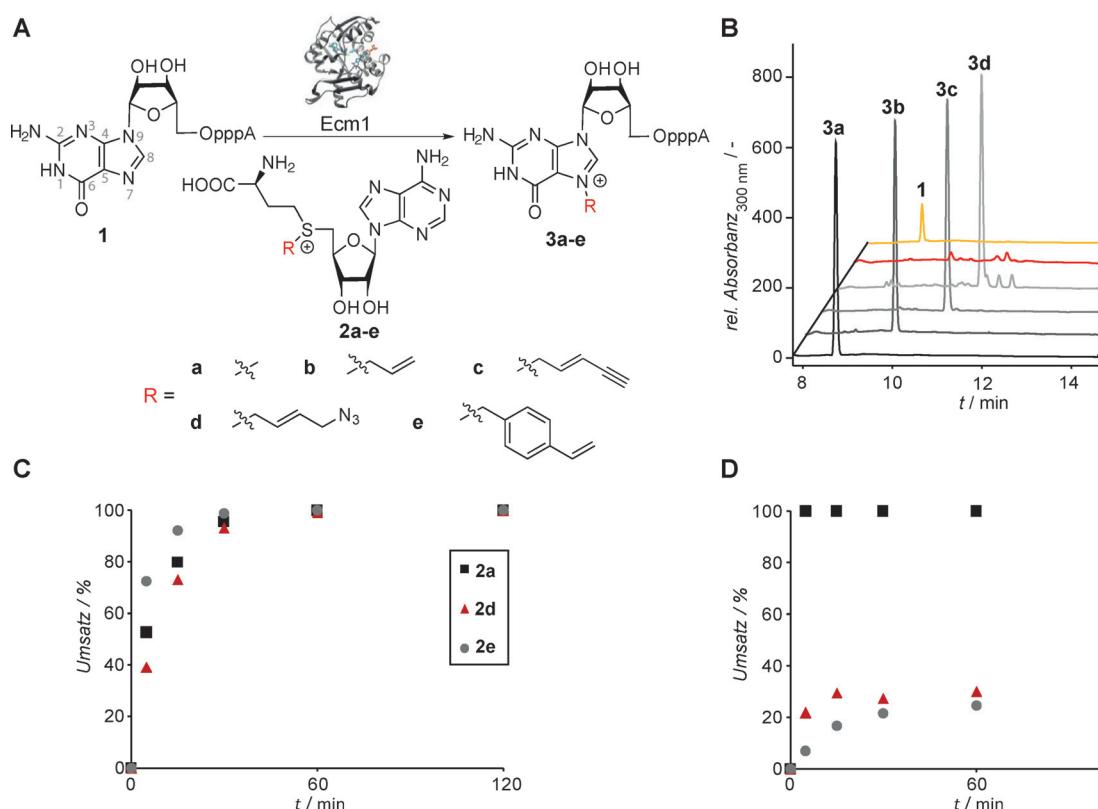
[\*] J. M. Holstein, L. Anhäuser, Prof. Dr. A. Rentmeister  
Westfälische Wilhelms-Universität Münster  
Fachbereich Chemie und Pharmazie, Institut für Biochemie  
Wilhelm-Klemm-Straße 2, 48149 Münster (Deutschland)  
E-Mail: a.rentmeister@uni-muenster.de  
Prof. Dr. A. Rentmeister  
Cells-in-Motion Cluster of Excellence (EXC 1003 – CiM)  
Westfälische Wilhelms-Universität Münster (Deutschland)  
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter:  
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201604107> zu finden.



**Abbildung 1.** Konzept der Steuerung der Translation und der Markierung von mRNA in lebenden Zellen über die 5'-Kappe. Die 5'-Kappe einer mRNA wird an der N7-Position unter Verwendung der Methyltransferase Ecm1 aus *Encephalitozoon cuniculi* modifiziert, welche fähig ist, sperrige Seitenketten von AdoMet-Analoga effizient zu übertragen.

(Abbildung S2), sondern ebenfalls Allyl-, Penteninyl, Vinylbenzyl- oder Azidobutetyl-Gruppen von den entsprechenden AdoMet-Analoga (**2b–e**), die analog vorheriger Protokolle synthetisiert wurden, anfügt.<sup>[9c,11]</sup> Die Erzeugung der Produkte **3a–e** wurde mittels Umkehrphasen-HPLC und Mas-

senspektrometrie bestätigt (Abbildungen 2, S3 und S4). Auffallend ist, dass Ecm1 in der Lage war, selbst die sterisch anspruchsvollen Substrate **2d** und **2e** effizient und nahezu quantitativ umzusetzen (Abbildungen 2C und S3, basierend auf HPLC-Analysen), wodurch es sich von GlaTgs2-V34A



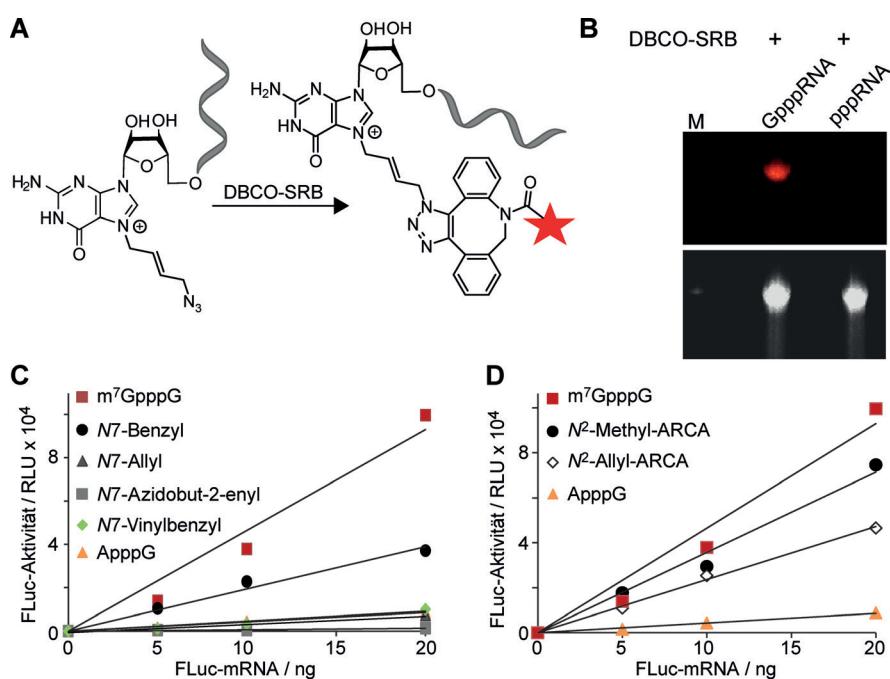
**Abbildung 2.** Enzymatische Modifizierung des Kappenanalogs GpppA (**1**) an N7 unter Verwendung von Ecm1. A) Ecm1 katalysiert den Transfer von a) Methyl-, b) Allyl-, c) Penteninyl-, d) 4-Azidobut-2-enyl- und e) 4-Vinylbenzyl-Resten auf das N7-Atom des Kappenanalogs **1**. B) HPLC-Analysen repräsentativer Modifizierungsreaktionen. In jedem Fall wurden 1 mm **1**, 5 Mol-% Ecm1, und ein 1- bis 3-facher molarer Überschuss des entsprechenden AdoMet-Analogons **2a–e** eingesetzt. Die Absorption bei 300 nm, die auf N7-modifizierte Kappenanaloga hinweist, ist gezeigt. Nicht-modifiziertes **1** zeigt nur eine schwache Absorption bei dieser Wellenlänge. Der Zeitversatz beträgt 2%. C,D) Zeitverläufe Ecm1- (C) und GlaTgs2-V34A-katalysierter Reaktionen (D) unter Verwendung von **2a**, **2d** oder **2e** mit 5 Mol-% Enzym sind aufgeführt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von zwei unabhängig voneinander durchgeföhrten Messungen unterschiedlicher Proteinpräparationen. Graue Ziffern zeigen die Nummerierung des Puringrüsts.

unterscheidet, das ebenfalls Substrat-Promiskuität zeigt, allerdings eine deutlich geringere Aktivität für **2d** und **2e** aufweist (Abbildung 2D). Die ausgeprägte Substrat-Promiskuität ermöglicht die schnelle und effiziente Umsetzung einer Reihe von AdoMet-Analoga und macht Ecm1 daher zu einem idealen Enzym für die Herstellung modifizierter 5'-Kappen.

Um sicherzustellen, dass dieser Ansatz für längere RNAs geeignet ist, haben wir eine 106 nt lange RNA mittels In-vitro-Transkription hergestellt und das *Vaccinia*-System (ohne Verwendung von AdoMet **2a**) für die 5'-Guanylierung zur Erzeugung von GpppRNA genutzt. Diese GpppRNA wurde für die N7-Azido-Modifizierung unter Verwendung von Ecm1 und **2d** eingesetzt. Um die Analyse zu erleichtern, wurde die modifizierte RNA in einer ringspannungsinduzierten Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) mit DBCO-SRB eingesetzt.<sup>[12]</sup> Sowohl die SPAAC-Reaktion als auch die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (IEDDA)<sup>[13]</sup> wurden zunächst an den N7-modifizierten Kappen **3d** und **3e** etabliert. Die Klick-Reaktionen von **3d** mit DBCO-SRB oder dem Alkyne-Megastokes-Dye sowie von **3e** mit Tetrazin-BDP resultierten in den erwarteten Produkten, deren Bildung mittels Massenspektrometrie und Fluoreszenzanalysen im Gel bestätigt wurde (Abbildungen S6–S7).

Die N7-Azido-modifizierte 106 nt lange RNA wurde in einer Reaktion mit DBCO-SRB unter etablierten Bedingungen eingesetzt, und nach der Gelelektrophorese wurde die Fluoreszenz im Gel analysiert. Im Fall der N7-modifizierten RNA konnte eine stark fluoreszierende Bande der korrekten Länge detektiert werden (unter Verwendung der grünen LED und des Exzitationsfilters 520/35 nm sowie des grünen Emissionsfilters 609/54 nm), was auf die erfolgreiche Markierung hinweist und einen signifikanten RNA-Abbau ausschließt. Erwartungsgemäß fluoreszierte die Kontroll-RNA ohne Kappe, die der gleichen Prozedur ausgesetzt war, bei dieser Wellenlänge nicht (Abbildung 3B). In gleicher Weise ermöglichte die Modifizierung dieser Modell-RNA mit einem 4-Vinylbenzyl-Rest (auch am N7-Atom der Kappe) unter Einsatz von Tetrazin-BDP die effiziente RNA-Markierung mittels IEDDA (Abbildung S8). Diese Daten zeigen, dass die Einbringung verschiedener Modifikationen in die N7-Position mit einer Kappe versehener RNA für die ortsspezifische Markierung für darauffolgende Klick-Reaktionen genutzt werden kann.

Die Methylierung der N7-Position ist entscheidend für die effiziente Translation, und die N7-methylierte Kappe wird



**Abbildung 3.** Markierung N7-Azidotbut-2-enyl-modifizierter RNA mittels SPAAC und die Translationseffizienz von FLuc-mRNAs mit verschiedenen Kappen. A) In vitro hergestellte und mit einer 5'-Kappe versehene RNA wurde in einer Reaktion mit Ecm1 und dem AdoMet-Analogon **2d** für die N7-Modifizierung und für die folgende Markierung mittels Klick-Chemie mit DBCO-SRB eingesetzt. B) Die Proben einer 106 nt langen RNA mit und ohne N7-modifizierter Kappe wurden mit DBCO-SRB inkubiert und die Fluoreszenz im Gel (10% denat. Polyacrylamid-Gel) analysiert. Im oberen Gel ist die SRB-Fluoreszenz gezeigt (unter Einsatz der grünen LED mit einem Exzitationsfilters 520/35 nm und dem grünen Emissionsfilter 609/54 nm) und das untere Gel zeigt die Ethidiumbromidfärbung (EtBr). C,D) Die Translationsaktivität der FLuc-mRNAs mit N7- (C) oder N<sup>2</sup>-modifizierten (D) 5'-Kappen. Die RNAs wurden für 60 min in Kaninchenretikulozyten-Lysat translatiert und die Luciferase-Aktivität in einer Vierfach-Bestimmung gemessen (RLU, „relative light units“). Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte von 2–4 unabhängigen Experimenten. DBCO = Dibenzocyclooctin, SRB = Sulforhodamin B.

spezifisch und fest vom eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor eIF4E gebunden.<sup>[3d]</sup> Es wird daher erwartet, dass Veränderungen an dieser Position die Translation beeinträchtigen, wie bereits für Ethyl- und Benzylgruppen in vitro berichtet wurde.<sup>[14]</sup> Um den Effekt verschiedener Modifikationen einschließlich bioorthogonaler Gruppen auf die Translation zu untersuchen, haben wir zwei Reporter-mRNAs, wie die Firefly-Luciferase (FLuc)- und eGFP-mRNA, konstruiert, die einschließlich einer 5'- und 3'-UTR sowie eines Poly(A)-Schwanzes ungefähr 1000–2000 nt lang sind (Abbildung S9–S11). Die N7-modifizierten Kappenanaloga wurden in diese Reporter-mRNAs während der In-vitro-T7-Transkription eingebaut.<sup>[15]</sup> Als Negativkontrolle wurde eine mit einer ApppG-Kappe (die keine Kappen-abhängige Translation eingehen kann) versehene RNA hergestellt. Die mRNAs, die keine Kappe aufwiesen, wurden unter Verwendung einer 5'-Polyphosphatase in Kombination mit der Exonuklease Xrn1 abgebaut (Abbildung S12).

In-vitro-Translationsanalysen ergaben, dass der Austausch der N7-Methylgruppe gegen größere Reste einschließlich der Vinylbenzyl- und der Azidotbutenylgruppe in den meisten Fällen die Translation, wie erwartet, inhibierte (Abbildung 3C). Die N7-Benzylgruppe reduzierte die

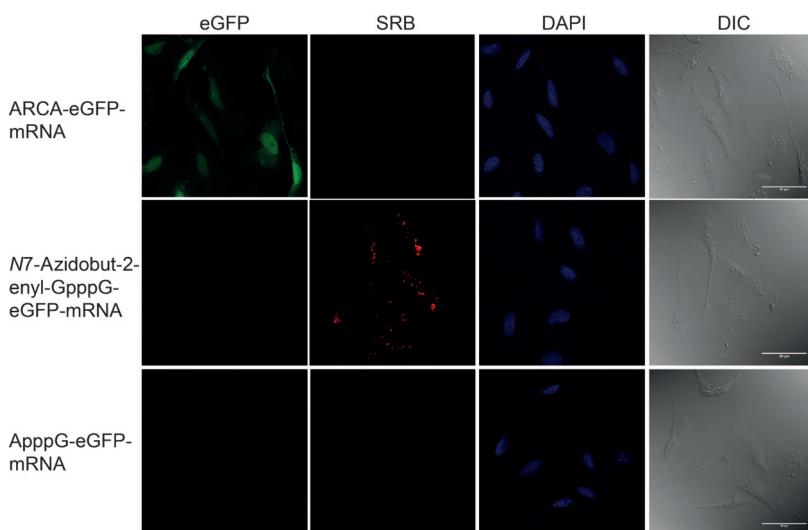
Translationseffizienz jedoch nur mäßig, was darauf hindeutet, dass die Größe des N7-Substituenten nicht der einzige Faktor ist, der die Wechselwirkung mit eIF4E beeinflusst. Unsere Beobachtungen sind im Einklang mit der kürzlich postulierten  $\pi$ -Wechselwirkung mit W166 von eIF4E<sup>[14]</sup> und deuten darauf hin, dass selbst Substituenten in der N7-Position zur Steuerung der Translationseffizienz genutzt werden können. Einzelne Substitutionen in der exocyclischen N<sup>2</sup>-Position hatten einen geringeren Effekt und ermöglichen die stufenweise Reduzierung der Translationseffizienz (Abbildung 3D).

Um sicherzustellen, dass der Effekt der Kappen-Modifizierung auf die Translation biologisch relevant ist, haben wir ebenfalls die Translation von eGFP-mRNAs, die verschiedene Kappen aufwiesen, in lebenden Zellen analysiert. HeLa-Zellen, die mit m<sub>2</sub><sup>7,3'-O</sup>GpppG- (d.h. ARCA) und der N<sup>2</sup>-Allyl-modifizierten eGFP-mRNA transfiziert wurden, entwickelten eine grüne Fluoreszenz, wobei N7-Allyl- oder N7-Azidobut-2-enyl-modifizierte eGFP-mRNAs oder die Negativkontrolle mit einer ApppG-Kappe in konfokalen Laser-rastermikroskopie-Aufnahmen nicht zu einem signifikant über dem Hintergrund liegenden Signal führten (Abbildungen 4 und S13). Diese Ergebnisse wurden mittels durchflusszytometrischer Daten für eGFP-mRNAs, die mit einer ARCA-, N7-Azido- oder ApppG-Kappe versehen waren, bestätigt (Abbildung S15). Diese Experimente lassen vermuten, dass die durch In-vitro-Studien ermittelte Translationseffizienz die tatsächliche Translation in eukaryotischen Zellen widerspiegelt und schließen alternative Translationsinitiationsmechanismen, die möglicherweise den Effekt der Kappenmodifikationen an der 5'-Kappe in lebenden Zellen übertreffen, aus. Unsere Ergebnisse zeigen, dass einige enzymatische Modifikationen an der eukaryotischen 5'-Kappe

besser toleriert werden als andere und dass diese Modifikationen zur Steuerung der Translationseffizienz von mRNAs genutzt werden können.

Zusätzlich zur Steuerung der Translation können einige der nicht-natürlichen Kappenmodifikationen für nachfolgende bioorthogonale Reaktionen und möglicherweise sogar für die mRNA-Markierung in lebenden Zellen genutzt werden. Die intrazelluläre Markierung einer bestimmten Ziel-mRNA, die keine Veränderungen in ihrer Nukleotidsequenz aufweist, würde die direkte Analyse der subzellulären Lokalisation und des Transports dieser mRNA zu einem bestimmten Zeitpunkt erlauben. Bislang konnte die kovalente Markierung von RNAs in Säugerzellen nach dem zufälligen Einbau modifizierter Nukleotide in naszierende Transkripte oder der enzymatischen Modifizierung von an die Ziel-mRNA angefügten RNA-Kennzeichnungen oder synthetischer siRNAs erzielt werden.<sup>[6,8]</sup> Bis auf die von Pyka et al.<sup>[8]</sup> beschriebene Tetrazin-Ligation wurde die Klick-Reaktion an sich jedoch immer nach der Fixierung von Zellen durchgeführt.<sup>[6]</sup> Wir haben kürzlich und in diesem Beitrag gezeigt, dass sowohl N<sup>2</sup>- als auch N7-Kappen-modifizierte Modell-mRNAs verschiedene Klick-Reaktionen einschließlich den bioorthogonalen SPAAC- und IEDDA-Reaktionen eingehen.<sup>[9a-c,16]</sup> Wir haben nun basierend auf der SPAAC-Reaktion, die bereits erfolgreich für die Markierung anderer Klassen von Biomolekülen auf der Zelloberfläche von Modellorganismen sowie selbst in lebenden Zellen angewendet wurde,<sup>[17]</sup> die intrazelluläre Markierung Kappen-modifizierter, aber ansonsten unveränderter, eGFP-mRNAs in lebenden Säugerzellen erzielt.

In diesem Sinne haben wir HeLa-Zellen mit den Kappen-modifizierten mRNAs transfiziert und anschließend DBCO-SRB hinzugefügt. Zur Visualisierung in einem konfokalen



**Abbildung 4.** Bioorthogonale Fluoreszenzmarkierung von eGFP-mRNAs in lebenden HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden jeweils mit N7-Azidobut-2-enyl-GpppG-, ARCA- und ApppG-eGFP-mRNA transfiziert, gefolgt von der Inkubierung mit DBCO-SRB und Waschschritten. Zur Visualisierung wurden die Zellen nach der Klick-Reaktion in lebenden Zellen fixiert. Von links nach rechts sind die eGFP-, SRB-, DAPI-Fluoreszenz und der DIC aufgeführt. Maßstab: 50 µm. DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, DIC = Differentialinterferenzkontrast.

Laserrastermikroskop wurden die Zellen nach der Klick-Reaktion mittels Paraformaldehyd fixiert. Für die N7-Azido-modifizierte mRNA wurden rot fluoreszierende Punkte detektiert, wobei mRNAs ohne Azido-Modifikation (ARCA- und ApppG-Kappen) keine signifikante rote Fluoreszenz zeigten. Dies deutet darauf hin, dass die SPAAC-Reaktion mit der mRNA erfolgreich in lebenden Zellen durchgeführt werden konnte und dass der Überschuss des SRB-Farbstoffes effizient genug aus der Zelle diffundieren konnte (Abbildung 4). Quantitative RT-PCR-Messungen bestätigten, dass die eGFP-mRNA in der Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten in höherer Konzentration als die zahlreich vorhandene  $\beta$ -Aktin-mRNA vorlag (Abbildung S16). Erwartungsgemäß resultierte die ARCA-eGFP-mRNA in einer grünen Fluoreszenz, was die eGFP-Produktion bestätigte. Dies signalisiert, dass zumindest ein Teil der mRNAs im Zytoplasma verfügbar ist und nach der Transfektion translatiert wird.

Zusammenfassend haben wir einen enzymatischen Ansatz entwickelt, welcher die Steuerung der Translationseffizienz und die

intrazelluläre Markierung spezifischer mRNAs in lebenden Zellen ermöglicht. Wir konnten zeigen, dass die Methyltransferase Ecm1 eine erstaunliche Promiskuität aufweist und sterisch anspruchsvolle Seitenketten verschiedener AdoMet-Analoga nahezu unbeeinträchtigt transferiert. Der effiziente Transfer ermöglicht zum ersten Mal die einfache Herstellung langer, translatierbarer und Kappen-modifizierter mRNAs, wie basierend auf eGFP- und Luciferase-mRNAs, die ca. 1000–2000 nt lang sind, veranschaulicht wurde. Die Steuerung der Translation durch die Kappen-Modifizierung erlaubt die Analyse von Funktionen der Ziel-mRNA jenseits der Funktion als Templat für Translationen. In Kombination mit bioorthogonaler Klick-Chemie haben wir ein Verfahren für die intrazelluläre Markierung einer Ziel-mRNA entwickelt, das wertvoll für die Analyse der subzellulären Lokalisation während dynamischer Prozesse, wie dem Auswuchs oder der Entwicklung polarisierter Zellen, ist.

## Danksagung

A.R. dankt dem Emmy-Noether-Programm der Deutschen Forschungsgemeinschaft (RE 2796/2-1) und dem Fonds der Chemischen Industrie (Dozentenstipendium) für die Unterstützung. Wir danken Prof. Dr. Karl-Heinz Klempnauer für das Plasmid mit dem Firefly-Luciferase-Gen. Wir danken Sabine Hüwel für die exzellente technische Unterstützung. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG EXC 1003, Exzellenzcluster „Cells in Motion“, Münster) unterstützt. J.M.H. und L.A. danken dem Fonds der Chemischen Industrie für Doktorandenstipendien.

**Stichwörter:** Bioorthogonale Chemie · Ecm1 · mRNA · RNA-Markierung · Translation

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10899–10903  
*Angew. Chem.* **2016**, *128*, 11059–11063

- [1] A. N. Kuhn, T. Beissert, P. Simon, B. Vallazza, J. Buck, B. P. Davies, O. Turecio, U. Sahin, *Curr. Gene Ther.* **2012**, *12*, 347–361.
- [2] a) A. N. Kuhn, M. Diken, S. Kreiter, A. Selmi, J. Kowalska, J. Jemielity, E. Darzynkiewicz, C. Huber, O. Tureci, U. Sahin, *Gene Ther.* **2010**, *17*, 961–971; b) J. Kowalska, A. Wypijewska del Nogal, Z. M. Darzynkiewicz, J. Buck, C. Nicola, A. N. Kuhn, M. Lukaszewicz, J. Zuberek, M. Strenkowska, M. Ziemiak, M. Maciejczyk, E. Bojarska, R. E. Rhoads, E. Darzynkiewicz, U. Sahin, J. Jemielity, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 10245–10264.
- [3] a) Z. Wieczorek, A. Niedzwiecka-Kornas, L. Chlebicka, M. Jankowska, K. Kiraga, J. Stepinski, M. Dadlez, R. Drabent, E. Darzynkiewicz, R. Stolarski, Z. *Naturforsch. C* **1999**, *54*, 278–284; b) E. Darzynkiewicz, J. Stepinski, I. Ekiel, Y. Jin, D. Haber, T. Sijuwade, S. M. Tahara, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 8953–8962; c) E. Darzynkiewicz, I. Ekiel, S. M. Tahara, L. S. Seliger, A. J. Shatkin, *Biochemistry* **1985**, *24*, 1701–1707; d) J. Marcotrigiano, A. C. Gingras, N. Sonenberg, S. K. Burley, *Cell* **1997**, *89*, 951–961.
- [4] K. C. Martin, A. Ephrussi, *Cell* **2009**, *136*, 719–730.

- [5] R. J. Weatheritt, T. J. Gibson, M. M. Babu, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, *21*, 833–839.
- [6] a) F. H. Li, J. S. Dong, X. S. Hu, W. M. Gong, J. S. Li, J. Shen, H. F. Tian, J. Y. Wang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4597–4602; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 4680–4685; b) S. C. Alexander, K. N. Busby, C. M. Cole, C. Y. Zhou, N. K. Devaraj, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 12756–12759; c) A. A. Sawant, A. A. Tanpure, P. P. Mukherjee, S. Athavale, A. Kelkar, S. Galande, S. G. Srivatsan, *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, e16.
- [7] a) A. K. Rath, A. Rentmeister, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *31*, 42–49; b) D. Schulz, A. Rentmeister, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2342–2347.
- [8] A. M. Pyka, C. Domnick, F. Braun, S. Kath-Schorr, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1438–1443.
- [9] a) D. Schulz, J. M. Holstein, A. Rentmeister, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7874–7878; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 8028–8032; b) J. M. Holstein, D. Schulz, A. Rentmeister, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 4478–4481; c) J. M. Holstein, D. Stummer, A. Rentmeister, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 1362–1369; d) J. M. Holstein, D. Stummer, A. Rentmeister, *Protein Eng. Des. Sel.* **2015**, *28*, 179–186.
- [10] a) S. Hausmann, S. S. Zheng, C. Fabrega, S. W. Schneller, C. D. Lima, S. Shuman, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 20404–20412; b) C. Fabrega, S. Hausmann, V. Shen, S. Shuman, C. D. Lima, *Mol. Cell* **2004**, *13*, 77–89.
- [11] a) C. Dalhoff, G. Lukinavicius, S. Klimasaukas, E. Weinhold, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1879–1886; b) C. Dalhoff, G. Lukinavicius, S. Klimasaukas, E. Weinhold, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 31–32; c) W. Peters, S. Willnow, M. Duisken, H. Kleine, T. Macherey, K. E. Duncan, D. W. Litchfield, B. Luscher, E. Weinhold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5170–5173; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5296–5299.
- [12] a) N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047; b) M. F. Debets, S. S. van Berkel, S. Schoffelen, F. P. Rutjes, J. C. van Hest, F. L. van Delft, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 97–99.
- [13] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518–13519.
- [14] E. Darzynkiewicz, J. Stepinski, I. Ekiel, C. Goyer, N. Sonenberg, A. Temeriusz, Y. Jin, T. Sijuwade, D. Haber, S. M. Tahara, *Biochemistry* **1989**, *28*, 4771–4778.
- [15] „Enzymatic RNA Synthesis using Bacteriophage T7 RNA Polymerase“: H. Gruegelsiepe, A. Schön, L. A. Kirsebom, R. K. Hartmann, in *Handbook of RNA Biochemistry* (Hrsg.: R. K. Hartmann, A. Bindereif, A. Schön, E. Westhof), Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, S. 3–21.
- [16] a) F. Muttach, A. Rentmeister, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1917–1920; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 1951–1954; b) D. Stummer, C. Herrmann, A. Rentmeister, *ChemistryOpen* **2015**, *4*, 295–301.
- [17] a) S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science* **2008**, *320*, 664–667; b) S. T. Laughlin, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 1068–1072; c) P. V. Chang, J. A. Prescher, E. M. Sletten, J. M. Baskin, I. A. Miller, N. J. Agard, A. Lo, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1821–1826; d) H. E. Murray, J. C. Judkins, C. W. Am Ende, T. E. Ballard, Y. Fang, K. Riccardi, L. Di, E. R. Guilmette, J. W. Schwartz, J. M. Fox, D. S. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11461–11475.

Eingegangen am 27. April 2016,  
veränderte Fassung am 21. Juni 2016  
Online veröffentlicht am 11. August 2016