



# Ein neues bakterielles, von Adenosin abgeleitetes Nukleosid als Beispiel für RNA-Modifikationsschäden

Larissa Bessler, Lea-Marie Vogt, Marc Lander, Christina Dal Magro, Patrick Keller, Jonas Kühlborn, Christopher J. Kampf, Till Opatz, und Mark Helm\*

**Abstract:** Die Bereiche RNA-Modifikation und RNA-Schaden weisen beide eine Vielzahl nicht-kanonischer Nukleosidstrukturen auf. Während sich RNA-Modifikationen zur Verbesserung der RNA-Funktion entwickelt haben, impliziert die Bezeichnung RNA-Schaden negative Auswirkungen. Auf Grundlage der Markierung mit stabilen Isotopen und Massenspektrometrie berichten wir von der Identifizierung und Charakterisierung von 2-Methylthio-1,N6-ethenoadenosin ( $ms^2\epsilon A$ ), welches mit 1,N6-Ethenoadenin, einer Läsion, die durch Exposition von Nukleinsäuren gegenüber alkylierenden Chemikalien in vivo entsteht, verwandt ist. Im Gegensatz dazu zeigte ein ausgefeiltes Konzept zur Isopren-Markierung, dass die Biogenese von  $ms^2\epsilon A$  die Spaltung eines Prenylrests in der bekannten transfer-RNA (tRNA)-Modifikation 2-Methylthio-N6-isopentenyladenosin ( $ms^2i^6A$ ) beinhaltet. Die relative Häufigkeit von  $ms^2\epsilon A$  in tRNAs von translatierenden Ribosomen lässt eine verminderte Funktionalität im Vergleich zur ursprünglichen RNA-Modifikation vermuten, wodurch die Natur der neuen Struktur in einer neu wahrgenommenen Überschneidung der beiden zuvor getrennten Bereiche, nämlich ein RNA-Modifikationsschaden, begründet wird.

Die Gesamtheit post-transkriptioneller Modifikationen zellulärer RNA, die als Epitranskriptom bezeichnet wird, weist eine große chemische Diversität auf. Etwa 170 verschiedene chemische Strukturen von verschiedenen Spezies sind bekannt,<sup>[1]</sup> und neue Strukturen tauchen in hoher Frequenz auf.<sup>[2–4]</sup> Unter den RNA-Arten tragen tRNA-Modifikationen am meisten zur chemischen Diversität und zu neu entdeckten Strukturen bei. Immer ausgefeiltere Instrumente haben

zur Entdeckung neuer Spezies geführt, die in substöchiometrischen Mengen vorkommen. Zugleich sind weitere nicht-kanonische Nukleosidstrukturen aus dem Bereich der Schädigung von Nukleinsäuren bekannt, wenn auch deutlich mehr dieser Strukturen intensiv in DNA als in RNA untersucht werden. Die meisten dieser Strukturen sind auf Strahlung, oxidative oder alkylierende Substanzen zurückzuführen.<sup>[5,6]</sup> Anstatt die Schädigung an kanonischen Nukleosiden zu untersuchen, konzentrieren sich einige neuere Berichte auf Bestrahlungs- und Alkylierungsschäden an post-transkriptionellen Modifikationen.<sup>[3,7,8]</sup>

Da tRNAs die am stärksten modifizierten RNA-Spezies sind, sind sie auch der wahrscheinlichste Ort für das Auftreten solcher “RNA-Modifikationsschäden”. In Anbetracht der hohen funktionellen Bedeutung bestimmter RNA-Modifikationen, z. B. im tRNA-Anticodon, könnte ihre Schädigung schwerwiegendere Folgen haben als zufällige Schäden an kanonischen Nukleosiden. Demnach könnte man die Existenz von Reparaturmechanismen vermuten, die denen ähneln, die für DNA und RNA beschrieben wurden.<sup>[9]</sup> In der Tat wurde gezeigt, dass 2-Methylthiocytidin ( $ms^2C$ ), ein Alkylierungsschaden an 2-Thiocytidin in *Escherichia coli* (*E. coli*), durch AlkB,<sup>[3]</sup> ein Enzym aus einer Familie mit beschriebener Funktion in der RNA- und DNA-Reparatur, rückgängig gemacht werden konnte.<sup>[6,10]</sup> Dagegen war die Reparatur im Fall von 4-Methylthiouridin ( $ms^4U$ ) unabhängig von AlkB.<sup>[8]</sup>

Während ein biologischer Ursprung von alkylierenden Agenzien auf die Lipidperoxidation zurückgeführt wurde,<sup>[11]</sup> wurde die Alkylierung von Nukleinsäuren durch vom Menschen hergestellte Stoffe wie Vinylhalogenide schon früh in vitro und in vivo eingehend untersucht.<sup>[12–14]</sup> Ein relevanter Punkt in diesem Fall wurde in Folge des Auftretens ungewöhnlicher Lebertumore in den 1970er Jahren untersucht. Diese traten bei Arbeitern aus der Polymerindustrie auf, wobei ein kausaler Zusammenhang mit der Exposition gegenüber Vinylchlorid angenommen wurde.<sup>[15]</sup> Es wurde gezeigt, dass Vinylchlorid zu 2-Chloracetaldehyd (CAA), einem hochgradig mutagenen Reagenz, das mit Nukleobasen reagiert und zur Bildung von Etheno( $\epsilon$ )-Addukten wie 1,N6-Ethenoadenin in DNA<sup>[12,17]</sup> und in RNA<sup>[13,18]</sup> führt, metabolisiert wird.<sup>[16]</sup> Wir berichten hier über den Nachweis und die Strukturaufklärung eines neuen  $\epsilon$ -Adenosins, nämlich  $ms^2\epsilon A$ , in bakterieller tRNA. Überraschenderweise war das Ethenofragment nicht das Ergebnis einer alkylierenden Schädigung, sondern wurde oxidativ aus dem Isoprenrest in  $ms^2i^6A$  abgeleitet. Eine Analyse der Verteilung zwischen dem zellulären tRNA-Pool und tRNAs auf aktiv translatie-

[\*] L. Bessler, L.-M. Vogt, M. Lander, Dr. C. Dal Magro, Dr. P. Keller, Prof. Dr. M. Helm  
Institut für Pharmazeutische und Biomedizinische Wissenschaften (IPBW), Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Staudingerweg 5, 55128 Mainz (Deutschland)  
E-mail: mhelm@uni-mainz.de

Dr. J. Kühlborn, Dr. C. J. Kampf, Prof. Dr. T. Opatz  
Department Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Duesbergweg 10–14, 55128 Mainz (Deutschland)

© 2023 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

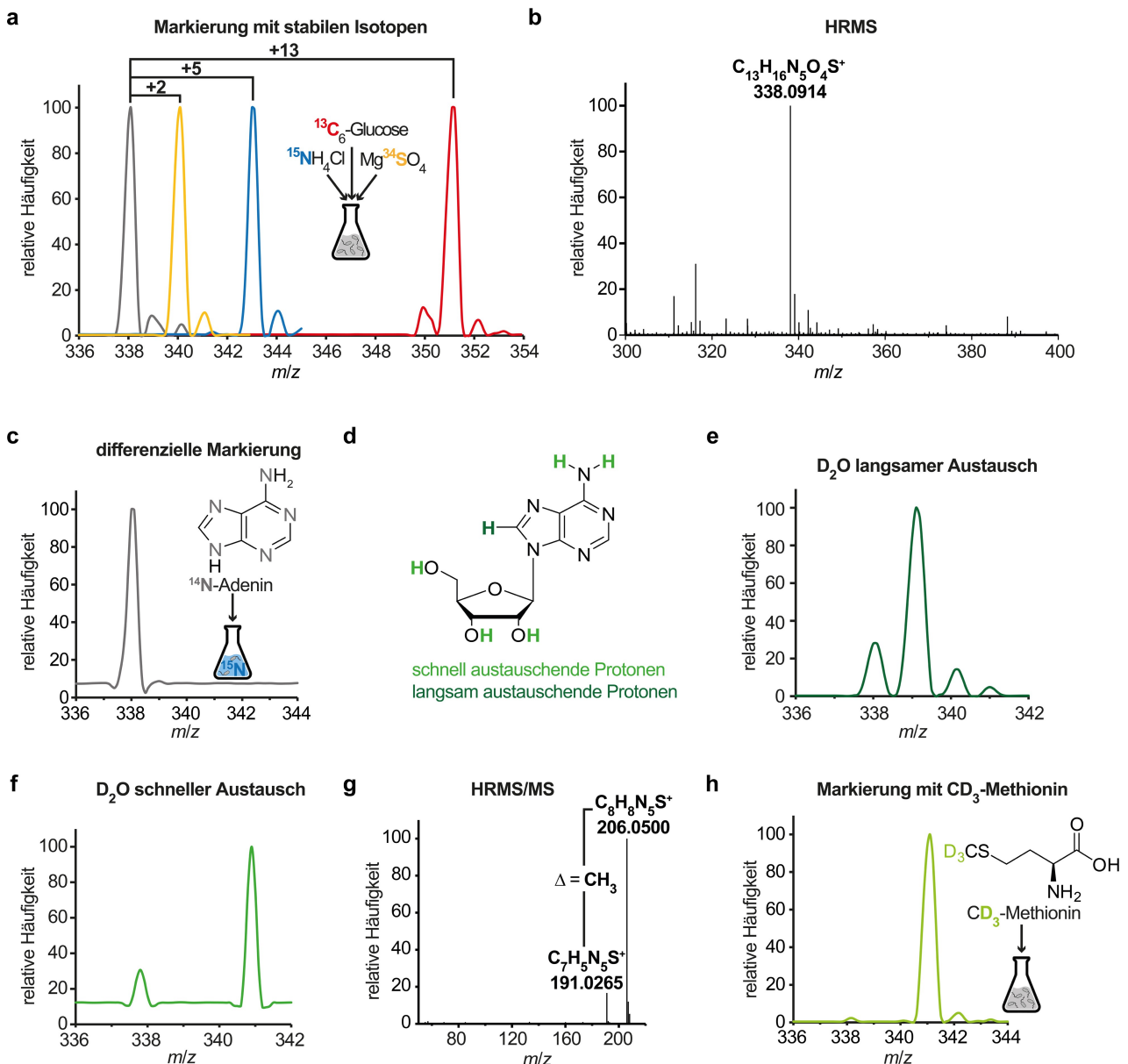
renden Polysomen deutete auf eine verminderte Funktionalität hin, was uns veranlasste,  $ms^2\epsilon A$  als RNA-Modifikationschaden einzustufen.

Wir haben bereits über eine Liste unbekannter Ribonukleoside berichtet, bei denen es sich um potenziell neue RNA-Modifikationen handelt, die durch die Kombination verschiedener Experimente zur Markierung mit stabilen Isotopen mit einem so genannten Neutral-Loss-Scan (NLS) im Rahmen von Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) unter Verwendung eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers (QQQ) identifiziert wurden.<sup>[2]</sup> Eine der aufgeklärten Strukturen war  $msms^2i^6A$  (2-Methylthiomethylthio-*N*6-isopentenyladenosin), ein hoch lipophiles Derivat der Hypermodifikation  $ms^2i^6A$ , die an Position 37 bestimmter bakterieller tRNAs zu finden ist. Bei der Strukturauflösung erwiesen sich "inverse" Fütterungsexperimente, bei denen Bakterien in "schweren" Medien kultiviert wurden, die z. B.  $^{13}C$ -Glucose als einzige Kohlenstoffquelle enthielten, als äußerst nützlich. Dabei konnte der Einbau eines beliebigen Metaboliten, der aus "leichtem"  $^{12}C$ -Kohlenstoff besteht und der Kultur zugesetzt wurde, in die RNA einfach als Massendifferenz entsprechend der Anzahl der eingebauten Kohlenstoffe nachgewiesen werden. Während die Anwendung auf Nucleobasen unkompliziert war, gehörten zu den Verbindungen, die nicht auf natürliche Weise aus dem Medium aufgenommen wurden, auch Prenylierungsreagenzien und deren Vorstufen. So konnten wir zwar indirekt das Vorhandensein eines Isopentenylrests durch Massenspektrometrie und die Verwendung des Knockout-Stammes der Prenyltransferase MiaA nachweisen, aber es gab keine direkte Möglichkeit zur Verfolgung der Prenylierung. Dies war von Interesse im Zusammenhang mit einer anderen Nucleosidspezies von der Liste, die ein Masse-zu-Ladung-Verhältnis von 338 aufwies (im Folgenden als Kandidat 338 bezeichnet). Diese eluierte bei 27.7 min, deutlich nach *N*6,*N*6-Dimethyladenosin ( $m^{6,6}A$ ), aber vor *N*6-Isopentenyladenosin ( $i^6A$ ) von der Umkehrphasen-Säule. Die Markierung mit stabilen Isotopen zeigte, dass die Verbindung aus 13 Kohlenstoffatomen, 5 Stickstoffatomen und einem Schwefelatom besteht, was in Kombination mit den Ergebnissen der hochauflösenden Massenspektrometrie (HRMS) auf eine Summenformel von  $C_{13}H_{15}N_5O_4S$  hindeutete (Abbildung 1a + b). Durch inverse Fütterung konnte Adenosin als zugrundeliegendes Nucleosid vor der Modifikation identifiziert werden (Abbildung 1c). Der Vergleich von Adenosin mit der Zusammensetzung von Kandidat 338 ergab eine Differenz von  $C_3H_2S$  und zwei Doppelbindungsäquivalenten. Da der ursprüngliche NLS das Fragmentierungsmuster einer unsubstituierten Ribose gezeigt hatte, implizierte die obige Formel, dass zumindest einige der Stickstoffe des zugrundeliegenden Nucleosids Substituenten anstelle der ursprünglichen Wasserstoffatome tragen. Um die Modifizierungsstellen zu lokalisieren, führten wir langsame und schnelle Deuterium-Austausch-Experimente durch, die Aufschluss über die Substitution der C8-Position bzw. die Substitution von Heteroatomen geben (Abbildung 1d).<sup>[2,19]</sup> Interessanterweise wurde die 8-Position als unmodifiziert eingestuft (Abbildung 1e), während alle Stickstoffatome, die in der

Adenosin-Ausgangsstruktur an schnell austauschende Wasserstoffatome gebunden waren, in Kandidat 338 Substituenten tragen sollten (Abbildung 1f).

HRMS-Fragmentierungsexperimente deuteten auf den Verlust einer Methylgruppe nach dem Verlust der Ribose hin (Abbildung 1g). Das Vorhandensein einer Methylgruppe wurde durch eine entsprechende  $+3 m/z$ -Verschiebung in einem  $CD_3$ -Methionin-Markierungsexperiment weiter untermauert (Abbildung 1h). Angesichts des Vorhandenseins eines Schwefelatoms in Verbindung mit einer Methylgruppe in einer modifizierten Adenosinstruktur vermuteten wir eine Thiomethylierung in Position 2 (wie zum Beispiel in  $ms^2i^6A$ ), die typischerweise durch das Eisen-Schwefel-Enzym MiaB katalysiert werden würde. Das Fehlen von Kandidat 338 im MiaB-Knockout bewies das Vorhandensein eines Thiomethylrests in der Adenin-C2-Position (Abbildung 1g und S1). Damit blieben jedoch nur noch zwei weitere Kohlenstoffatome übrig, die der Struktur des Kandidaten 338 zugeordnet werden konnten. In Anbetracht der Doppelbindungsäquivalente und der Tatsache, dass keines der Stickstoffatome an schnell austauschende Protonen gebunden war, enthielt der plausibelste Strukturvorschlag eine zusätzliche Ringstruktur, d. h. eine Ethenobrücke, die das exozyklische *N*6 mit *N*1 der Nucleobase verbindet. Eine theoretisch denkbare Dreifachbindung an der exozyklischen *N*6-Position wäre mit der Instabilität von *N*-Ethinylaminen<sup>[20]</sup> und den Ergebnissen des schnellen  $D_2O$ -Austauschs unvereinbar gewesen (Abbildung 1f). Als nur noch eine plausible Struktur übrig war, synthetisierten wir  $ms^2\epsilon A$  nach einem Protokoll von Bhatt et al. (Abbildung 2a).<sup>[21]</sup> Die LC-MS/MS-Analyse des  $^{13}C$ -markierten *E. coli* tRNA-Hydrolysats, dem die synthetische Verbindung zugesetzt war, zeigte eine Co-Elution der synthetischen Verbindung und ihres Isotopologs, was die hypothetische Struktur bestätigte (Abbildung 2b). Die perfekt übereinstimmenden Pseudo-MS<sup>3</sup>-Spektren des Kandidaten 338, der aus hydrolysiertem *E. coli* tRNA angereichert wurde, und des synthetisierten  $ms^2\epsilon A$  veranschaulichten schlussendlich die Übereinstimmung der Molekülstrukturen des natürlich vorkommenden Kandidaten 338 und der synthetischen Verbindung  $ms^2\epsilon A$  (Abbildung 2c).

Die ungewöhnliche trizyklische Struktur von  $ms^2\epsilon A$  warf die Frage nach dem metabolischen Ursprung der beiden Kohlenstoffatome der Ethenobrücke auf. Aufgrund der Beteiligung von MiaB und der metabolischen sowie strukturellen Nähe zu  $ms^2i^6A$  spekulierten wir, dass diese Brücke das Relikt eines ursprünglich vorhandenen *N*6-Isopentenylrests sein könnte. Daher testeten wir RNA, die aus einem Knockout des MiaA-Enzyms isoliert wurde. Letzteres katalysiert die RNA-Prenylierung der *N*6-Position eines Adenosins, welche in  $i^6A$  resultiert, unter Verwendung des Isopren-Cofaktors Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP), der über den Methylerythritolphosphat (MEP)-Weg bereitgestellt wird. Im MiaA-Knockout konnten wir kein  $ms^2\epsilon A$  nachweisen (Abbildung S1), was darauf hindeutete, dass die Kohlenstoffatome der Ethenobrücke tatsächlich aus dem MEP-Weg stammen könnten. Die Bildung von  $ms^2\epsilon A$  würde  $ms^2i^6A$  als hypothetischen Vorläufer einschließen, wobei dessen Isoprenrest die Kohlenstoffquelle der Ethenobrücke

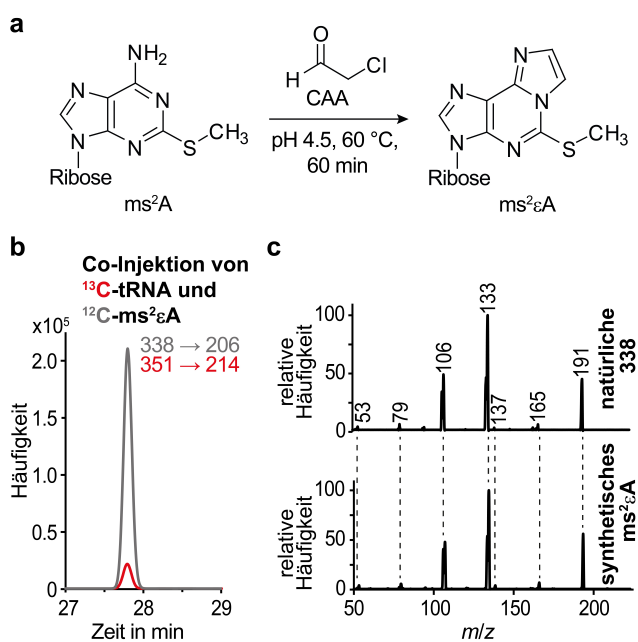


**Abbildung 1.** Strukturelle Charakterisierung von Kandidat 338 durch LC-MS/MS. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Häufigkeiten in Relation zum höchsten Signal im jeweiligen Massenspektrum gesetzt (relative Häufigkeit). a) Überinandergelagerte QQQ-Massenspektren bei 27.7 min, die dem Kandidaten 338 aus einem NLS hydrolysiertes isotopenmarkiertes ( $^{13}\text{C}$  = rot,  $^{15}\text{N}$  = blau,  $^{34}\text{S}$  = gelb) oder unmarkiertes (grau) *E. coli* tRNA entsprechen. Die Massenverschiebungen geben die Anzahl der jeweiligen Atome im Molekül an. b) Massenspektrum und Ionenformel von Kandidat 338, berechnet aus der exakten Masse, die bei der HRMS-Analyse von hydrolysiertes, mit Kandidat 338 angereicherter tRNA festgestellt wurde. c) QQQ-NLS-Massenspektrum von isolierter tRNA aus einer  $^{14}\text{N}$ -markierten *E. coli*-Kultur, die mit  $^{14}\text{N}$ -Adenin ergänzt wurde, bei 27.7 min. d) Übersicht über langsam (dunkelgrün) und schnell (hellgrün) austauschende Wasserstoffatome in Adenosin. e) QQQ-NLS-Massenspektrum nach Inkubation der RNA-Proben mit  $\text{D}_2\text{O}$  (langsamer Austausch). f) QQQ-NLS-Massenspektrum nach Verwendung eines  $\text{D}_2\text{O}$ -LC-Puffers (schneller Austausch). g) HRMS-Fragmentierungsmuster von Kandidat 338 sowie berechnete Ionenformeln der erzeugten Fragmente, die sich um eine Methylgruppe unterscheiden. h) QQQ-NLS-Massenspektrum von Kandidat 338 in tRNA, die aus *E. coli*-Zellen mit  $\text{CD}_3$ -Methionin-Zusatz isoliert wurde.

wäre (Abbildung 3a). Um diese Hypothese zu überprüfen, isolierten wir 30 tRNA-Arten und fanden  $\text{ms}^2\epsilon\text{A}$  nur in den 9 tRNAs, von denen bekannt ist, dass sie  $\text{ms}^2\text{i}^6\text{A}$  tragen (Abbildung S2).

Zur direkten Aufklärung mussten wir den Isoprenrest in  $\text{i}^6\text{A}/\text{ms}^2\text{i}^6\text{A}$  markieren, indem wir dem Isoprenweg in einem inversen Fütterungsexperiment eine "leichte" C5-Verbin-

dung (d.h. bestehend aus  $^{12}\text{C}$ ) zuführten (siehe oben). Um Probleme bei der Aufnahme der negativ geladenen Isopren-Cofaktoren DMAPP und Isopentenylpyrophosphat durch *E. coli* zu umgehen, wendeten wir uns einem Konzept metabolischen Engineerings zu, welches die Hemmung des nativen Hemiterpen-Biosynthesewegs durch Zugabe von Fosmidomycin erforderte. Um ein "leichtes" C5-Surrogat bereitzu-



**Abbildung 2.** Bestätigung der Struktur von  $ms^2\epsilon A$  durch LC-MS/MS-Analyse der synthetisierten Substanz. a) Reaktionsschema der Synthese von  $ms^2\epsilon A$ , ausgehend von 2-Methylthioadenosin ( $ms^2A$ ). b) QQQ-LC-MS/MS-Analyse einer hydrolysierten  $^{13}C$ -markierten tRNA-Probe (rot), die mit der synthetischen  $^{12}C$ -Verbindung (grau) versetzt wurde. Gezeigt ist eine Überlagerung der extrahierten Ionenchromatogramme bei einem Massenübergang von  $m/z$  338  $\rightarrow$  206 und  $m/z$  351  $\rightarrow$  214. c) Vergleich der Fragmentierungsmuster von Kandidat 338 in einer Analyse hydrolysiertes nativer tRNA (oben) und der synthetisierten Referenz  $ms^2\epsilon A$  (unten) in einem QQQ-pseudo-MS<sup>3</sup>-Scan.

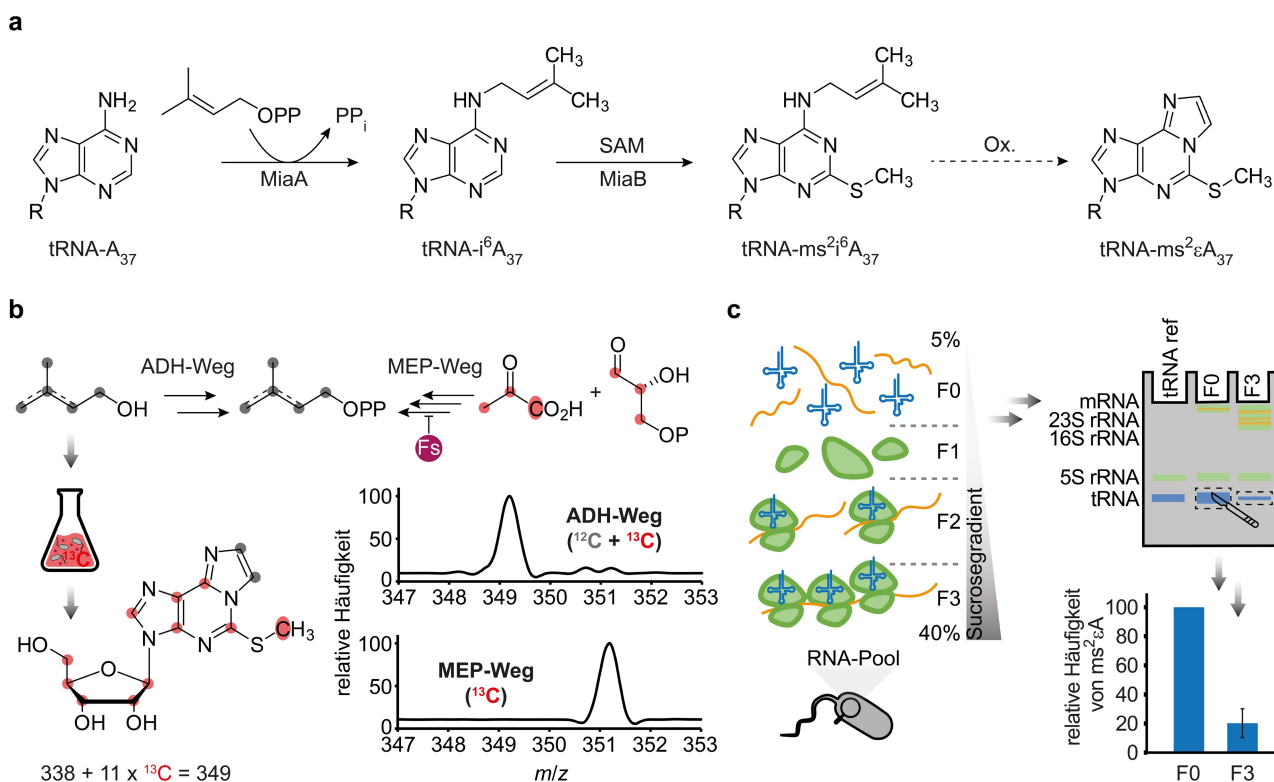
stellen, adaptierten wir ein Protokoll zur Einführung eines künstlichen alkoholabhängigen Hemiterpenwegs (ADH-Weg) für die Isoprenoid-Biosynthese in *E. coli* und kombinierten es mit Isotopenmarkierung.<sup>[22]</sup> Den in  $^{13}C$ -markiertem Medium kultivierten Bakterien wurden die bioverfügbaren  $^{12}C$ -Alkoholvorstufen Dimethylallylalkohol und Isopentenol zugesetzt (ausführliche Beschreibung in den Hintergrundinformationen unter 1.1.3). Anschließend wurde eine LC-MS/MS-Analyse der prenylierten Nucleoside aus isolierter tRNA durchgeführt, wobei eine "schwere"  $^{13}C$ -Kultur mit einer gleichartigen, mit den  $^{12}C$ -Alkoholen ergänzten Kultur verglichen wurde. Ein Massenunterschied in den Signalen von  $i^6A$  und  $ms^2i^6A$  deutete auf den Einbau der C5-Alkohole in den Hemiterpenweg hin (Abbildung S3). Wesentlich ist, dass für das  $ms^2\epsilon A$ -Signal eine Massenverschiebung von  $-2$  Einheiten ( $m/z$  349 gegenüber  $m/z$  351) beobachtet wurde (Abbildung 3b). Dies zeigt, dass die Ethenobrücke aus dem MEP-Weg stammt und somit  $ms^2\epsilon A$  von  $ms^2i^6A$  abgeleitet ist.

Synthetisches  $ms^2\epsilon A$  (Abbildung 2) als Kalibrierungsstandard ermöglichte die absolute Quantifizierung, zum Beispiel in aufgereinigter tRNA<sup>Leu</sup><sub>(BAA)</sub>, und zeigte, dass nur 0,06 % dieser tRNA-Moleküle  $ms^2\epsilon A$  enthielten. Dieses geringe Auftreten könnte darauf hindeuten, dass das Vorhandensein von  $ms^2\epsilon A$  in tRNAs ein unerwünschtes Nebenprodukt ist, das nicht funktionell oder sogar schädlich für

die Zelle sein könnte. Wir untersuchten diese Hypothese, indem wir den  $ms^2\epsilon A$ -Gehalt des zellulären tRNA-Pools mit dem von tRNAs aus aktiv translatierenden Polysomen verglichen, die "laut Definition" als funktionell gelten. Die beobachtete signifikante Verringerung von  $ms^2\epsilon A$  in polysomaler tRNA im Vergleich zu freier tRNA (Abbildung 3c) wurde dahingehend interpretiert, dass tRNAs, die dieses Derivat von  $ms^2i^6A$  tragen, ihre vorgesehene Funktion nicht vollständig erfüllen können und durch noch unbekannte Mechanismen von der Translation ausgeschlossen werden. Dies macht  $ms^2\epsilon A$  zu einem RNA-Modifikationsschaden von  $ms^2i^6A$ .

Die hier aufgeklärte neue Nucleosidstruktur ist bereits die zweite, die sich von  $ms^2i^6A$  ableitet.<sup>[2]</sup> Die frühere Identifizierung von  $msms^2i^6A$  zeigte eine mutmaßliche Nebenreaktion des Eisen-Schwefel-Cluster-Enzyms MiaB, die Radikalchemie beinhaltet. Bei der Bildung von  $ms^2\epsilon A$  aus  $ms^2i^6A$  ist die Art der katalysierten Chemie wirklich bemerkenswert, da sie eine oxidative Spaltung der Isopren-Doppelbindung in Analogie zu einer Ozonolyse einschließt. Wir versuchen derzeit, das verantwortliche Enzym zu identifizieren, ein Unterfangen, das durch die geringe Häufigkeit der beteiligten Strukturen und durch die experimentelle Herausforderung der Isotopenmarkierung der Isoprenreste in der RNA erschwert wird. Im vorliegenden Fall wurde dies erreicht, nachdem erhebliche Anstrengungen unternommen wurden, um exogene C5-Alkohole in die bakterielle Hemiterpensynthese einzubringen. Mit Hilfe dieses Konzepts, das aus der Arbeit von Lund et al.<sup>[22]</sup> übernommen wurde, konnte gezeigt werden, dass die Ethenobrücke innerhalb des dritten Heterozyklus von der Isopreneinheit in  $ms^2i^6A$  abstammt. Obwohl im vorliegenden Fall erfolgreich, ist die Anwendung in der Praxis anspruchsvoll und bedarf einer detaillierten Optimierung, bevor sie zu einem Instrument für Routineuntersuchungen wird. Die meisten biologischen Auswirkungen unserer Ergebnisse müssen noch festgestellt werden, aber die Nucleosid-Quantifizierungsdaten der polysomal gebundenen tRNA deuten stark auf eine Beeinträchtigung der tRNA-Funktionalität und einen schädlichen Charakter von  $ms^2\epsilon A$  hin und rechtfertigen seine Bezeichnung als RNA-Schaden.

Während älteren Beispielen von schädigenden Reaktionen an tRNA-Modifikationen die geringe Aufmerksamkeit einzelner Befunde zuteilwurde,<sup>[23]</sup> kommen wir zu dem Schluss, dass solche Ereignisse tatsächlich häufiger vorkommen als bisher angenommen. Der vorgeschlagene Begriff "RNA-Modifikationsschaden" würde nicht nur strukturelle Veränderungen intakter RNA-Modifikationen als Folge chemischer oder physikalischer Stressfaktoren umfassen,<sup>[3,7,8]</sup> sondern auch die enzymatischen Nebenreaktionen, die zu dysfunktionalen modifizierten Nucleosiden führen. Ob solche Schäden in erster Linie durch die Promiskuität von RNA-Modifikationsenzymen verursacht werden, wie es bei  $msms^2i^6A$  der Fall ist, ist für  $ms^2\epsilon A$  noch unklar.



**Abbildung 3.** Biologischer Ursprung und Auswirkungen von  $ms^2\epsilon A$ . a) Biosynthese von  $ms^2i^6A$  und vorgeschlagene Entstehung von  $ms^2\epsilon A$ . b) Experiment zur inversen Isopren-Markierung und Massenspektren der anschließenden QQQ-NLS-Analyse: rote ( $^{13}C$ ) und graue ( $^{12}C$ ) Markierungen in der Strukturformel veranschaulichen das Masse-zu-Ladung-Verhältnis bei inverser Zufütterung (ADH-Weg). In der unbehandelten Kontrollprobe führt der native MEP-Weg zur vollständig  $^{13}C$ -markierten Struktur. Fs: Fosmidomycin, PP<sub>i</sub>: Pyrophosphat, SAM: S-Adenosylmethionin. c) Zusammensetzung des zellulären RNA-Pools mit seinen häufigsten Vertretern tRNA, messenger-RNA (mRNA) und ribosomale RNA (rRNA) sowie deren Verteilung nach Fraktionierung über einen Sucrosegradienten. Relative LC-MS/MS-Quantifizierung von  $ms^2\epsilon A$  in tRNA, die aus F0, die dem zellulären tRNA-Pool entspricht, und aus F3, die den aktiv translatierenden tRNAs entspricht, durch Gelreinigung aufgereinigt wurde. Die normalisierten Peakflächen wurden paarweise auf die jeweilige F0-Fraktion (auf 100% gesetzt) bezogen, und es wurde der Durchschnitt von drei unabhängigen biologischen Replikaten berechnet.

## Danksagung

Wir danken Dr. Annika Kotter für hilfreiche Diskussionen und Felix Green für technische Assistenz. Diese Arbeit wurde im Rahmen des SPP1784 (HE 3397/14-2 an M.H.) und des TRR319 (TP C03, Project-ID 439669440 an M.H.) von der DFG unterstützt. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

## Conflict of Interest

Mark Helm ist als Berater für Moderna Inc tätig.

## Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die Daten, die die Ergebnisse dieser Studie unterstützen, sind auf begründete Anfrage beim Autor erhältlich.

**Stichwörter:** Epitranskriptom · Isotopenmarkierung · Massenspektrometrie · Nukleosid-Analytik · RNA-Modifikationsschaden

- [1] P. Boccaletto, F. Stefaniak, A. Ray, A. Cappannini, S. Mukherjee, E. Purta, M. Kurkowska, N. Shirvanizadeh, E. Destefanis, P. Groza, G. Avşar, A. Romitelli, P. Pir, E. Dassi, S. G. Conticello, F. Aguilo, J. M. Bujnicki, *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, D231–D23.
- [2] C. Dal Magro, P. Keller, A. Kotter, S. Werner, V. Duarte, V. Marchand, M. Ignarski, A. Freiwald, R.-U. Müller, C. Dieterich, Y. Motorin, F. Butter, M. Atta, M. Helm, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 7893; *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 8019.
- [3] V. F. Reichle, D. P. Petrov, V. Weber, K. Jung, S. Kellner, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 5600.
- [4] T. Ohira, K. Minowa, K. Sugiyama, S. Yamashita, Y. Sakaguchi, K. Miyauchi, R. Noguchi, A. Kaneko, I. Orita, T. Fukui, K. Tomita, T. Suzuki, *Nature* **2022**, *605*, 372.
- [5] a) J. H. J. Hoeijmakers, *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 1475; b) J. Cadet, J. R. Wagner, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a012559; c) Q. Kong, C.-L. G. Lin, *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 1817; d) B. Nawrot, E. Sochacka, M. Dächler, *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 4023.

- [6] F. Drabløs, E. Feyzi, P. A. Aas, C. B. Vaagbø, B. Kavli, M. S. Bratlie, J. Peña-Díaz, M. Otterlei, G. Slupphaug, H. E. Krokan, *DNA Repair* **2004**, *3*, 1389.
- [7] C. Sun, M. Jora, B. Solivio, P. A. Limbach, B. Addepalli, *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 567.
- [8] C. Borek, V. F. Reichle, S. Kellner, *ChemBioChem* **2020**, *21*, 2768.
- [9] a) N. Chatterjee, G. C. Walker, *Environ. Mol. Mutagen.* **2017**, *58*, 235; b) B. Sedgwick, P. A. Bates, J. Paik, S. C. Jacobs, T. Lindahl, *DNA Repair* **2007**, *6*, 429; c) Z. Li, J. Wu, C. J. Deleo, *IUBMB Life* **2006**, *58*, 581; d) C. L. Simms, H. S. Zaher, *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 3639; e) E. J. Wurtmann, S. L. Wolin, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *44*, 34.
- [10] a) B. I. Fedeles, V. Singh, J. C. Delaney, D. Li, J. M. Essigmann, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 20734; b) G. Zheng, Y. Fu, C. He, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4602.
- [11] a) F. L. Chung, H. J. Chen, R. G. Nath, *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 2105; b) F. el Ghissassi, A. Barbin, J. Nair, H. Bartsch, *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, *8*, 278; c) C. E. Vaca, J. Wilhelm, M. Harms-Ringdahl, *Mutat. Res. Rev. Genet. Toxicol.* **1988**, *195*, 137.
- [12] K. Bergman, *Arch. Toxicol.* **1982**, *49*, 117.
- [13] R. J. Laib, H. M. Bolt, *Toxicology* **1977**, *8*, 185.
- [14] H. Ottenwälder, R. J. Laib, H. M. Bolt, *Arch. Toxicol.* **1979**, *41*, 279.
- [15] J. L. Creech, M. N. Johnson, *J. Occup. Med.* **1974**, *16*, 150.
- [16] a) A. Barbin, H. Brésil, A. Croisy, P. Jacquignon, C. Malaveille, R. Montesano, H. Bartsch, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *67*, 596; b) C. Malaveille, H. Bartsch, A. Barbin, A. M. Camus, R. Montesano, A. Croisy, P. Jacquignon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *63*, 363.
- [17] R. J. Laib, L. M. Gwinner, H. M. Bolt, *Chem.-Biol. Interact.* **1981**, *37*, 219.
- [18] W. J. Krzyzosiak, J. Biernat, J. Ciesiolka, K. Gulewicz, M. Wiewiórowski, *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 2841.
- [19] a) F. J. Bullock, O. Jardetzky, *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 1988; b) J. Tropp, A. G. Redfield, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 534; c) M. P. Schweizer, S. I. Chan, G. K. Helmkamp, P. O. P. Ts'o, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 696.
- [20] H.-W. Winter, C. Wentrup, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, *19*, 720; *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 743.
- [21] D. P. Bhatt, X. Chen, J. D. Geiger, T. A. Rosenberger, *J. Chromatogr. B* **2012**, *889–890*, 110.
- [22] S. Lund, R. Hall, G. J. Williams, *ACS Synth. Biol.* **2019**, *8*, 232.
- [23] a) A. Favre, E. Hajnsdorf, K. Thiam, A. Caldeira de Araujo, *Biochimie* **1985**, *67*, 335; b) J. Biernat, J. Ciesiolka, P. Górnicki, R. W. Adamiak, W. J. Krzyzosiak, M. Wiewiórowski, *Nucleic Acids Res.* **1978**, *5*, 789.

Endgültige Fassung online: 7. Februar 2023