

Chemo-enzymatische Strategien zur Markierung eukaryotischer mRNA

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

von
Daniela Schulz

Hamburg 2013

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von November 2010 bis September 2013 unter der Leitung von JProf. Dr. A. Rentmeister am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Hamburg, Department Chemie durchgeführt.

Gutachter

Prof. Dr. A. Rentmeister

Prof. Dr. U. Hahn

Datum der Disputation: 20. Dezember 2013

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

D. Schulz, J. M. Holstein, A. Rentmeister, *A Chemo-Enzymatic Approach for Site-Specific Modification of the RNA Cap*, *Angewandte Chemie Int. Ed.* **2013**, 52, 7874-78.

D. Schulz, A. Rentmeister, *An enzyme-coupled high-throughput assay for screening RNA methyltransferase activity in E. coli cell lysate*, *RNA Biology* **2012**, 9, 1-10.

Teile dieser Arbeit werden für eine Veröffentlichung vorbereitet:

D. Schulz, C. Herrmann, A. Rentmeister, *Fluorescent labeling of the mRNA-cap by photoclick reactions*.

*Für die drei Menschen,
denen ich unendlich dankbar bin,
denn.....*

...Was du wirklich besitzt, das wurde dir geschenkt.

Marie von Ebner-Eschenbach

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abstract	V
Zusammenfassung	VII
1. Einleitung	1
1.1 mRNA – mehr als ein Botenmolekül	1
1.2 Nachweise subzellulärer mRNA-Lokalisation	15
1.3 Chemo-enzymatische Markierung von Biomolekülen	34
1.4 Trimethylguanosinsynthasen – neue Wege zur Markierung von mRNA?	51
1.5 Zielsetzung	62
2. Ergebnisse	65
2.1 Enzymatische Modifizierung – Synthese der AdoMet-Analoga	65
2.2 Click-Reaktionen – Synthese und Charakterisierung der Edukte	68
2.3 Charakterisierung der Trimethylguanosinsynthasen hTgs1 und GlaTgs2	72
2.4 Untersuchung promiskuitiver Enzymaktivität gegenüber AdoPropen	90
2.5 Verbesserung promiskuitiver Aktivität von GlaTgs2	92
2.6 Thiol-En-Click-Reaktion zur Markierung der allylierten mRNA-Kappe	108
2.7 Photoclick-Reaktion zur Markierung modifizierter mRNA-Kappen	114
2.8 CuAAC zur Markierung der penteninylierten mRNA-Kappe	128
3. Diskussion	136
3.1 Charakterisierung der Trimethylguanosinsynthasen	141
3.2 Homologie-Modell – Grundlage zur Verbesserung promiskuitiver Enzymaktivität von GlaTgs2	149
3.3 Chemo-enzymatische Strategien zur Markierung der mRNA-Kappe	155
4. Ausblick	167
5. Material	170
5.1 Chemikalien und Bioreagenzien	170
5.2 Verbrauchsmaterialien	170
5.3 Geräte	171
5.4 Säulen	173
5.5 Matrices	174
5.6 Puffer, Lösungen und Medien	174

5.7	Kommerziell erworbene Puffer und Lösungen	179
5.8	Protein- und Nukleinsäurestandards	180
5.9	Kappen-Analoga	180
5.10	Oligonukleotide und Gene	180
5.11	Enzyme	181
5.12	Bakterienstämme	182
5.13	Vektoren	183
5.14	Antikörper	184
5.15	Software	184
6.	Methoden	186
6.1	Mikrobiologische Methoden	186
6.2	Molekularbiologische Methoden	188
6.3	Proteinbiochemische und Immunologische Methoden	196
6.4	Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivität	201
6.5	Chemische Methoden	207
6.6	Chemo-enzymatische Markierungen	208
6.7	Versuche zur chemo-enzymatischen Markierung zellulärer mRNA	215
7.	Literatur	217
8.	Anhang	i
8.1	Entsorgung	i
8.2	Gefahrenstoffe und Sicherheitsdaten	i
8.3	Sequenzdaten	iv
8.4	Vektorkarten	vii
8.5	Charakterisierungen von Verbindungen und Reaktionen	viii
	Danksagung	xiv
	Eidesstattliche Erklärung	xvi
	Curriculum Vitae	xvii
	Veröffentlichungen	xix

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure (<i>amino acid</i>)
AP	Alkalische Phosphatase
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
ber.	berechnet
CBC	Kappen-Bindekomplex (<i>cap-binding complex</i>)
CBP	Kappen-bindendes Protein (<i>cap-binding protein</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CPE	cytoplasmatisches Polyadenylierungselement (<i>cytoplasmic polyadenylation element</i>)
CPEB	cytoplasmatisches Poly(A)-bindendes Protein (<i>cytoplasmic polyadenylation element-binding protein</i>)
CPSF	Spaltungs- und Poly(A)-spezifischer Faktor (<i>cleavage and polyadenylation specificity factor</i>)
CTD	C-terminale Domäne der RNAP II
CuAAC	Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
det.	detektiert
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA (<i>double-stranded DNA</i>)
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	verbessertes grün-fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescing protein</i>)
eIF4E	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4E
EJC	<i>export junction complex</i>
ep-PCR	fehlerbehaftete PCR (<i>error-prone PCR</i>)
ESI	Elektronenspray-Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
Ethidiumbromid	3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium-bromid

FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (<i>fluorescence correlation spectroscopy</i>)
FISH	fluoreszierende <i>in situ</i> -Hybridisierung (<i>fluorescence in situ hybridization</i>)
FIT	erzwungene Interkalation (<i>forced intercalation</i>)
FIVH	fluoreszierende <i>in vivo</i> -Hybridisierung (<i>fluorescence in vivo hybridization</i>)
FMO	Grenzorbital (<i>frontier molecular orbital</i>)
FRAP	Wiederherstellung von Fluoreszenz nach Photobleichung (<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>)
GFP	grün-fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescing protein</i>)
GlaTgs2	Trimethylguanosinsynthase des Parasiten <i>Giardia lamblia</i>
HCCA	α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital (<i>highest occupied molecular orbital</i>)
hTgs1	humane Trimethylguanosinsynthase
HTS	Hochdurchsatzverfahren (<i>high-throughput-screen</i>)
hnRNP	heterogene nukleäre Ribonukleoproteinpartikel (<i>heterogenous nuclear ribonucleoprotein particle</i>)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitäts-chromatographie (<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>)
kDa	Kilodalton
KS-DFT	Kohn-Sham-Dichtefunktionaltheorie
LNA	„verriegelte“ Nukleinsäure (<i>locked nucleic acid</i>)
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>)
LuxS	S-Ribosylhomocystein Lyase
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (<i>matrix-assisted laser desorption ionization</i>)
mcs	multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MS	Massenspektrometrie
MTAN	5'-Methylthioadenosin/S-Adenosylhomocystein
	Nukleosidase
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>nuclear localization signal</i>)
NMR	Kernmagnetresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ori	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>P-Bodies</i>	Prozessierungskörper (<i>processing bodies</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PIMT	PRIP-interagierendes Protein mit Methyltransferase-Domäne
PNA	Peptid-Nukleinsäure (<i>petide nucleic acid</i>)
PRIP	Proliferator-aktiviertes Rezeptor-interagierendes Protein (<i>proliferator-activated receptor-interacting protein</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAP II	RNA-Polymerase II
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
RT	Raumtemperatur
SamSyn	S-Adenosyl-L-methionin-Synthetase
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SMN	<i>survival of motor neuron</i> -Komplex
S/N	Signal/Rausch (<i>signal to noise</i>)
snRNP	kleine nukleäre Ribonukleoproteinpartikel (<i>small nuclear ribonucleoprotein particle</i>)
SOE-PCR	<i>splicing by overlap extension</i> -PCR
SPAAC	spannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition (<i>strain-promoted azide-alkyne cycloaddition</i>)
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single-stranded DNA</i>)

snRNA	kleine nukleäre Ribonukleinsäure (<i>small nuclear ribonucleic acid</i>)
snoRNA	kleine nukleoläre Ribonukleinsäure (<i>small nucleolar ribonucleic acid</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBTA	Tris(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyl
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Flugzeit (<i>time of flight</i>)
TPBS	Tween-PBS
TREX	Transkriptions-Export-Komplex (<i>transcription export complex</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>unit</i>)
UsnRNP	Uridin-reiche snRNA-Ribonukleoproteinpartikel
UTR	untranslatierter Bereich (<i>untranslated region</i>)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
xg	Mehrfaches der Gravitation

Abstract

Subcellular localization of mRNAs has been found in different cells and organisms like yeast, oocytes and neurons. The asymmetric distribution of these biomolecules enables temporally and spatially controlled initiation of translation and provides a further mechanism for regulating gene expression.

Characterizing transport, dynamics and misregulation of subcellularly localized mRNAs could allow insights into development processes as well as causes of disease and possibly open up new possibilities for therapies, e. g. in the field of neuronal diseases. Thus, labeling and analysis of the biomolecule mRNA in living cells is of tremendous interest. An ideal method for this aim should (i) allow detection of endogenous RNA, (ii) prevent background fluorescence of unbound probes, (iii) exhibit high specificity and (iv) be compatible with the living system. In contrast to currently established methods, chemo-enzymatic strategies could fulfill all of these criteria and constitute a novel possibility to visualize mRNA.

Therefore a chemo-enzymatic strategy for labeling eukaryotic mRNAs was developed in this work, providing a basis for the establishment of novel methods for mRNA-analysis.

To achieve specific labeling of eukaryotic mRNAs in the first step, the cap-modifying trimethylguanosinsynthases hTgs1 and GlaTgs2, known to hypermethylate the eukaryotic mRNA-cap at position N^2 , were characterized regarding promiscuous activity on AdoMet-analogs. The enzymes were recombinantly produced, purified and used in bioconversions with the natural cosubstrate AdoMet as well as the AdoMet-analog AdoPropen and low promiscuous activity of GlaTgs2 on the analog was revealed. To improve this side-activity, amino acids, which potentially inhibited access of analogs to the catalytic center, were identified and substituted by alanine. One of the generated GlaTgs2-variants showed improved substrate affinity and turnover number on AdoPropen compared to the wildtype-enzyme as well as an improved turnover number with AdoEnYn.

Using this variant, efficient modification of the cap by transferring alkene or alkyne residues was achieved, making mRNAs accessible for labeling by different click reactions.

The alkenylated cap-analog N^2 -Allyl- m^7 GpppA could be linked covalently to a thiol-containing biotin-analog in a thiol-ene click reaction. Furthermore, fluorescent labeling of the allylated cap-analog was achieved by photoclick reactions.

Enzymatic alkynylation and chemical modification by Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) enabled specific fluorescent labeling not only of the minimal capped RNA m^7 GpppA but also of a >100 nt long cap-bearing RNA.

Owing to the modularity of the established strategy it was possible to enzymatically transfer different reactive groups to the eukaryotic mRNA-cap, making it accessible for specific modification with different reporter molecules in different click reactions. These results emphasize the flexibility of the chemo-enzymatic approach and demonstrate, that an expansion of the established protocols could provide a promising basis for the development of novel methods for visualization of mRNAs in living cells but also for isolation of mRNAs from complex samples.

Zusammenfassung

Eine subzelluläre Lokalisation spezifischer mRNAs konnte in verschiedenen Zellen und Organismen, wie Hefen, Oozyten und Neuronen nachgewiesen werden. Die asymmetrische Verteilung dieser Biomoleküle ermöglicht eine zeitlich und räumlich kontrollierbare Initiation der Translation und stellt einen weiteren Mechanismus zur Regulierung der Genexpression dar. Die Charakterisierung von Transportprozessen, Dynamiken und möglichen Fehlregulierungen subzellulär lokalisierter mRNAs könnte neue Einblicke in Entwicklungsprozesse sowie Ursachen von Krankheiten bieten und neue Therapiemöglichkeiten, beispielsweise im Bereich neuronaler Erkrankungen, eröffnen. Die Markierung und Analyse des Biomoleküls mRNA in lebenden Zellen ist daher von enormer Wichtigkeit und eine optimale Methode hierfür sollte (i) endogene RNA markieren, (ii) keine Hintergrundfluoreszenz durch ungebundene Sonden aufweisen und (iii) eine hohe Spezifität sowie (iv) die Kompatibilität mit dem lebenden System gewährleisten. Im Gegensatz zu derzeit etablierten Methoden könnten chemo-enzymatische Strategien alle diese Kriterien erfüllen und eine neue Möglichkeit zur Visualisierung von mRNA darstellen.

In dieser Arbeit wurde daher ein chemo-enzymatischer Ansatz zur Markierung eukaryotischer mRNA entwickelt. Hierdurch wurde eine Grundlage für die Etablierung neuer möglicher Methoden zur mRNA-Analyse geschaffen.

Um die notwendige spezifische Markierung eukaryotischer mRNA zu erreichen, wurden zunächst die Kappen-modifizierenden Trimethylguanosinsynthasen hTgs1 und GlaTgs2, welche die Hypermethylierung der mRNA-Kappe an Position N^2 katalysieren, hinsichtlich promiskuitiver Aktivität gegenüber AdoMet-Analoga getestet. Die Enzyme wurden rekombinant hergestellt und in Biokonversionen mit dem natürlichen Cosubstrat AdoMet sowie dem AdoMet-Analogon AdoPropen eingesetzt. Für GlaTgs2 konnte eine geringe promiskuitive Aktivität gegenüber dem Analogon nachgewiesen werden. Um diese zu verbessern, wurden Aminosäuren, deren Seitenketten den Zugang der voluminöseren AdoMet-Analoga zum katalytischen Zentrum behindern könnten, identifiziert und durch Alanin substituiert. Eine der erhaltenen Varianten zeigte im Vergleich zum Wildtyp-Enzym eine deutlich verbesserte Substrataffinität und verbesserte katalytische Produktivität gegenüber AdoPropen sowie eine bessere katalytische Produktivität mit AdoEnYn.

Durch die Enzym-Variante konnte eine effiziente Modifizierung der Kappe durch Transfer eines Alkenyl- bzw. Alkynylrest erreicht werden, wodurch mRNAs für spezifische Markierungen durch verschiedene Click-Reaktionen zugänglich wurden.

Das alkenylierten Kappen-Analogon N^2 -Allyl- m^7 GpppA konnte erfolgreich in einer Thiol-En-Click-Reaktion mit einem Thiol-haltigen Biotin-Analogon kovalent verknüpft werden. Darüber hinaus konnte eine Fluoreszenzmarkierung der alkenylierten Kappe N^2 -Allyl- m^7 GpppA durch verschiedene Photoclick-Reaktionen erreicht werden. Die enzymatische Alkinylierung der mRNA-Kappe und anschließende chemische Modifizierung durch die Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) ermöglichte nicht nur eine spezifische Fluoreszenzmarkierung des Substrats m^7 GpppA sondern auch einer >100 nt Kappen-tragenden RNA.

Durch die Modularität des etablierten Ansatzes war es möglich, verschiedene reaktive Gruppen auf die eukaryotische mRNA-Kappe zu übertragen und verschiedene Click-Reaktionen und Reportermoleküle zur spezifischen Markierung zu nutzen. Diese Ergebnisse unterstreichen die Flexibilität des chemo-enzymatischen Ansatzes und die Möglichkeit, durch eine Erweiterung der etablierten Protokolle, neue, vielversprechende Strategien nicht nur zur Visualisierung von mRNA in lebenden Zellen, sondern auch zur Isolierung von mRNA aus komplexen Proben zu erhalten.

1. Einleitung

1.1 mRNA – mehr als ein Botenmolekül

1.1.1 Strukturelle Merkmale und Funktionen eukaryotischer mRNA

Die Übersetzung genetisch-codierter Informationen in Proteine, welche dann eine Vielzahl verschiedener Funktionen innerhalb jeder Zelle regulieren, ist eine Voraussetzung für den Erhalt zellulärer Integrität. Bei diesem Prozess nehmen mRNAs eine wichtige Funktion ein, da diese Biomoleküle unter anderem die Matrize zur Übertragung von genetischer in proteinogene Informationen darstellen.

In eukaryotischen Zellen müssen mRNAs hierfür zunächst aus dem Zellkern in das Cytoplasma transportiert und hier ihre Stabilität und Translationsrate kontrolliert werden.

Um diese komplexen Funktionen und Anforderungen zu erfüllen, sind eukaryotische mRNAs mit spezifischen Merkmalen ausgestattet. Hierzu zählen die 3'- und 5'-UTR sowie die 5'-Kappe und der Poly(A)-Schwanz. In Abbildung 1.1 ist der Aufbau einer eukaryotischen mRNA schematisch dargestellt.

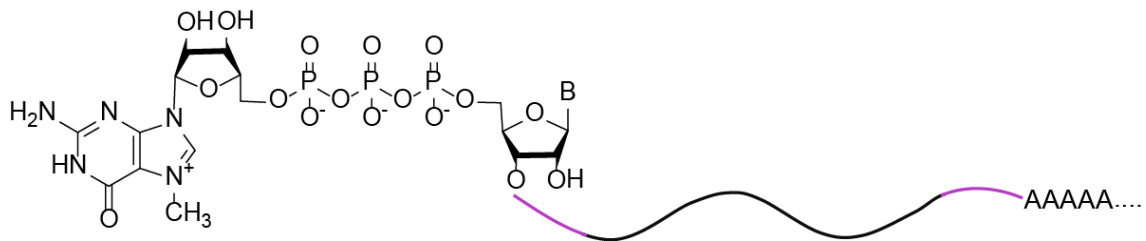


Abbildung 1.1 **Schematische Darstellung der strukturellen Merkmale einer eukaryotischen mRNA.** Die Kappe am 5'-Ende des Moleküls ist als Strukturformel, der Poly(A)-Schwanz, welcher das 3'-Ende bildet, als Einbuchstabencode angegeben. Die variable Länge dieses Motivs ist angedeutet. Die UTRs sind farblich markiert.

Der Poly(A)-Schwanz bildet das 3'-Ende eukaryotischer mRNAs und kann eine Länge von bis zu 250 Adenosinen in mammalischen Zellen haben. Hierdurch wird die Stabilität der mRNA im Cytoplasma gegenüber dem Abbau durch Exonukleasen auf mehrere Stunden erhöht.^[1] Je länger dabei der Poly(A)-Schwanz des mRNA-Moleküls ist, umso länger bleibt die eigentliche, codierte Information intakt und ermöglicht dadurch eine häufigere Translation des entsprechenden Gens. Weiterhin ist der Poly(A)-Schwanz auch an der Regulierung der Translationsrate beteiligt.^[1] So konnte durch Beilharz und Preiss im Jahr 2007 gezeigt werden, dass ein langer Poly(A)-Schwanz in exponentiell wachsenden Hefen zu erhöhter Translationsrate der entsprechenden mRNAs führt.^[2]

Allerdings ist der Poly(A)-Schwanz mittlerweile nicht mehr als alleiniges Merkmal eukaryotischer mRNAs anzusehen. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass auch einige

prokaryotische RNAs^[3,4] sowie eukaryotische, hypomethylierte tRNAs^[5] über einen, wenn auch relativ kurzen, Poly(A)-Schwanz von 10-50 Nukleotiden verfügen. Dieser übernimmt allerdings hierbei nicht die Funktion die betreffenden Moleküle zu stabilisieren, sondern initiiert deren Degradation.^[1]

Die Stabilität der mRNA im Cytoplasma wird auch durch die 5'-Kappe, welche ein weiteres spezifisches Merkmal eukaryotischer mRNAs darstellt, erhöht. Darüber hinaus ist diese Struktur wichtig zur Regulierung von Export- und Translationsprozessen. Die 5'-Kappe besteht aus einem an N7 methylierten Guanosinrest der über eine 5',5'-Triphosphatbrücke mit der RNA verknüpft ist. Schon während der Transkription im Nukleus wird in einem dreistufigen, enzymatischen Prozess der Guanosinrest an das naszierende RNA-Transkript angefügt und an der Position N7 methyliert, wodurch die *Cap* 0-Struktur gebildet wird. Bei höheren Eukaryoten erfolgt im Nukleus anschließend die Methylierung der 2'-Hydroxygruppe des ersten Nukleotids des Transkripts, was zu einer *Cap* 1-Struktur führt. Im Cytoplasma kann auch das zweite Nukleotid des Transkripts an dieser Position methyliert werden, wodurch die *Cap* 2-Struktur entsteht, die etwa die Hälfte aller humanen mRNAs aufweisen.^[6] In Trypanosomen konnte weiterhin eine *Cap* 4-Struktur nachgewiesen werden. Hierbei ist die mRNA ebenfalls mit dem *Cap* 0 versehen, das Transkript beginnt allerdings mit dem hypermethylierten Nukleotid m₂^{6,6}-Adenosin und als vierte Base tritt m³-Uracil auf, weiterhin sind die 2'-Hydroxygruppen der ersten vier Nukleotide methyliert.^[7]

Die Kappe dient zum einen der Minimierung der Degradation von mRNA durch 5'-3'-Exonucleases und erhöht so, wie auch der Poly(A)-Schwanz, die Stabilität des Transkripts. Zum anderen wird die Kappe durch verschiedene Proteine erkannt und gebunden und fungiert so als Initiator des Spleißens,^[8,9] des nukleo-cytoplasmatischen Transports^[10] und auch des Translationsprozesses^[11].

Wie der Poly(A)-Schwanz ist aber auch die Kappe kein alleiniges Merkmal eukaryotischer mRNAs. Eine Vielzahl viraler mRNAs verfügt über eine *Cap* 0-Struktur, um so ihr Erbgut in den Wirtszellen zu mimikrieren.^[12,13] Darüber hinaus sind auch eukaryotische RNAs bekannt, die eine Kappenstruktur aufweisen, wie die snRNAs (kleine nukleäre RNAs, *small nuclear* RNAs) und snoRNAs (kleine nukleäre RNAs, *small nucleolar* RNAs). Beide werden, wie auch mRNAs, durch die RNA-Polymerase II (RNAP II) synthetisiert und mit einer Kappe versehen, allerdings nicht polyadenyliert^[14].

Es konnten aber auch Transkripte der RNA-Polymerase II nachgewiesen werden, die ebenso wie mRNAs, sowohl eine Kappenstruktur als auch einen Poly(A)-Schwanz aufweisen. Hierzu

zählen beispielsweise nukleär-lokalisierte pri-miRNAs.^[15] Dennoch werden beide Modifikationen weitgehend als mRNA-typische Charakteristika bezeichnet.

1.1.2 Der „klassische“ Weg eukaryotischer mRNA *in vivo*

Wie in Abschnitt 1.1.1 beschrieben, benötigen mRNAs ihre charakteristischen Merkmale unter anderem, um für den Export ins Cytoplasma sowie für die Translation erkannt zu werden, so dass diese die Präsenz und Funktion der mRNAs *in vivo* bestimmen. Die „klassische“ Beschreibung des Weges einer mRNA *in vivo*, die auch in Lehrbüchern beschrieben wird, umfasst dabei die Prozessierung der pre-mRNA im Nukleus, den Transport der mRNA aus dem Kern ins Cytoplasma, die Bindung von Translationsinitiationsfaktoren und Ribosomen an die mRNAs, wodurch die Translation initiiert wird sowie den anschließenden, regulierten Abbau der mRNA. Für subzellulär lokalisierte mRNAs treten darüber hinaus noch weitere Prozesse auf, die die asymmetrische Verteilung der Spezies ermöglichen. Hier soll allerdings nur der „klassische“ dargestellt werden, vor allem um einen genaueren Eindruck von Entstehung und Bedeutung der mRNA-Kappe in diesem Kontext zu erhalten.

Der Weg einer mRNA beginnt im Nukleus, wo zunächst eine sogenannte pre-mRNA durch die RNA-Polymerase II, einer von drei vorkommenden RNA-Polymerasen, synthetisiert wird. Die pre-mRNA wird cotranskriptionell prozessiert, wodurch eine reife, transport- und translationsfähige mRNA entsteht. Diese Prozessierungen werden durch eine Vielzahl von komplex regulierten Interaktionen sowie Rekrutierungsprozessen initiiert und führen zum Spleißen der pre-mRNA sowie der Modifizierung des Moleküls mit Kappe und Poly(A)-Schwanz. Für die erfolgreiche Initiation der Prozessierung ist dabei von Bedeutung, dass die Transkription durch die RNAP II erfolgt, da diese weitere Enzyme und Proteine rekrutiert, welche die erforderlichen Modifizierungen der pre-mRNA ermöglichen. Nach der Synthese von etwa 25 Nukleotiden^[16] wird zunächst der *Capping*-Komplex, bei höheren Eukaryoten bestehend aus einem bifunktionellen Enzym von RNA-Triphosphatase und Guanylyltransferase sowie Guanosin-*N*7-Methyltransferase, über die C-terminale Domäne (CTD) der Polymerase zur pre-mRNA dirigiert.^[17] Durch die RNA-Triphosphatase wird der γ -Phosphatrest des naszierenden Transkripts entfernt und mittels der Guanylyltransferase ein Guanosinmonophosphat unter Ausbildung einer 5',5'-Triphosphatbrücke mit dem naszierenden Transkript verknüpft. Anschließend erfolgt die Methylierung an Position *N*7 des Guanosinrests durch die Guanosin-*N*7-Methyltransferase unter Verwendung von *S*-Adenosyl-L-methionin (SAM oder AdoMet) als Cosubstrat.

Die phosphorylierte C-terminale Domäne der Polymerase II scheint weiterhin auch für die Bindung des Spliceosoms an die naszierenden RNA verantwortlich zu sein.^[18,19] Dieses besteht aus UsnRNPs (Uridin-reiche snRNA-Ribonukleoproteinpartikel) sowie einer Vielzahl weiterer zur SR-Familie gehörender Proteine und katalysiert die Entfernung nichtcodierender Regionen, sogenannter Introns, aus dem Transkript. Auch gibt es Hinweise, dass die RNAP II, abhängig von ihrem Phosphorylierungsstatus, die Aktivität des Spliceosoms regulieren kann und ihr somit, neben der passiven Rekrutierungsrolle, weitere entscheidende Bedeutung für die Entstehung der reifen mRNA zukommt.^[20]

Auch die zuvor generierte Kappe hat über die Rekrutierung verschiedener Proteine Einfluss auf den Vorgang des Spleißens. Über diese spezifische Struktur interagiert der Kappen-Bindekomplex (*cap-binding complex*, CBC) mit der naszierenden mRNA. Dieser besteht aus den Kappen-bindenden Proteinen CBP20 und CBP80 (*cap-binding protein*). Der CBC ermöglicht unter anderem eine effiziente Bindung der snRNP-Spliceosomen-Core-Komponenten (*small nuclear ribonucleoprotein-Spliceosom-Core-Komponenten*) an die 5' terminale Spleißposition.^[21]

Die abschließende Modifizierung der pre-mRNA nach erfolgreichem *Cappen* und Spleißen, erfolgt durch die Addition des Poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende des Transkripts. Dieser Schritt wird erstmals nicht durch die Polymerase II, sondern sequenzabhängig induziert. Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Sequenzen innerhalb des 3'-Ende des Transkripts sowie deren Positionierung zueinander für die Erkennung durch eine Endonuklease und eine effiziente Spaltung durch diese verantwortlich sind.^[22–24] Anschließend wird an das erhaltene 3'-Ende durch die Poly(A)-Polymerase eine Poly(A)-Sequenz angefügt.

Es wird deutlich, dass ein komplexes Netzwerk von Proteininteraktionen und Regulationen notwendig ist, um eine reife mRNA aus der pre-mRNA zu erhalten. Hierdurch wird auf zwei Ebenen sichergestellt, dass nur korrekt modifizierte Transkripte im Folgenden in das Cytoplasma exportiert werden können. Zum einen werden mRNAs, die nicht mit den charakteristischen Merkmalen wie Kappe oder Poly(A)-Schwanz versehen wurden, durch fehlende Protein-RNA Wechselwirkungen sofort als fehlerhaft erkannt und direkt im Nukleus abgebaut. Zum anderen werden die Modifikationen als Signalfunktionen für den Export benötigt, wodurch eine weitere Kontrolle ermöglicht wird.

Eine korrekte Prozessierung ist somit notwendig, um den Export der mRNA durch die Kernporen ins Cytoplasma zu initiieren und sie so für die Translation zugänglich zu machen. Hierfür müssen zunächst verschiedenen Exportproteinen an die prozessierte mRNA binden. Die Rekrutierung des Adaptermoleküls Aly/REF an den CBC, dessen Bindung an die Kappe

schon Einfluss auf die Rekrutierung des Spliceosoms hatte, stellt den ersten Schritt in der Bildung eines exportfähigen Ribonukleoproteins dar. Die Bindung des Adapterproteins erfolgt oft in Form größerer Proteinkomplexe wie TREX (*transcription export complex*)^[10,25] oder EJC (*exon-junction complex*), die dann zur Bindung des eigentlichen Exportrezeptors TAP/NXF1 führen^[26] und den Export der mRNA ins Cytoplasma zu ermöglichen.

Auch snRNAs werden durch die RNAP II synthetisiert und mit der Kappe versehen, so dass eine Bindung des CBC auch an diese Spezies auftritt. Allerdings werden in diesem Fall nicht Aly/REF und TAP/NXF1 sondern PHAX^[27] und CRM1-RanGTP^[28,29] als Transportfaktoren rekrutiert, die als Signal für den Export ins Cytoplasma dienen. Die Differenzierung beider Spezies hinsichtlich der Rekrutierung entsprechender CBC-bindender Faktoren erfolgt dabei über die Länge der synthetisierten Transkripte mittels eines hnRNP C-Tetramers (*hetero nuclear ribonucleoprotein-C Tetramers*).^[30] Im Cytoplasma erfolgt eine Differenzierung zwischen mRNAs und snRNAs, so dass Letztere nicht in die Translation eingehen, sondern nach Hypermethylierung der Kappe an Position N^2 in den Nukleus reimportiert werden.

Die exportierten mRNAs hingegen werden im Cytoplasma translatiert. Zunächst werden hierfür Ribosomen, meist über Interaktionen zu Kappen-bindenden Proteinen, zu der mRNA dirigiert. Für eine erste Translationsrunde wird dies durch den CBC initiiert. Diese, als Pionierrunde der Translation bezeichnete Phase, dient als Kontrollfunktion, um mRNAs mit vorzeitigem Stopcodon zu erkennen und für die Degradation zugänglich zu machen.^[31] Korrekt prozessierte mRNAs, werden für die folgenden Translationsrunden mit einem anderen Kappen-bindenden Proteinkomplex zur Rekrutierung des Ribosoms an die mRNA versehen. Hierzu bindet zunächst das im Cytoplasma vorliegende Kappen-bindende Protein eIF4E (eukaryotischer Initiationsfaktor 4E, *eukaryotic initiation factor 4E*), anstelle des CBC an die mRNA-Kappe und rekrutiert weitere Proteine (eIF4A und eIF4G), wodurch der eIF4F-Komplex gebildet wird. Das Protein eIF4G bindet außerdem an PABP (Poly(A)-bindendes Protein, *poly(A)-binding protein*) und eIF3, wodurch der 43S-pre-Initiationskomplex des Ribosoms an die mRNA rekrutiert wird. Diese ribosomale Untereinheit scannt mithilfe von eIF4A die RNA ausgehend vom 5'-Ende um an der Initiationssequenz die 60S-Untereinheit des Ribosoms binden zu können. Hierdurch wird die Translation und damit die Synthese eines spezifischen Proteins auf Grundlage der vorliegenden genetischen Information initiiert.^[32]

Die Dauer der Translation wird dabei durch die Stabilität des Transkripts bestimmt, da mRNAs im Cytoplasma durch 3'-5'-Exonukleasen und auch durch die Wirkung von *Decapping*-Enzymen (wie DCP1/2 in humanen Zellen) abgebaut werden. Die Schnelligkeit des Abbaus hängt dabei von der Länge des Poly(A)-Schwanzes und der Effektivität der

Rekrutierung von Nukleasen durch den mRNA-Proteinpartikel ab.^[33] Der Abbau der mRNAs und damit das Ende ihres Lebensweges findet in sogenannten *processing bodies (P-Bodies)* statt, wie durch Versuche mit Hefezellen nachgewiesen wurde.^[34] Eine Zusammenfassung der Vorgänge von Entstehung bis zum Abbau einer mRNA ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

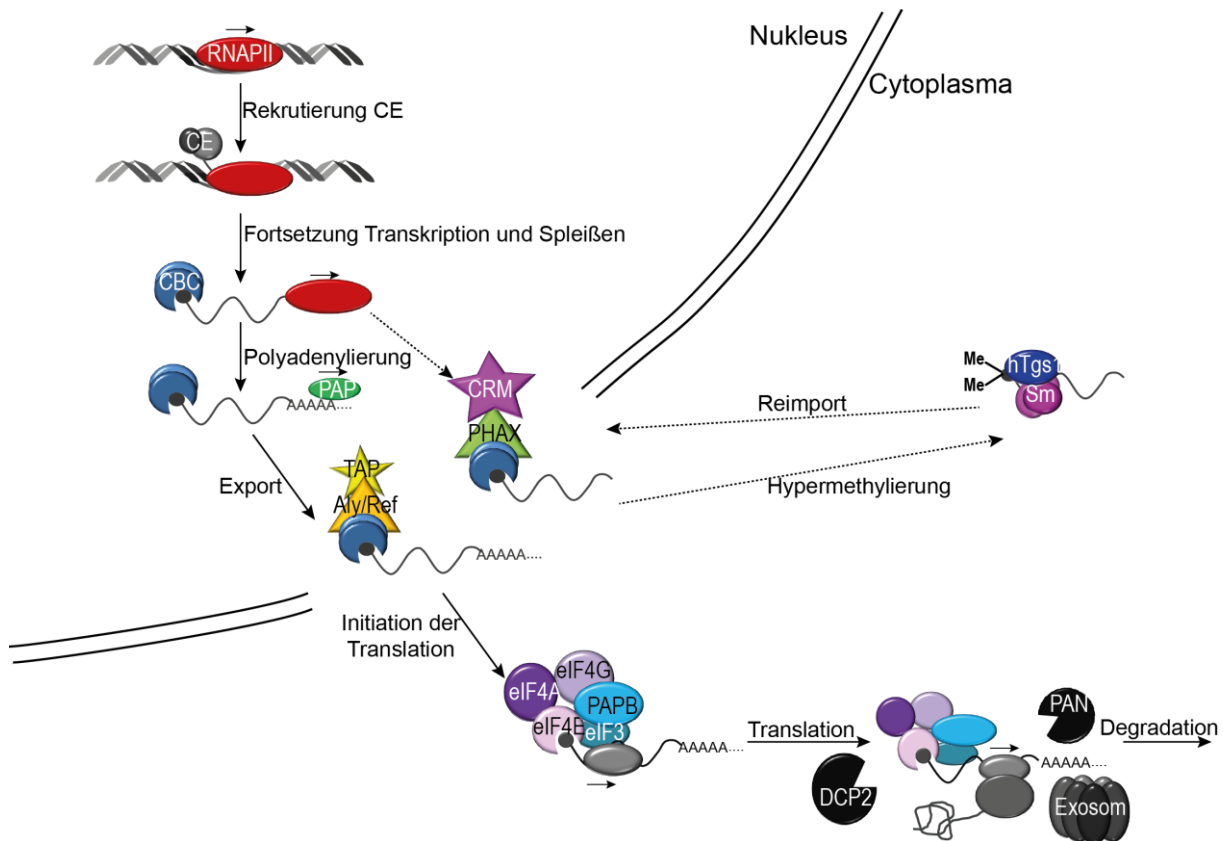


Abbildung 1.2 **Der Weg einer humanen mRNA in vivo.** Die Transkription der codierenden DNA in pre-mRNA erfolgte durch RNAP II (rot). Diese pausiert nach etwa 20 Nukleotiden und rekrutiert die *Capping*-Enzyme (CE, grau) zum 5'-Ende des Transkripts. Nach der Modifikation der naszierenden pre-mRNA mit der 5'-Kappe (dunkelgrau), bindet der CBC (blau). Es folgt das Spleißen der mRNA (hier nicht dargestellt), bevor die Polyadenylierung mittels PAP (grün) erfolgt. Über die Adapter- und Transportproteine, die an den CBC binden, wird der Export der mRNA vermittelt. Im Gegensatz dazu werden snRNAs mit anderen Adapter- und Exportproteinen versehen (gestrichelter Pfeil, Proteine: grün und lila), im Cytoplasma durch hTgs1 (blau) hypermethyliert und reimportiert. Die mRNA hingegen bindet im Cytoplasma eIF4E über die 5'-Kappe, wodurch weitere Proteine und Teile des Ribosomens (grau) rekrutiert werden. Nach Erkennung der Initiationssequenz bildet sich ein funktionelles Ribosom und die Translation startet. Der Abbau der mRNA erfolgt durch verschiedene Nukleasen (schwarz/grau), wobei meist zunächst Deadenylierung durch PAN (Poly(A)-Nuklease) und anschließende 3'-5'-Degradation durch das Exosom erfolgt. Ein Abbau der mRNA ausgehend vom 5'-Ende kann nach *Decapping* durch DCP2 erfolgen.

Es wird ersichtlich, dass die Stabilität und Funktion einer mRNA *in vivo* durch viele Interaktionen reguliert und kontrolliert wird. Dies lässt sich dadurch erklären, dass diesen Molekülen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Zellvitalität zukommt und so eine strikte Kontrolle der Prozessierung und Translation unerlässlich ist, um die Integrität der Zellfunktion zu erhalten.

Abschließend soll erwähnt werden, dass die genauen Zusammenhänge der Prozessierung, vor allem im Bereich des Spleißens, und auch des Transportes oftmals noch ungeklärt oder auch strittig sind und der hier beschriebene Weg somit nur ein Modell der Abläufe darstellen kann.

1.1.3 Subzellulär lokalisierte mRNAs – Regulierung der Genexpression auf RNA-Ebene

Alle Zellen eines Organismus besitzen die identische Erbinformation, dennoch unterscheiden sie sich sowohl in ihrer Morphologie als auch in ihrer Funktion. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Expression der genetischen Informationen reguliert wird, wodurch jede Zelle einen spezifischen Genpool für die Translation zugänglich macht. Eine solche Regulierung kann sowohl auf DNA^[35]- als auch auf Proteinebene^[36] erfolgen. Ein weiterer Mechanismus, der eine zeitliche und räumliche steuerbare Regulation der Genexpression ermöglicht, basiert auf subzellulär lokalisierten mRNAs.^[37] Hierunter versteht man mRNA-Spezies, die nicht diffus sondern asymmetrisch im Cytoplasma verteilt sind. Die Mechanismen und Effekte subzellulärer mRNA-Lokalisation werden seit den 1980er Jahren charakterisiert, nachdem im Jahr 1983 Jefferey *et al.* als eine der ersten, asymmetrisch vorliegende mRNAs beschrieben hatten.^[38] Sie konnten in *Styela* Oozyten (Manteltiereizellen) nachweisen, dass *actin*-mRNA zunächst in Myo- und Ektoplasma lokalisiert, in späteren Entwicklungsstadien aber in höchsten Konzentrationen im Myoplasma vorliegt. Hingegen konnte kaum *actin*-mRNA im Endoplasma nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen für *actin*-mRNA wurde für *histon*-mRNAs eine gleichmäßige Verteilung in allen Bereichen gezeigt.^[38]

Aus weiteren Studien ging hervor, dass subzellulär lokalisierte mRNAs auch in anderen Zelltypen auftreten können. Lawrence und Singer zeigten mittels *in-situ* Hybridisierung, dass die mRNAs von Actin, Vimentin und Tubulin in Fibroblasten subzellulär lokalisiert vorliegen und sich in ihren Lokalisationsmustern unterscheiden.^[39] So konnte *actin*-mRNA hauptsächlich in peripheren Bereichen, *vimentin*-mRNA eher im Bereich des Nukleus nachgewiesen werden.^[39] Bertrand *et al.* konnten mittels eines GFP-MS2-Konstrukts sowie entsprechend modifizierter *ASH1*-mRNA *in vivo* zeigen, dass diese mRNA-Spezies in der Knospungsspitze von *S. cerevisiae* lokalisiert ist.^[40] Auch in *Drosophila* Oozyten konnten verschiedene, meist an bestimmten Polen lokalisierte mRNAs, wie beispielsweise *oskar*^[41]- oder *bicoid*-mRNA^[42] nachgewiesen werden. Obwohl gezeigt wurde, dass subzellulär lokalisierte mRNAs in verschiedenen Zellen und Zellstadien nachweisbar waren, wurde noch zu Beginn des 20. Jahrhunderts angenommen, dass eine solche Regulierung nur ein vereinzelt auftretendes Phänom darstellt.^[43] Innerhalb der letzten Jahren konnte dann unter anderem

durch Eberwine *et al.*, Willis *et al.*, Cajigas *et al.* sowie Lécuyer *et al.* gezeigt werden, dass eine Regulierung auf Grundlage subzellulär lokalisierter mRNAs keinesfalls einen Ausnahme- sondern eher den Normalfall darstellt.^[44–47] So wurde durch Eberwine *et al.* auf Grundlage ihrer Analysen vermutet, dass in hippocampalen Neuronen bis zu 400 mRNAs an Dendriten lokalisiert sind.^[44] Willis *et al.* zeigten, dass in dorsalen Wurzelganglien 200 verschiedene mRNAs axonal lokalisiert vorliegen.^[45] Cajigas *et al.* nutzten *Deep-Sequencing* und hochauflösende FISH-Experimente und konnten hiermit nachweisen, dass in hippocampalen Neuronen von 8 379 charakterisierten mRNA-Spezies, 2 550 lokalisiert in Axon oder Dendriten vorliegen.^[47] In *Drosophila* Oozyten konnten von 2 314 untersuchten und exprimierten mRNAs sogar 71 % als subzellulär lokalisiert nachgewiesen werden, wobei sich die Lokalisationsmuster in 35 Arten unterteilen ließen.^[46] Dabei war besonders auffällig, dass mRNA und das jeweilige codierte Protein die gleiche regionale Verteilung aufwiesen, wobei die mRNA stets zu einem früheren Zeitpunkt nachweisbar war.^[46] Dies ist ein starker Hinweis auf die Rolle subzellulär lokalisierter mRNAs für die räumlich regulierte Proteinbiosynthese.

Durch subzellulär lokalisierte mRNAs wird somit eine zeitlich und räumlich regulierbare Initiation der Proteinbiosynthese erreicht. Dies ermöglicht unter anderem (i) die Erzeugung morphogener Gradienten,^[48] (ii) die kontrollierte Segregation zellendifferenzierender Substanzen,^[49] (iii) die Erzeugung gerichteter Motilität von Zellen durch domänenspezifische Proteinbiosynthese^[50] oder (iv) eine lokale Anreicherung von Signalproteinen in Neuronen^[51]. Um eine asymmetrische Verteilung von mRNAs zu erreichen, wurden bisher vier grundsätzliche Mechanismen beschrieben, die in Abbildung 1.3 dargestellt sind. Eine Möglichkeit, die allerdings nur vereinzelt auftritt, bietet dabei die lokale Transkription spezifischer mRNAs in mehrkernigen Zellen. So werden beispielsweise in Muskelzellen mRNAs, codierend für Untereinheiten des Acetylcholinrezeptors, lediglich in Kernen nahe der Synapsen synthetisiert und so in diesen Bereichen angereichert.^[52] Ein weiterer Mechanismus konnte unter anderem durch Ding *et al.* nachgewiesen werden, die zeigten, dass *hsp83*-mRNA nur in bestimmten Bereichen des *Drosophila* Oozyten stabilisiert, in anderen Bereichen hingegen degradiert wird.^[53] Der lokale Schutz vor Abbau stellt somit einen weiteren Mechanismus zur subzellulären Lokalisation von mRNAs dar.

Am Beispiel der *Drosophila* Oozyten konnte auch ein dritter Mechanismus nachgewiesen werden. Hierbei diffundieren mRNAs im Cytoplasma, werden aber in bestimmten Bereichen durch Biomoleküle gebunden. Durch diese Verankerung werden dann auch die mRNAs in diesen Bereichen lokalisiert. Ein solcher Mechanismus wurde unter anderem für *nanos*-

mRNA beschrieben, die in der späten Phase der Ovogenese von *Drosophila* am hinteren Pol durch Bindung an Keimplasma immobilisiert wird.^[54]

Der vierte und häufigste Mechanismus basiert auf einem aktiven Transport der zu lokalisierenden mRNA entlang von Actinfilamenten oder Mikrotubuli. Aufgrund der Geschwindigkeiten von bis zu 600 nm/sec^[55] ist dieser Mechanismus prädestiniert um mRNAs über lange Strecken, wie beispielsweise in Neuronen zu transportieren. Die mRNA wird hierfür in Ribonukleoproteinpartikel (RNPs) verpackt.^[56–58] Es ist bekannt, dass verschiedene mRNA-Spezies gemeinsam in einem Partikel transportiert werden können.^[59] So konnten beispielsweise *CamKIIα*- und *Arc*-mRNA in denselben Transportgranula^[56] sowie eine Colokalisation von *ASH1*-mRNA und *IST2*-mRNA während des Transports nachgewiesen werden^[59].

In einigen dieser Transportpartikel konnten unter anderem auch Ribosomen nachgewiesen werden, so dass eine parallele, subzelluläre Lokalisation aller für die Translation benötigten Komponenten erfolgt.^[60] Allerdings existieren auch Beispiele, die den Transport von mRNA in Abwesenheit von Ribosomen nachgewiesen haben, wobei die Ribosomen in diesem Fall in großen, unbeweglichen RNPs vorlagen.^[61]

Neben mRNAs und gegebenenfalls Ribosomen treten in RNPs weitere Faktoren auf, welche die Translation regulieren oder die Stabilität der Granula gewährleisten (zusammengefasst unter anderem durch Kiebler und Bassel^[62] sowie Carson *et al.*^[63]).

So wird die asymmetrische Bereitstellung einer mRNA durch *cis*-agierende Lokalisationselemente bestimmt. Dies können Sequenzen^[64] oder Sekundärstrukturen^[65] sein, die meist in der 3'-UTR der RNA^[66–68] codiert sind und *trans*-agierende Reporter rekrutieren, wodurch der Transportweg initiiert wird. Beispielsweise wurde gezeigt, dass die subzelluläre Lokalisation von *oskar*-mRNA in *Drosophila* Oozyten abhängig von der Präsenz des Proteins Exuperantia (Exu) ist und eine Colokalisation beider Moleküle in RNPs vorliegt.^[69] Außerdem konnten in den RNPs auch das Ypsilon-Schachtel-Protein (Yps) nachgewiesen werden, das von Exu rekrutiert wird und als Translationsrepressor fungieren könnte.^[69] Hingegen ist Squid (Sqd) für die korrekte subzelluläre Lokalisation der *gurken*-mRNA in *Drosophila* Oozyten notwendig.^[70] Weiterhin konnten Hinweise erhalten werden, dass Sqd gemeinsam mit Cup auch an der Translationsrepression dieser mRNA beteiligt ist.^[71]

Diese Studien zeigen, dass viele der in den RNPs vorliegenden Proteine nicht nur wichtig für die korrekte subzelluläre Lokalisation der mRNAs sondern auch direkt oder indirekt an der Repression der Translation während des Transports beteiligt sind. Diesem Stilllegen der Translation liegen verschiedene Mechanismen zugrunde. Beispielsweise können Interaktionen

mit den Translationsinitiationsfaktoren oder den Ribosomen für eine Repression genutzt werden. Die Regulierung der Poly(A)-Schwanz-Länge stellt eine weitere Möglichkeit dar, um die Translation zu inhibieren.

ZBP1 (*zipcode binding protein 1*) ist ein bekanntes Beispiel für ein Protein, welches sowohl Transport als auch Translation reguliert. ZBP1 bindet sequenzspezifisch in der 3'-UTR von β -*actin*-mRNA und induziert so zum einen den Transport der mRNA zu den Dendriten.^[72] Zum anderen wird durch Bindung von ZBP1 aber auch die Translation, durch fehlende Ausbildung eines funktionellen Ribosoms, inhibiert.^[73] In den Dendriten kann dann eine kontrollierte lokale Proteinbiosynthese erfolgen, da ZBP1 hier phosphoryliert wird und dadurch nicht mehr an die mRNA bindet.^[73]

Ein Mechanismus, welcher auf einer Inhibierung der Translationsinitiation beruht, wurde nicht nur für *gurken*-mRNA, sondern auch für *oskar*-mRNA als entscheidend für die Kontrolle der Translation nachgewiesen.^[74] Es wird vermutet, dass hierbei Cup mit eIF4E und Bruno, einem 3'-UTR-RNA-bindenden Protein interagiert und hierdurch einen zirkulären Komplex aufbaut, wodurch die Translation inhibiert wird. Weiterhin wird eine Interaktion von eIF4E mit eIF4G, welche notwendig für die Initiation der Translation ist, durch Cup inhibiert.^[74]

Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch durch Gu *et al.* beschrieben.^[75] Sie konnten zeigen, dass Puf6p an die 3'-UTR der *ASH1*-mRNA in Hefen bindet und dadurch die Translation inhibiert wird.^[75] Die Bindung von Puf6p an die 3'-UTR sowie an eIF5B/Fun12 inhibiert dabei die Assemblierung des 80S-Ribosoms während des Transports, wie durch Deng *et al.* gezeigt wurde.^[76] Die Translation subzellulär lokalisierter mRNAs wird dann vermutlich durch Freisetzen des Puf6p von der mRNA durch Proteinkinase CK2-vermittelte Phosphorylierung erreicht.^[76]

Die Regulierung der Translation durch Kontrolle der Poly(A)-Schwanz Länge konnte unter anderem durch Wu *et al.* beschrieben werden.^[77] Sie konnten Hinweise erhalten, dass die Translation der *CamKII α* -mRNA in Neuronen über die Länge des Poly(A)-Schwanzes reguliert wird. In Analogie zu Mechanismen, welche schon für *Xenopus* Oozyten beschrieben wurden,^[78] wird angenommen, dass durch das CPE-bindende Protein (CPE, *cytoplasmic polyadenylation element*), welches an bestimmte Sequenzen der 3'-UTR bindet, eine Polyadenylierung und hierdurch die Translation initiiert wird.^[77]

Diese und weitere Studien zeigen, dass eine Vielzahl verschiedener Proteine in den RNPs vorliegt, die sowohl für die subzelluläre Lokalisation von mRNA als auch die lokale Translation wichtig sind. Um diese lokale Translation induzieren zu können, müssen

entsprechende Repressorproteine von der RNA entfernt werden. Hierzu könnten kompetitive Interaktionen genutzt werden, welche zwischen dem Repressor sowie Proteinen am Zielort auftreten und eine Freisetzung der mRNA und damit eine Translation ermöglichen.^[79] Eine andere Möglichkeit stellt die ortsspezifische Phosphorylierung der Repressorproteine dar.^[75] Die Translation kann mittels Phosphorylierung nicht nur lokal sondern auch zeitlich induziert werden.

Huang *et al.* postulierten einen Mechanismus zur rezeptor-aktivierten Translationsinitiation von *CamKII α* -mRNA.^[80] Zunächst bindet CPEB (*cytoplasmic poly-adenylation element-binding protein*) an die mRNA, welches dann Maskin rekrutiert und hierüber einen Komplex mit eIF4E bildet, wodurch die Translation unterdrückt wird. Bei Bindung von Glutamat an den NMDA-Rezeptor wird eine Signalkaskade induziert, welche zur Aktivierung von Aurora führt. Diese Kinase phosphoryliert folgend CPEB. Dieses dissoziiert von der mRNA und aktiviert CPSF (*cleavage and polyadenylation specificity factor*), welches wiederum PAP aktiviert und so zu einer Verlängerung des Poly(A)-Schwanzes der mRNA führt. Es wird vermutet, dass hierdurch auch die Dissoziation von Maskin induziert und so die Translation initiiert werden kann.^[80]

Die RNPs enthalten neben mRNAs, Faktoren zur Regulation der Translation, Reporterproteine für die korrekte subzelluläre Lokalisation, aber auch Motorproteine. Ein Myosin-vermittelter Transport erfolgt dabei entlang von Actin, Kinesin/Dynein-vermittelter Transport entlang von Mikrotubuli.

Ein Myosin-abhängiger Transport konnte beispielsweise für die *ASH1*-mRNA in Hefen nachgewiesen werden.^[40] Bertrand *et al.* nutzten ein RNA-Konstrukt, welches GFP-MS2 binden konnte, zur Untersuchung der Mobilität fluoreszenzmarkierter mRNAs *in vivo*. Dabei konnte aufgrund der gemessenen Geschwindigkeit von 200-440 nm/sec sowie einer Immobilität der mRNA, wenn Mutationen in dem Motorprotein Myo4/She1 vorlagen, gezeigt werden, dass diese mRNAs Myosin-vermittelt von der Mutter- in die Tochterzelle transportiert werden.^[40] Ein aktiver Transport mithilfe eines Myosin/Actin-Systems konnte auch für *β -actin*-mRNA, die an den Spitzen motiler Fibroblasten lokalisiert ist, nachgewiesen werden.^[81] Für *CamKII α* -mRNA, welche in Dendriten lokalisiert ist,^[82] konnte hingegen ein Transportmechanismus entlang Mikrotubuli mittels des Motorproteins Kinesin KIF5 nachgewiesen werden.^[56]

Diese Beispiele verdeutlichen, dass das Prinzip subzellulär lokalisierter mRNAs ubiquitär nachweisbar ist und einen wichtigen Einfluss auf die Regulierung der Proteinbiosynthese polarisierter Zellen sowie Neuronen hat^[83] und keinesfalls einen Sonderfall zur Regulierung

der Genexpression darstellt. Dazu passt auch, dass eine lokale Proteinbiosynthese verschiedene Vorteile im Vergleich zu einer zentral ablaufenden aufweist. So ist der Transport einer mRNA, aus der eine Vielzahl an Proteinen synthetisiert werden kann, ökonomischer, als der Transport der einzelnen Proteine (Angabe aus Martin und Ephrussi^[37]). Es werden mögliche Interaktionen der Proteine mit zellulären Komponenten vermieden, die unter Umständen während des Transports des Proteins auftreten könnten und hohe lokale Konzentrationen am Zielort erleichtern die Assemblierung im Falle multimerer Proteinkomplexe.^[50] In großen Zellen, wie beispielsweise Neuronen, würde der Transport der Proteine weiterhin solche Zeiträume umfassen, dass währenddessen schon deren Degradation erfolgen könnte. Vor allem aber erlauben subzellulär lokalisierte mRNAs, großen, polarisierten Zellen eine bessere Kontrolle der zeitlichen und räumlichen Reaktion auf externe Stimuli.^[83] Durch subzellulär lokalisierte mRNAs kann die Synthese von Proteinen in bestimmten Bereichen auch vermieden werden, was unter anderem wichtig für eine korrekten Entwicklung von *Drosophila* Oozyten ist.^[48]

Es konnte nicht nur gezeigt werden, dass das Prinzip subzellulär lokalisierter mRNAs weit verbreitet ist, sondern darüber hinaus auch, dass Fehlregulationen auf dieser Ebene unter Umständen erheblichen Einfluss auf zelluläre Prozesse haben können.

Beispielsweise wurde die subzelluläre Lokalisation der *CamKIIα*-mRNA in Mäusen durch Veränderung der 3'-UTR inhibiert und der hieraus resultierende Effekt auf den erhaltenen Phänotyp untersucht.^[51] Durch die eingebrachte Mutation wurde eine diffuse Verteilung der mRNA in Neuronen bewirkt und die normalerweise auftretende subzelluläre Lokalisation in den Dendriten gestört. Hierdurch konnte das Level des codierten Proteins CamKIIα in postsynaptischen Bereich um mehr als 80 % reduziert werden. Diese Inhibierung der subzellulären mRNA-Lokalisation sowie die daraus resultierenden Reduzierung des Proteinlevels hatte nachweislich einen nachteiligen Einfluss auf das Langzeitgedächtnis sowie die langfristige Potenzierung.^[51]

Subzellulär lokalisierte mRNAs scheinen bedeutenden Einfluss auf die Regulation zellulärer Vorgänge zu haben, wobei eine Vielzahl von Mechanismen den Transport und die Translation dieser Spezies bestimmt. Diese komplexen Schritte sind bisher nicht vollständig aufgeklärt, obwohl das Verständnis dieser Prozesse unter Umständen neue Erkenntnisse über die Auswirkungen potentiell auftretender Fehlregulationen, auf die Entstehung von Krankheiten oder den Einfluss auf Lernprozesse und Langzeitgedächtnis eröffnen könnte.

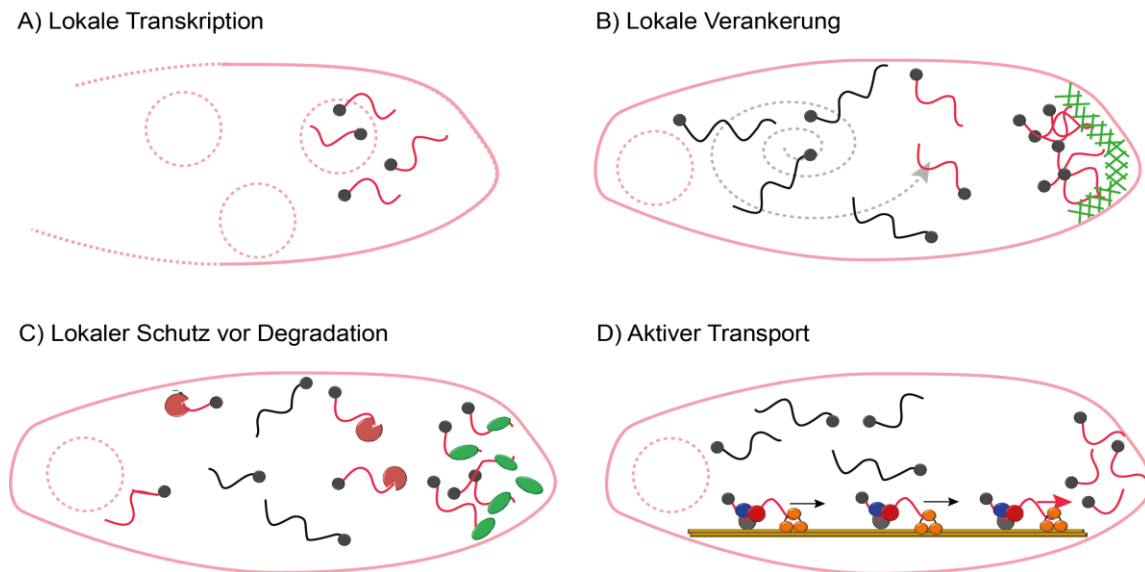


Abbildung 1.3 **Mechanismen zur subzellulären mRNA-Lokalisation.** In der Abbildung sind schematisch verschiedene Mechanismen gezeigt, die zu einer subzellulären Lokalisation von mRNA führen. Beliebige mRNA (schwarz), subzellulär lokalisierte mRNA (rot), schwarzer Kreis: Kappe, rosa: Zellmembran und Nukleus. **A)** In mehrkernigen Zellen kann die Transkription nur in bestimmten Zellkernen induziert werden, um eine asymmetrische Verteilung zu erreichen. **B)** Bindung spezifischer mRNAs an lokal vorliegende Strukturen (z. B. Actin, grün) innerhalb einer Zelle führt zu einer asymmetrischen Verteilung der mRNA. **C)** Lokaler Schutz vor Degradation (beispielsweise durch Oskar (grüne Ellipse) vor Degradation (z. B. durch einen Deadenylase-Komplex, rot). **D)** Aktiver Transport (RNP-Proteine schematisch dargestellt). Adaptiert von Meignin und Davis.^[84]

1.1.4 Fehlregulationen subzellulärer mRNA-Lokalisation und deren Auswirkung

Die Bedeutung subzellulär lokalisierter mRNAs zur Regulation der Proteinbiosynthese konnte seit den 1980er Jahren durch eine Vielzahl von Studien nachgewiesen werden. Hierbei wurde deutlich, dass eine weite Verbreitung dieses Mechanismus unabhängig von Zellart und Entwicklungsstadium festgestellt werden kann. Sowohl diese weite Verbreitung als auch die bei einer Fehlregulation auftretenden Effekte verdeutlichen die Wichtigkeit subzellulär lokalisierter mRNAs für die zelluläre Entwicklung.

Wie bereits in Abschnitt 1.1.3 beschrieben, kann eine fehlende subzelluläre Lokalisation der *CamKIIα*-mRNA in Neuronen einen nachteiligen Einfluss auf das Langzeitgedächtnis von Mäusen haben.^[51] Doch auch andere zelluläre Fehlfunktionen werden heute im Kontext fehlerhaft subzellulär lokalisierter mRNAs betrachtet.

So wird angenommen, dass das *fragile X*-Syndrom auf einer fehlregulierten Translation verschiedener mRNAs in Neuronen beruht. Das *fragile X*-Syndrom bezeichnet eine Form des Autismus und ist die häufigste genetisch vererbare Form von mentaler Retardierung. Die Krankheit wird durch eine Mutation in dem Gen *fmr1*, das für das *X mental retardation protein* (FMRP) codiert, verursacht. Es wurde postuliert, dass dieses RNA-bindende Protein mit RNAs, deren lokale Translation in Abhängigkeit eines Glutamat-Rezeptors aktiviert wird,

in Synapsen vorliegt. Eine Dephosphorylierung des FMRPs nach Aktivierung dieses Rezeptors ermöglicht die lokale Translation FMRP-bindender mRNAs. Eine Fehlregulation dieser Translationsinitiation könnte zu einer fehlerhaften synaptischen Plastizität und somit dem Auftreten des *fragile X*-Syndroms führen (zusammengefasst durch Bassell und Warren).^[85]

Auch als potentieller Auslöser der multiplen Sklerose (MS) werden subzellulär lokalisierte mRNAs mittlerweile diskutiert.^[86,87] Lyons *et al.* zeigten in Zebrafisch-Embryos, dass eine Mutation des Gens *kif1b* entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung der Neuronen, aber auch der axonalen Myelinscheide hatte. Diese Effekte traten auf, da das Motorprotein *kif1b* nicht mehr für die subzelluläre Lokalisation der *mbp*-mRNA (*myelin basic protein*-mRNA) genutzt werden konnte, wodurch die lokale Proteinbiosynthese ausblieb. Bei MS-Patienten kommt es zu einer Zerstörung dieser Myelinscheide und damit zu einer Vielzahl motorischer Ausfälle. Lyons *et al.* postulierten daher, dass unter Umständen auch die Fehllokalisierung der *mbp*-mRNA durch Mutation des *kif1b*-Motorproteins einen Auslöser von MS darstellen könnte. Diese Annahme beruht unter anderem auch auf der hohen Sequenzidentität des humanen und des Zebrafisch Motorproteins von 87 %.^[86]

Weiterhin könnten Fehlregulationen der subzellulären mRNA-Lokalisation auch eine Rolle bei Metastasierungsprozessen spielen. Auf Grundlage ihrer Ergebnisse postulieren Vainer *et al.*, dass eine fehlerhafte subzelluläre Lokalisation von mRNAs auch die Migration von Krebszellen begünstigen könnte. Eine Überexpression des RNA-bindenden Proteins ZBP1 in colorektalen Krebszellen könnte eine erhöhte subzelluläre Lokalisation der β -actin-mRNA zur Folge haben und so die Migration dieser Zellen begünstigen.^[88]

Diese Beispiele verdeutlichen, dass Fehlregulationen der subzellulären mRNA-Lokalisation durchaus schwerwiegende Folgen auf die Entwicklung eines Organismus haben können. Da neuere Studien zeigen, dass diese Regulierung der Proteinbiosynthese durchaus häufig auftritt, ist es notwendig, diese Prozesse zu charakterisieren und zu verstehen. Hierdurch könnten Erkenntnisse über Bedeutung subzellulär lokalisierter mRNAs für die Ausbildung neuronaler Netzwerke aber auch für die Entstehung von Krankheiten erlangt werden.

Die Visualisierung endogener, kaum modifizierter mRNAs in lebenden Zellen würde eine optimale Methode darstellen, die Dynamiken und Mechanismen zur asymmetrischen Verteilung von mRNAs zu charakterisieren. Einige Analysen hinsichtlich der subzellulären Lokalisation könnten darüber hinaus auch auf Grundlage isolierter mRNA erfolgen. Bisher wurden verschiedene Strategien entwickelt, die eine intrazelluläre Visualisierung dieses Biomoleküls oder dessen Isolierung ermöglichen, die in den folgenden Kapiteln beschrieben

werden (Kapitel 1.2.1 und 1.2.2). Schon hier soll darauf hingewiesen werden, dass keine dieser Methoden alle Anforderungen einer perfekten Detektions- bzw. Isolierungsmethode erfüllt.

1.2 Nachweise subzellulärer mRNA-Lokalisation

Es gibt verschiedene Ansätze, um mRNAs hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation zu charakterisieren. Es besteht die Möglichkeit, mRNAs zu isolieren und mittels RT-PCR oder *Deep-Sequencing*-Techniken und Datenbankvergleichen^[47] das Transkriptionslevel verschiedener mRNAs in bestimmten Bereichen einer Zelle zu überprüfen. Darüber hinaus können auch dynamische Prozesse des mRNA-Transports *in vivo* visualisiert werden.^[40,57]

1.2.1 Methoden zur Isolierung von mRNA und deren Anwendungen

1.2.1.1 Isolierung von mRNA mithilfe des Poly(A)-Schwanzes

Die mRNA-typischen Merkmale Kappe und Poly(A)-Schwanz können genutzt werden, um selektiv diese Spezies aus eukaryotischen Zellen zu isolieren.

Eine mögliche Isolierungsmethode auf Basis des Poly(A)-Schwanzes wurde von Grammel *et al.* entwickelt.^[89] Dabei wurden Alkin-modifizierte Adenosin-Analoga durch Poly(A)-Polymerasen *in vivo* in neu transkribierte mRNA eingebaut. Durch die reaktive Dreifachbindung wurden die RNAs zugänglich für die Umsetzung mit Biotin-Azid in einer Cu(I)-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (*copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*, CuAAC). Diese RNAs konnten anschließend über Streptavidin-Biotin-Interaktionen auf entsprechenden *Beads* immobilisiert werden.^[89] Brawerman *et al.* haben im Jahr 1972 die Möglichkeit beschrieben, Poly(A)-haltige mRNAs auf Nitrocellulose zu immobilisieren, wobei zunächst eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt werden und die Immobilisierung dann in Gegenwart hoher Ionenstärke erfolgen musste.^[90]

Die heutzutage gebräuchlichste Methode zur Isolierung von mRNA wurde schon in den 1960er Jahren beschrieben. Sie beruht auf der Hybridisierung des Poly(A)-Schwanzes mit einem immobilisierten, komplementären Desoxynukleotidstrang und wurde durch Edmonds und Caramela zur Isolierung AMP-reicher Polynukleotide aus Aszites-Zellen mittels oligo(dT)-Cellulose entwickelt.^[91] Diese Methode wurde dann unter anderem auch durch Aviv und Leder genutzt um *globin*-mRNA aus Blutzellen zu isolieren.^[92]

Die Isolierung mittels des Poly(A)-Schwanzes konnte durch Jacobsen *et al.* weiter verbessert werden.^[93] Sie nutzten die höhere Stabilität der Hybride aus RNA und einem LNA (*locked*

nucleic acid)-modifizierten Fängeroligonukleotid, welches ethylenverbrückte Ribosen enthält. Durch Verwendung dieses modifizierten Oligonukleotids konnten sie eine bis zu 50-fach höhere Ausbeute isolierter mRNA erhalten.^[93]

Heute wird die Isolierung von mRNA aus Total-RNA mittels Hybridisierung an oligo(dT)-*Beads* routinemäßig eingesetzt und diese sind in einer Vielzahl von Varianten, beispielsweise als magnetische, oder Cellulose-*Beads*, käuflich erwerbbar. Die Isolierung von mRNA aus Total-RNA erfolgt auch mit diesen *Beads* meist nach einem ähnlichen dreistufigen Protokoll, das schon 1972 von Avin und Leder beschrieben wurde.^[92] Nach Denaturierung der RNA erfolgt die Hybridisierung in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Ungebundene Moleküle werden durch Puffer mit geringer Salzkonzentrationen entfernt und anschließend mRNA mit Wasser eluiert.

Die isolierte mRNA wird beispielsweise genutzt, um Genexpressionslevel verschiedener Zellen zu analysieren und zu vergleichen,^[94] cDNA-Bibliotheken zu generieren^[95] oder subzellulär lokalisierte mRNAs zu identifizieren.^[47]

1.2.1.2 Isolierung von mRNA mithilfe der Kappe

Die Isolierung von mRNA mittels des Poly(A)-Schwanzes wird heute immer noch routinemäßig durchgeführt, obwohl mittlerweile auch einige Nachteile dieses Verfahrens beschrieben wurden. Zum einen ist die Isolierung von mRNAs, die nur einen kurzen Poly(A)-Schwanz aufweisen, ineffizient mittels oligo(dT)-*Beads* und diese Spezies gehen daher häufig nicht in die folgenden Analysen ein.^[96] Es wurde gezeigt, dass verschiedene mRNAs nur einen kurzen Poly(A)-Schwanz (20-40 Nukleotide) aufweisen, wodurch vermutlich die Translationsrate reguliert wird.^[96-98] Die Analyse eben dieser Transkripte könnte aber neue wichtige Erkenntnisse im Bereich der Genregulierung liefern. Zum anderen ist die Isolierungsstrategie mittels oligo(dT)-*Beads* ungünstig, wenn der Poly(A)-Schwanz charakterisiert werden soll, da hierdurch unter Umständen Interferenzen in der Analyse auftreten können (Gespräch mit Cornelia de Moor). Um diese Einschränkungen zu umgehen, kann eine mRNA-Isolierung auch über die Kappenstruktur erfolgen.

Eine mRNA-Isolierung mithilfe der m⁷G-Struktur ist grundsätzlich auch mittels Kappen-selektiver Antikörper möglich. Muhrad *et al.* beispielsweise setzten einen polyklonalen m⁷G-Antikörper ($K_D=20$ nM)^[99] in ihren Studien zur Charakterisierung des mRNA-Abbaumechanismus in Hefen ein.^[100] Lim und Maquat nutzten einen monoklonalen Trimethylguanosin-spezifischen Antikörper, welcher eine zwanzigfach geringere Affinität auch gegenüber der Cap 0-Struktur aufweist, zur Isolierung von mRNA.^[101]

Allerdings konnten sich diese Strategien bisher nicht für routinemäßige Anwendungen durchsetzen. Die Gründe hierfür könnten eine teilweise limitierte Verfügbarkeit polyklonaler Antikörper, eine geringe Affinität des monoklonalen Antikörpers gegenüber der Kappe^[102] oder auftretende Kreuzreaktivitäten sein.

Hagedorn *et al.* entwickelten daher eine Methode zur Isolierung eukaryotischer mRNAs, welche ebenfalls die m⁷G-Kappe nutzt. Hierzu entwickelten sie eine Strategie basierend auf einer Variante des Kappen-bindenden Proteins eIF4E, dessen Rekrutierung an die mRNA-Kappe *in vivo* die Translation initiiert. Eine solche Strategie wurde erstmals bereits 1995 durch Edery *et al.* beschrieben und als „CAPture“ bezeichnet. Hier wurde ein Fusionskonstrukt aus dem Wildtyp-Protein eIF4E mit Protein A konstruiert, welches auf IgG-Sepharose immobilisiert und zur Isolierung von mRNA aus Total-RNA genutzt werden konnte.^[102] Um die Effizienz der Isolierung zu verbessern, wurde dann durch die Gruppe um Hagedorn mittels eines Alaninscans verschiedene Varianten von eIF4E hergestellt und deren Affinitäten gegenüber der Kappe getestet. *In vitro*-Experimente unter Verwendung von m⁷GTP als Interaktionsmolekül zeigten, dass die Variante eIF4E_{K119A} einen K_D von weniger als 0,3 μ M aufweist und die Affinität im Vergleich zum Wildtyp-Protein ($K_D=1,2 \mu$ M) somit etwa vierfach erhöht ist.^[103] Ein Fusionskonstrukt der Variante K119A mit GST wurde auf Glutathion-Beads immobilisiert und genutzt um RNAs Kappen-spezifisch aus Total-RNA zu isolieren. Unter Versuchsbedingungen, die auch zur Isolierung von mRNA genutzt wurden, konnte dabei eine mehr als doppelt so hohe Affinität gegenüber einer *capped* RNA im Vergleich zum Wildtyp-Protein nachgewiesen werden ($K_D=0,15$ nM für GST-4E-WT vs. 0,06 nM für GST-4E_{K119A}).^[96] Weiterhin erhielten sie erste Hinweise, die die Vermutung bestätigten, dass eine Isolierung mittels des Poly(A)-Schwanzes ineffektiv sein könnte. Eine Isolierung von mRNA aus Total-RNA wurde vergleichend mit immobilisiertem eIF4E_{K119A} sowie oligo(dT)-Beads durchgeführt. Mittels Hybridisierung des Poly(A)-Schwanzes wurden 2,1 % mRNA bezogen auf die eingesetzte Menge Total-RNA erhalten, die Immobilisierung mittels des Kappen-bindenden Proteins lieferte hingegen 10,1 % mRNA. Außerdem ergab die Kappen-selektive Isolierung weniger Verunreinigung durch ribosomale RNA. Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass eine Kappen-selektive Isolierung besonders vorteilhaft ist, wenn mRNAs charakterisiert werden sollen, die beispielsweise in Prozesse der Zellantwort, des Ribosomenaufbaus bzw. der mRNA-Translation involviert sind oder zur Isolierung von Hefen-mRNA, da diese nur relativ kurze Poly(A)-Schwänze aufweisen.^[96]

Um diese Isolierungsmethode zu charakterisieren, wurden durch Hagedorn *et al.* weitere Studien durchgeführt. Hierfür wurde mRNA aus Hepatitis C-infizierten Leberzellen sowohl

mittels des Kappen-selektiven Ansatzes als auch mittels oligo(dT)-*Beads* isoliert.^[104] Es wurden 47 hochregulierte Transkripte im Vergleich zu nichtinfizierten Zellen nachgewiesen, wenn eIF4E_{K119A} zur Isolierung eingesetzt wurde. Die Immobilisierung über den Poly(A)-Schwanz zeigte in anschließenden Analysen, dass 37 mRNAs im Vergleich zu den Kontrollzellen hochreguliert waren. Eine Anzahl von 20 Transkripten konnte dabei in beiden Ansätzen nachgewiesen werden. Im Rückschluss bedeutet dies, dass durch die Kappen-selektive Isolierung 27 mRNAs erhalten wurden, die nicht über die Hybridisierung an oligo(dT)-*Beads* nachgewiesen werden konnten. Hierbei handelte es sich vor allem um Gene, die eine Rolle in der Immunantwort spielen.^[104] Nach der Aussage von Hagedorn *et al.* stellt die Isolierung mittels eIF4E somit eine sensitivere Möglichkeit zur Detektion unterschiedlich exprimierter Gene in Hepatitis C-infizierten Zellen im Vergleich zur routinemäßig eingesetzten Immobilisierung auf oligo(dT)-*Beads* dar.^[104,105]

Um ein umfassendes Bild des Transkriptoms einer Zelle oder eines Organismus zu erhalten, könnte eine ergänzende Anwendung beider Isolierungsstrategien sinnvoll sein.^[106] Weiterhin könnte die Isolierung mittels des Kappen-selektiven Proteins eIF4E die Methode der Wahl darstellen, wenn Auf- und Abbau des Poly(A)-Schwanzes charakterisiert werden soll, um etwaige Interferenzen von Isolierungsmethode und anschließender Analyse zu verhindern.

1.2.2 Methoden zur Visualisierung von mRNA und deren Anwendungen

1.2.2.1 Visualisierung von mRNA durch nicht-codierbare Reporter

Da die Visualisierung von mRNA in Zellen wichtige Hinweise über Expressionslevel und Regulierung des Gens liefern kann, wurde eine Vielzahl von Methoden entwickelt, um eine Markierung von mRNA *in vivo* zu ermöglichen. Eine Auswahl dieser Methoden, die auch im Folgenden beschrieben werden, ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

Die einfachste Möglichkeit RNA spezifisch nachzuweisen, besteht in der sogenannten *in situ hybridization* (ISH). Hierbei werden Zellen fixiert und permeabilisiert, bevor durch Zugabe eines markierten, komplementären Oligonukleotids die Detektion erfolgt. Ungebundene Sonden werden in mehreren Waschschritten entfernt, bevor ein Signal in den Bereichen beobachtet werden kann, in denen Hybridisierung mit der *Target*-RNA erfolgte. Lawrence und Singer charakterisierten mittels ISH-Experimenten die subzelluläre Lokalisation verschiedener mRNAs in Fibroblasten.^[39] Durch Hybridisierung einer radioaktiv markierten Poly(A)-Sonde konnten sie nachweisen, dass mRNAs homogen innerhalb der Zelle verteilt sind. Unter Verwendung spezifischer Sonden für die mRNAs von Actin, Vimentin und Tubulin konnten sie allerdings zeigen, dass die untersuchten mRNA-Spezies in

unterschiedlichen Bereichen lokalisiert sind. Mittels dieser Experimente wurde nachgewiesen, dass eine subzelluläre Lokalisation von mRNA in somatischen Zellen erfolgen kann.^[39] Auch können fluoreszenzmarkierte Sonden für die *in situ*-Hybridisierung eingesetzt werden, wobei diese Methode als FISH (*fluorescence in situ hybridization*) bezeichnet wird.

Neben der Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide an die Ziel-RNA, besteht auch die Möglichkeit nicht-natürliche Nukleotide während der Transkription in neu gebildete RNAs zu integrieren. Wansink *et al.* entwickelten 1993 eine Methode basierend auf Br-UTP mit dem Ziel, die Transkription räumlich zu definieren.^[107] Das Nukleotid-Analogon wurde dazu in T24-Zellen mikroinjiziert und nach Fixierung der Zellen mittels eines anti-BrdU Antikörpers nachgewiesen. Mithilfe dieser Methode konnten Warnink *et al.* zeigen, dass die Transkription in lokalisierten Bereichen des Nukleus abläuft und sich gebildete Transkripte innerhalb einer Stunde diffus im Nukleus verteilen.^[107]

Da Br-UTP aber nicht zellpermeabel ist,^[108] muss es aktiv in die Zellen eingebracht werden, was einen aufwändigen Arbeitsschritt darstellen kann. Um somit diese Methode basierend auf der Inkorporation modifizierter Nukleotide zu optimieren, wurden durch Jao und Salic^[108] sowie Qu *et al.*^[109] verschiedene alkinylierte Nukleotide für die Markierung eingesetzt. Diese konnten durch die RNA-Polymerasen erfolgreich in naszierende Transkripte eingebaut und nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen durch CuAAC nachgewiesen werden.^[108,109]

Der Nachweis von Nukleinsäuren mittels dieser sogenannten chemo-enzymatischen Strategien wird in Kapitel 1.3.3 detaillierter beschrieben.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die beschriebenen Methoden, basierend auf *in situ*-Hybridisierung und Nachweis inkorporierter Nukleotid-Analoga relativ einfache Möglichkeiten zur Detektion von RNA in Zellen darstellen. Allerdings weisen diese Methoden auch Nachteile auf. So kann durch Einbau modifizierter Transkripte nur das gesamte Transkriptom und keine spezifische mRNA-Spezies charakterisiert werden. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Zellen vor der Analyse fixiert und permeabilisiert werden. Es lässt sich dabei nicht ausschließen, dass diese chemische Behandlung Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation der *Target*-RNA hat und so zu falschen Messergebnissen führen kann,^[110] obwohl Lawrence und Singer betonen, ein optimiertes Protokoll entwickelt zu haben, welches diese Effekte minimieren soll^[39]. Weiterhin erlaubt die Detektion von RNA in fixierten Zellen nur Momentaufnahmen zellulärer Abläufe, eine direkte Beobachtung dynamischer Prozess ist hingegen nicht möglich.^[110]

Um ein umfassenderes Bild der dynamischen Prozesse zu erhalten und mögliche Fehllokalisationen durch die chemische Behandlung zu umgehen, wurden verschiedene

Verfahren zur Visualisierung spezifischer RNAs auf Basis nicht-codierbarer Reportermoleküle in lebenden Zellen entwickelt.

Nukleinsäure-bindende, zellpermeable Fluorophore stellen die einfachste Möglichkeit dar, um RNA *in vivo* zu detektieren. Knowles *et al.* setzten den zellpermeablen Farbstoff SYTO14 ein, um den Transport und die subzelluläre Lokalisierung von RNA in Neuronen zu untersuchen.^[58] Hierbei nutzen sie, dass die Quantenausbeute von SYTO14 bei Bindung an Nukleinsäuren zunimmt, wobei dieser Effekt bei Bindung an RNA bis zu dreimal größer ist als bei einer Interaktion mit DNA. Sie konnten mit dieser Methode zeigen, dass RNA-Granula in Neuronen vorliegen, die sich mit einer Geschwindigkeit von $0,1 \mu\text{m sec}^{-1}$ fortbewegen und dass diese Bewegung vermutlich Kinesin/Dynein-vermittelt ist.^[58] Ein großer Nachteil dieser Strategie ist allerdings, dass weder Spezies- noch Sequenzspezifität vorliegt und somit keine individuellen mRNAs, beispielsweise hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation oder Mobilität charakterisiert werden können.

Um eine Spezifität zu erreichen, können synthetisierte Oligonukleotide fluoreszenzmarkiert und in Zellen eingebracht werden. Es werden dann die Dynamiken dieser markierten Spezies anstelle der unmarkierten, endogenen RNA analysiert.

Ainger *et al.* beispielsweise stellten die mRNA des Myelin-basischen Proteins (MBP) durch Transkription her, modifizierten diese mit Fluorescein und injizierten sie in Oligodendrocyten.^[57] Hierdurch wurden erstmals dynamische Prozesse des mRNA-Transports *in vivo* charakterisiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass MBP-mRNA innerhalb von Minuten in Granula verpackt und anschließend in die peripheren Bereiche der Zelle transportiert wird.^[57] Glotzer *et al.* injizierten fluoreszenzmarkierte *oskar*-mRNAs in *Drosophila* Oozyten und konnten nachweisen, dass diese in bestimmten Entwicklungsstadien am Zellpol lokalisiert sind und dass der Transport dieser mRNA-Spezies in höheren Entwicklungsstufen Mikrotubuli-abhängig ist.^[111]

Allerdings könnte ein Problem dieser Methode darin liegen, dass exogen eingebrachte RNAs andere Transportwege nutzen als die endogen vorliegende Spezies.^[110] Parallel werden daher häufig FISH-Experimente durchgeführt, um zu verifizieren, dass endogene und eingebrachte RNAs dieselbe subzelluläre Lokalisation aufweisen. Um eine mögliche Fehllokalisation injizierter RNA ausschließen zu können, wurden aber auch weitere *in vivo*-Strategien entwickelt, die eine Visualisierung endogener RNA ermöglichen.

Politz *et al.* nutzen für ihre Studien zur mRNA-Lokalisation einen FIVH-Ansatz (*fluorescence in vivo hybridization*), welcher eine Hybridisierung komplementärer Sonden in lebenden Zellen ermöglicht.^[112] Hierfür wurden L6-Zellen (Muskelzellen) zwei Stunden lang mit den

entsprechenden fluoreszenzmarkierten Oligodesoxynukleotiden, wobei sowohl nichtmodifizierte, als auch Thiol-modifizierte Sonden verwendet wurden, inkubiert. Die Sonden wurden in dieser Zeit passiv durch die Zellen aufgenommen. Nach Permeabilisierung und Fixierung der Zellen konnten nicht nur Poly(A)-haltige RNAs sondern sequenzspezifisch auch *actin*-mRNAs nachgewiesen werden.^[112] Politz *et al.* konnten die FIVH noch weiterentwickeln und nicht nur die Hybridisierung sondern auch die Detektion erfolgreich *in vivo* durchführen.^[113] Hierzu wurden fluoreszierende Poly(A)-sowie Kontroll-Desoxynukleotidsonden passiv durch L6-Zellen aufgenommen. Die Diffusionsrate der Sonden wurde sowohl mittels FCS (*fluorescence correlation spectroscopy*) als auch FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) bestimmt. Hierzu wurden Zellen zunächst mit den entsprechenden Sonden, dann in Medium inkubiert und anschließend analysiert. Die Diffusionsraten der Kontrollsonden sowie eines Großteils der Poly(A)-Sonden lagen dabei im Bereich freier Diffusion ($4 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$). Allerdings konnte für 45 % der Poly(A)-Sonden eine Diffusionsrate von weniger als $1 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass diese hybridisiert an längere Poly(A)-haltige Moleküle vorlagen.^[113]

Prinzipiell können markierte Oligonukleotidsonden genutzt werden, um die Dynamiken von RNA *in vivo* zu untersuchen. Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass lineare nicht-modifizierte Oligonukleotide als Substrate für zelluläre Nukleasen fungieren können und ihre Lebensdauer somit begrenzt ist. Weiterhin kann die Qualität der Ergebnisse durch ein schlechtes Signal/Rausch-Verhältnis beeinträchtigt sein. Dieses Verhältnis ist abhängig von der Stabilität des gebildeten Hybrids und davon, ob die eingesetzten Sonden permanent, also auch in ungebundenem Zustand, fluoreszieren.

Um sowohl die Stabilität der Sonden *in vivo* als auch die Stabilität der Hybride zu verbessern wurden verschieden modifizierte Oligonukleotide für die FIVH-Experimente eingesetzt. Die eingeführten Modifikationen betrafen dabei meist das Zucker-Phosphatrückgrat. So wurden für die RNA-Detektion unter anderem 2'-O-methylierte RNAs, PNAs (*peptide nucleic acid*), welche ein Peptidrückgrat besitzen sowie LNAs, welche eine ethylenverbrückte Ribose enthalten, als Sonden entwickelt. Allerdings wurden bisher nur selten PNA-Sonden für *in vivo*-Experimente zur Detektion von RNA genutzt,^[114] was auf die hohen Synthesekosten oder die Rigidität^[115] des Moleküls zurückzuführen sein könnte. LNAs hingegen wurden eingesetzt, um spezifische RNAs *in vivo* zu binden.^[116,117] Das Ziel dieser Studien ist allerdings meist nicht die Visualisierung, sondern die Degradation der Ziel-RNA mittels RNase H, was durch die Verwendung von LNAs als *antisense*-Oligonukleotide induziert

werden kann. Es soll deshalb hier nicht im Detail auf diese Gruppe von Sonden eingegangen werden.

Hingegen wurden 2'-O-methylierte Sonden in verschiedenen Studien erfolgreich zur RNA-Lokalisierung *in vivo* eingesetzt. Ein Vorteil dieser Sonden ist dabei, dass sie sehr schnell und mit hoher Affinität an die Zielsequenz binden,^[118,119] wodurch das Signal/Rausch-Verhältnis verbessert wird. Weiterhin sind diese Sonden auch resistenter gegen Degradation durch Nukleasen als unmodifizierte Oligonukleotide.^[120] 2'-O-methylierte Sonden konnten eingesetzt werden, um mit hoher Genauigkeit die Dynamiken Poly(A)-haltiger RNAs im Nukleus von U2OS-Zellen zu untersuchen.^[121] Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Poly(A)-haltige RNAs sowohl diffus verteilt sind, als auch in bestimmten Bereichen des Nukleus lokalisiert sind und hier teilweise auch stationär vorliegen. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass sich die kinetischen Parameter nukleärer RNAs in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation unterscheiden und dass die kinetische Daten weiterhin von der Art der verwendeten Sonde abhängen.^[121]

Obwohl nicht alle Arten modifizierter Sonden routinemäßig für die Visualisierung von RNA *in vivo* eingesetzt werden, ist ihnen dennoch gemeinsam, dass sie sehr stabile Hybride mit ihrer Ziel-RNA ausbilden. Für eine Anwendung in lebenden Zellen kann dies zu einem verbesserten Signal/Rausch-Verhältnis beitragen. Dennoch kann in den durchgeführten Experimenten ein relativ hoher Hintergrund durch ungebundene, ebenfalls fluoreszierende Sonden auftreten, wobei dies vor allem in den zitierten *in vivo*-Studien problematisch ist. Um hier weitere Verbesserungen zu erreichen, wurden verschiedene Strategien verfolgt. Es können beispielsweise sogenannte *caged*-Sonden eingesetzt werden, bei denen die Fluoreszenz zeitlich und räumlich induziert werden kann.

Politz *et al.* hatten in ihren Studien zur Diffusion Poly(A)-haltiger RNAs im Nukleus beschrieben, dass eine Vielzahl der detektierten Sonden eine Mobilität entsprechend der Diffusion in Wasser aufwiesen.^[113] Da die Sonden mit Fluorescein markiert waren, handelte es sich hierbei wahrscheinlich um ungebundene, aber dennoch fluoreszierende Sonden, die ebenfalls in die Messergebnisse eingegangen waren. Um dies zu vermeiden, setzten Politz *et al.* in einer weiteren Studie ein *caged*-Carboxyfluorescein zur Markierung ihrer Sonden ein.^[122] Als *caged*-Fluorophore werden häufig Nitrobenzol-modifizierte Moleküle genutzt, die durch die Derivatisierung in einer nicht-fluoreszierenden tautomeren Form vorliegen.^[123] Die Nitrobenzol-Modifikation kann dann zeitlich und räumlich regulierbar durch Photolyse^[124] entfernt und so ein fluoreszierendes Tautomer erhalten werden. In der Studie von Politz *et al.* wurden oligo(dT)-Sonden synthetisiert, welche mit Nitrobenzol-substituiertem

Carboxyfluorescein modifiziert waren.^[122] Für die Studien wurden L6-Zelle mit diesen Sonden inkubiert und Dynamiken Poly(A)-haltiger RNAs im Zellkern nach Photolyse (65 msec, 360 nm) untersucht. Hieraus konnte die Aussage erhalten werden, dass Poly(A)-haltige RNAs im Nukleus nicht aktiv transportiert werden, sondern sich durch Diffusion fortbewegen.^[122]

Der Vorteil bei Verwendung einer aktivierbaren Sonde liegt darin, dass nur Sonden in einem kleinen Volumen angeregt werden und somit fluoreszieren. Sonden, welche nicht hybridisiert sind, diffundieren schnell aus diesem Bereich und es können die Dynamiken der gebundenen Sonden ohne Hintergrundfluoreszenz charakterisiert werden.

Dem Prinzip der induzierten Fluoreszenz zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses folgen auch die sogenannten molekularen Leuchtfeuer (*Molecular Beacons*), die erstmals 1996 durch Tyagi und Kramer beschrieben wurden.^[125] Das Ziel war es, Nukleinsäuren sequenzspezifisch in Lösung nachweisen zu können ohne ungebundene Sonden entfernen zu müssen. Das Konzept nutzt eine durch Hybridisierung auftretende Konformationsänderung der Sonde, um Fluoreszenz zu induzieren. Dazu stellten Tyagi und Kramer ein Oligodesoxynukleotid her, das, neben der Sonden-Sequenz, welche revers komplementär zur Ziel-DNA war, zwei flankierende Bereiche, die Stamm-Sequenzen, enthielt. Diese flankierenden Abschnitte konnten miteinander hybridisieren, wodurch die Sonde eine Haarnadelstruktur ausbildete. An die Termini der flankierenden Sequenzen waren ein Fluorophor und ein *Quencher* gebunden, die durch Bildung der Sekundärstruktur in räumliche Nähe gebracht wurden, so dass keine Fluoreszenz emittiert wurde. Bei Bindung an die Ziel-Sequenz, öffnete sich die Struktur und ein Fluoreszenzsignal wurde detektierbar. Tyagi und Kramer bezeichneten diese neue Form einer einzelsträngigen Sonde als *Molecular Beacon* und charakterisierten diese *in vitro* hinsichtlich des Einflusses der Stamm-Sequenz sowie der Temperatur und Ionen auf die Hybridisierung. Sie konnten diese Sonden auch nutzen, um die Amplifikation einer PCR zu verfolgen. Hierdurch wurde bewiesen, dass ihr Konzept geeignet ist, Nukleinsäuren sequenzspezifisch in Lösung zu detektieren. Auch erkannten sie schon das mögliche Potential der *Molecular Beacons* hinsichtlich der Anwendung in lebenden Zellen.^[125]

Matsuo zeigte im Jahr 1998, dass mittels eines *Molecular Beacons* auch *in vivo* eine Fluoreszenz sequenzspezifisch induziert werden kann.^[126] Dazu wurde eine Sonde zur Detektion der *FGF*-mRNA (*basic fibroblast growth factor*-mRNA) hergestellt und hiermit trabekuläre Zellen transfiziert. Eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz konnte dabei nur für

die *antisense*-Sonde und nicht in der Negativkontrolle beobachtet werden, was das Potential der *Molecular Beacons* zur mRNA-Detektion *in vivo* verdeutlicht.^[126]

Cui *et al.* konnten mittels eines *Molecular Beacons* die Dynamik der Polivirus-RNA in infizierten Vero-Zellen in Echtzeit untersuchen und zeigen, dass einige Moleküle frei diffundieren, wohingegen ein anderer Teil anscheinend immobilisiert vorliegt.^[127]

Wie bei Matsuo wurde auch bei Cui *et al.* ein unmodifiziertes Oligodesoxynukleotid als Sonde eingesetzt, wodurch die Analysenzeit auf eine Stunde beschränkt war. Hierdurch wurde verhindert, dass Fluoreszenz durch Nukleasen-bedingten Abbau der Sonde auftrat.^[126,127]

Um eine stabilere Sonde zu erhalten, wurde, nach dem Beispiel linearer Sonden, ein 2'-O-methylierter *Molecular Beacon* zur Detektion der Lokalisierung von *oscar*-mRNA in *Drosophila* Oozyten genutzt. Allerdings wurde hier ein hohes Hintergrundsignal beobachtet, so dass aussagekräftige Ergebnisse nur durch Einsatz spezieller Auswertungsstrategien beziehungsweise durch Nutzung eines FRET-Paares erhalten werden konnten.^[128]

Auch zur Lokalisierung von β -actin-mRNA *in vivo* wurde ein 2'-O-methylierter *Molecular Beacon* synthetisiert.^[129] Dabei konnte zunächst beobachtet werden, dass ein Großteil der Sonden, ähnlich zu *antisense*-Oligonukleotiden, innerhalb von zwei Minuten im Zellkern lokalisiert und somit nicht mehr für die Detektion cytoplasmatischer RNA zugänglich war. Der *Molecular Beacon* wurde mit Streptavidin fusioniert, um die Ziel-mRNA im Cytoplasma visualisieren zu können. Allerdings konnte auch hiermit nur eine 2,5-fache Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet werden.^[129] Der eigentliche Vorteil der *Molecular Beacons*, ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis zu erzeugen, konnte mit den modifizierten Konstrukten nicht erreicht werden. Ein Nachteil der 2'-O-methylierten *Molecular Beacons* scheint dabei zu sein, dass sie im Nukleus mit Nukleinsäure-bindenden Protein interagieren, was zu einer Konformationsänderung und damit zur Detektion eines Fluoreszenzsignals führt. Hierdurch kann unter Umständen kein besseres Signal/Rausch-Verhältnis im Vergleich zu modifizierten linearen Sonden erhalten werden.^[118] Dies lässt den Rückschluss zu, dass *Molecular Beacons* nur in unmodifizierter Form vorteilhafter zur Detektion *in vivo* im Vergleich zu vergleichbaren linearen Sonden sind.

Ein generell auftretendes Problem bei der Verwendung von Oligonukleotidsonden ist deren rapide Akkumulation im Zellkern, ein Phänomen, das auch schon für modifizierte *Molecular Beacons* beobachtet wurde^[118]. Daher wurde die Lokalisation verschiedener modifizierter *Molecular Beacons* innerhalb der Zelle in Abhängigkeit von der Einbringungsstrategie genauer untersucht. In der Studie von Chen *et al.* wurden die Lokalisation und das Auftreten falsch-positiver Signale von 2'-O-methylierten (2Me MBs) und 2'-O-Methylphosphothioat-

Molecular Beacons (2MePS MBs) in MEF/3T3-Zellen untersucht.^[130] Nach der Mikroinjektion fand eine schnelle Lokalisation beider Sonden im Nukleus statt, wobei die 2MePS MBs schon im Cytoplasma unspezifische Signale hervorriefen, welche aus der Öffnung von 5,7 % der Sonden resultierten. Auch die Mikroporation führte zu einer Lokalisation der Sonden im Zellkern, wobei im Falle der 2Me MBs die unspezifischen Signale noch höher waren als nach der Mikroinjektion. Durch Konjugation der Sonden mit NeutrAvidin wurde die Verweildauer im Cytoplasma erhöht, aber unspezifische Signale konnten auch weiterhin beobachtet werden.^[130]

Wie für andere Nukleotidsonden muss auch für *Molecular Beacons* beachtet werden, dass sowohl der Aufbau der Sonde als auch die Methode, mittels der die Sonde in Zellen eingebracht wird, Einfluss auf deren Lokalisation und Stabilität hat.

Dennoch können *Molecular Beacons* einen geeigneten Ansatz darstellen, um RNA-Dynamiken *in vivo* zu charakterisieren. Ein Vorteil dieser Sonden ist auch, dass verschiedene *Molecular Beacons*, welche unterschiedliche Reporter tragen, parallel eingesetzt werden können, um gleichzeitig verschiedene RNAs zu visualisieren.^[125] Nachteilig bei der Verwendung von *Molecular Beacons* zur Detektion ist allerdings, dass sowohl die Sonden als auch die Stamm-Sequenz des *Molecular Beacons* für jede Ziel-RNA optimiert werden muss. Trotz dieser Optimierungen wird immer wieder beobachtet, dass auch falsch positive Signale durch Degradation oder unspezifischer Bindung auftreten können.^[118,130] Die Degradation ist vor allem bei Verwendung unmodifizierter Konstrukte *in vivo* ein problematischer Parameter.

Um ein verbessertes Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten, können außerdem duale Sonden genutzt werden, deren Bindung an die Zielsequenz zur Ausbildung eines FRET-Paares (Förster-Resonanzenergietransfer) führt. FRET beschreibt den strahlungsfreien Transfer von Energie von einem Donor- auf ein Akzeptormolekül. Die hierfür eingesetzten Sonden sind dabei jeweils mit einem bestimmten Fluorophor modifiziert, wobei das Emissionsspektrum des einen Fluorophors mit dem Absorptionsspektrum des zweiten Fluorophors überlappt. Durch Bindung der Sonden an die gemeinsame Ziel-RNA werden die Fluorophore in räumliche Nähe gebracht. Der Donor wird durch Einstrahlung von Licht in einen elektronisch angeregten Zustand überführt. Bei Rückgang in den Grundzustand wird Energie strahlungsfrei auf den Akzeptor übertragen, der dadurch seinerseits in einen angeregten Zustand übergeht. Allerdings setzt dieser die aufgenommene Energie in Form von Licht bei Rückgang in den Grundzustand frei. Hierdurch wird ermöglicht, dass ein Fluorophor angeregt wird, aber die Emission bei der Wellenlänge des Akzeptors detektiert werden kann, wodurch ein Signal nur

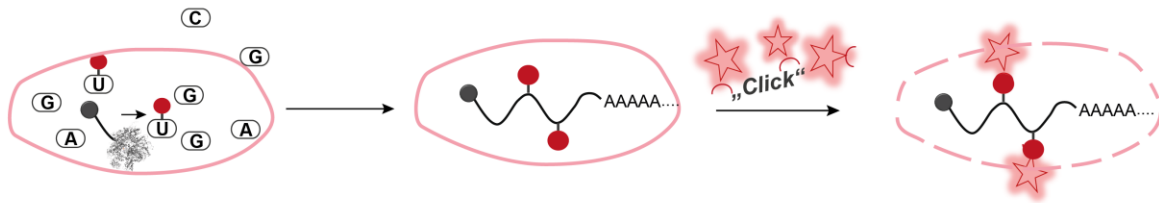
erhalten wird, wenn beide Fluorophore in einem Abstand von weniger als 10 nm^[114] angeordnet sind. Ein durch ungebundene Sonden hervorgerufenen Signal geht nicht in die Messung ein.

Als duale Sonden können sowohl lineare Oligonukleotide^[131] als auch *Molecular Beacons*^[128,132] eingesetzt werden. Santangelo *et al.* nutzen beispielsweise duale *Molecular Beacons* zur Detektion von *K-ras*- und *survivin*-mRNA in MIA-PaCa-2-Zellen. Mit dieser Methode konnten sie erfolgreich unterschiedliche Lokalisationsmuster der analysierten mRNAs *in vivo* visualisieren. Basierend auf ihren Ergebnissen stellten sie die Hypothese auf, dass durch eine solche Strategie der Nachweis endogener RNA, die in einer Kopienzahl von nur einigen hundert Molekülen vorliegt, *in vivo* möglich sein sollte. Weiterhin betonten Santangelo *et al.* den Vorteil dualer *Molecular Beacons*, ein geringeres Hintergrundsignal auf Grund der Fluoreszenzlöschung im ungebundenen Zustand im Vergleich zu linearen Sonden aufzuweisen.^[132] Allerdings können auch bei dieser Strategie durch Nuklease-vermittelten Abbau der Sonden oder durch direkte Anregung des Akzeptor-Fluorophors unspezifische Signale auftreten.

Neben der Möglichkeit das Signal/Rausch-Verhältnis durch Einsatz eines FRET-Paares zu verbessern, zeigte die Gruppe um Heckel, dass für dieses Ziel auch *caged-Molecular Beacons* eingesetzt werden können. Hierzu entwickelten sie verschiedene Strategie, die es ermöglichen die Fluoreszenz dieser Sonden zeit- und ortspezifisch zu induzieren.^[133,134] In einem Ansatz ist der *Molecular Beacon* mit zwei *Quenchern* versehen, wobei einer über einen photospaltbaren *Linker* mit dem Fluorophor verknüpft ist. Auch wenn diese Sonde an das Ziel-Oligonukleotid bindet, ist kein Fluoreszenzsignal detektierbar. Erst die photoinduzierte Spaltung des *Linkers* führt dazu, dass *in vivo* eine 170-fache Zunahme der Fluoreszenz im Vergleich zu einer nicht photoaktivierbaren Sonde zu beobachten ist.^[133] In einem weiteren Ansatz modifizierten Joshi *et al.* die Nukleobasen der *Loop*-Region eines *Molecular Beacons* mit photolabilen Gruppen. Erst wenn diese durch Einstrahlung von Licht entfernt wurden, konnte die Sonde an das Ziel-Oligonukleotid hybridisieren und ein Fluoreszenzsignal detektiert werden.^[134]

Auch sogenannte PNA-FIT-Sonden (*peptide nucleic acid-forced intercalation*-Sonden) ermöglichen ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis. Bei diesen Sonden fungiert ein interkalierendes Fluorophor, wie Thiazolorange oder Oxazolgelb,^[135] als Basen-Analogon.^[136] Bei Hybridisierung mit dem Ziel-Oligonukleotid wird durch *Stacking*-Interaktionen die Rotation des Fluorophors eingeschränkt, die Quantenausbeute dadurch erhöht und die Sonde detektierbar.^[137]

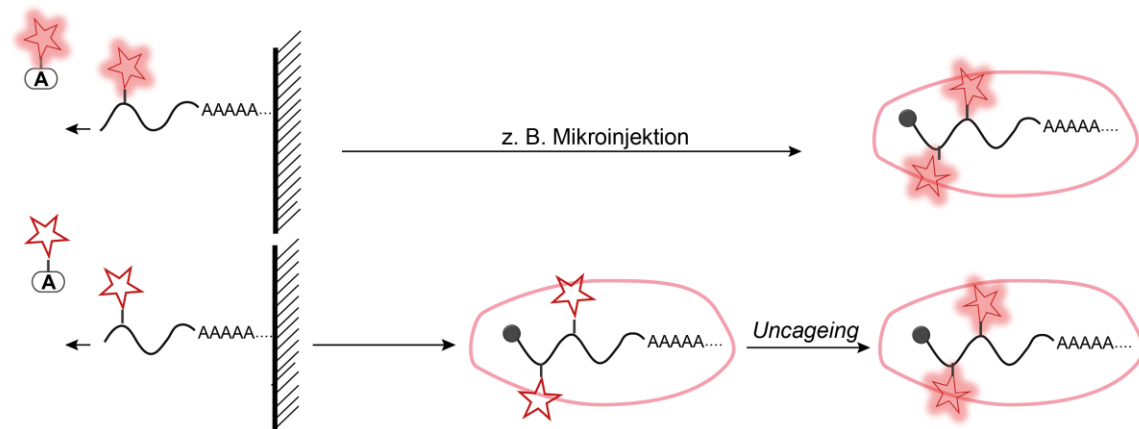
A) Einbau modifizierter Nukleotide



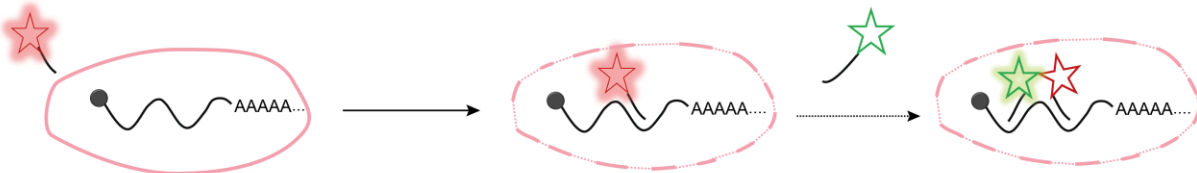
B) Nukleinsäure-bindende Fluorophore



C) Fluoreszenzmarkierte RNA



D) Lineare Oligonukleotidsonden



E) Molecular Beacons

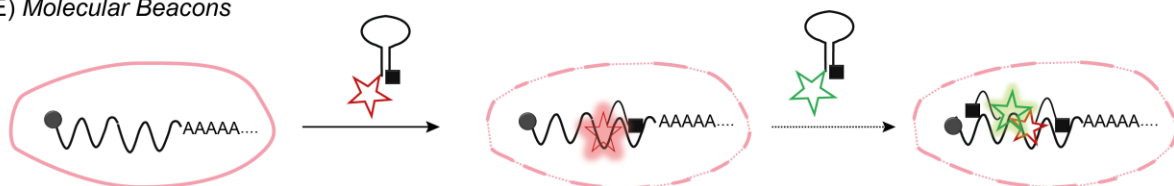


Abbildung 1.4 **Möglichkeiten zur Visualisierung von mRNA durch nicht-codierbare Reporter.** Nicht-codierbare Sonden können eingesetzt werden, um mRNA (schwarz) in lebenden (rosa) oder permeabilisierten (perforierte Umrandung) Zellen mittels Fluorophoren (Stern) zu visualisieren. **A)** Nachweis neu transkribierter RNA nach Einbau modifizierter Nukleotide durch RNA-Polymerasen (hier RNAPII, grau, PDB: 2E2I) und Fixierung der Zellen. **B)** Nukleinsäure-bindende, zellpermeable Fluorophore, deren Quantenausbeute bei Interaktion mit RNA zunimmt. **C)** Nachweis synthetisierter, fluoreszenzmarkierter mRNA in Zellen z. B. nach Mikroinjektion. Hierbei können auch *caged*-Fluorophore (C unten) für die Markierung eingesetzt werden. **D)** Nachweis durch FIVH. Lineare, fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide können an Ziel-mRNA hybridisieren. Eine Verbesserung des S/N-Verhältnisses kann durch Einsatz dualer Sonden und Messung eines FRET-Signals oder FIT-Sonden erreicht werden. **E)** Detektion spezifischer RNAs mittels *Molecular Beacons*. Ein Signal wird erst nach Bindung der Sonde an die Ziel-RNA detektiert und das S/N-Verhältnis im Vergleich zu der linearen Sonde verbessert. Die Verwendung zweier Sonden eröffnet die Möglichkeit der Messung eines FRET-Signals.

PNA-FIT-Sonden konnten erfolgreich eingesetzt werden, um parallel verschiedene H1N1-spezifische mRNAs in entsprechend infizierten MDCK-Zellen nachzuweisen. Die Sonden wurden durch temporäre Permeabilisierung der Zellmembran mittels Streptolysin O in die Zellen eingebracht.^[137] Die *in vivo*-Detektion beispielsweise durch Verwendung fluoreszierender RNA oder FIVH umgeht zwar Probleme, die durch Fixierung und Permeabilisierung der Zellen hervorgerufen werden, kann aber in anderen Punkten nachteilig sein. So ist es nicht auszuschließen, dass markierte eingebrachte RNAs andere Transportwege nutzen als endogene RNAs. Weiterhin ist auch das Einbringen von Nukleinsäuren in Zellen problematisch und erfordert unter Umständen aufwendige Methoden wie Mikroinjektion, wobei häufig beobachtet wird, dass diese Sonden schnell im Nukleus angereichert^[138] und Detektionen im Cytoplasma erschwert werden. Außerdem müssen die eingebrachten Nukleinsäuren optimalerweise chemisch modifiziert sein, um Stabilität *in vivo* zu gewährleisten und ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis zu erreichen.^[114] Die Anwendung codierbarer Reporter, beispielsweise auf Grundlage RNA-bindender Proteine, hingegen ermöglicht eine einfachere Markierung und Detektion von RNA *in vivo* und kann somit ebenfalls für die Charakterisierung von Dynamiken verwendet werden.

1.2.2.2 Visualisierung von mRNA durch genetisch-codierbare Reporter

Neben Möglichkeiten zur RNA-Detektion durch komplementäre Oligonukleotide, wurden in den letzten Jahren auch verschiedene Verfahren entwickelt, die eine Visualisierung beliebiger Ziel-RNAs durch genetisch-codierbare Reporter erlauben. Ein Vorteil solch genetisch-codierbarer Reporter liegt darin, dass für die Detektion keine Permeabilisierung der Zellen erfolgen muss. Es wurden verschiedene Methoden etabliert, die es ermöglichen ein Detektormolekül *in vivo* herzustellen, um spezifische mRNAs zu visualisieren. Einige hiervon sind in Abbildung 1.5 dargestellt.

Die Grundlage für eine solche Strategie stellt meist das grün-fluoreszierende Protein (GFP, *green fluorescing protein*) dar, welches zunächst als genetisch-codierbarer Fluorophor mit verschiedenen RNA-bindenden Proteinen fusioniert und so zur Detektion genutzt wurde.

Bereits im Jahr 1998 konnte eine solche Strategie erfolgreich eingesetzt werden, um *ASH1*-mRNA in Hefezellen zu visualisieren. Durch FISH-Experimenten war bereits bekannt, dass diese mRNA in der Knospungsspitze sich teilender Zellen lokalisiert ist und die 3'-UTR-Region essentiell für diese subzelluläre Lokalisation ist.^[139] Um die Prozesse zur asymmetrischen Bereitstellung dieser mRNA in Echtzeit verfolgen zu können und hierdurch Aussagen über Transportmechanismen zu erhalten, fusionierten Bertrand *et al.* GFP mit dem

MS2-coat-Protein. Dieses ist ein RNA-bindendes Protein, welches mit hoher Affinität eine im Phagengenom natürlich vorkommende Haarnadelstruktur, das MS2-Strukturmotiv bindet. Ein Plasmid codierend für das Fusionsprotein sowie ein Plasmid, welches für die Reporter-RNA mit sechs MS2-Strukturmotiven codierte, wurden in Hefezellen eingebracht. So konnten sowohl die Reporter-*ASH1*-mRNA, als auch der Detektor GFP-MS2 *in vivo* synthetisiert werden und eine multiple Bindung von GFP-Konstrukten pro RNA-Molekül erlaubte die Lokalisierung des GFP-Signals und damit der *ASH1*-mRNA. So konnte *in vivo* beobachtet werden, dass die *ASH1*-mRNA fusioniert mit den MS2-Strukturmotiven, in den Knospungsspitzen der Hefezellen lokalisiert war, wohingegen ein diffuses Signal erhalten wurde, wenn die 3'-UTR-Region der RNA fehlte. Die Dynamiken des Transports konnten durch diese Methode ebenfalls visualisiert werden. Hieraus ging hervor, dass *ASH1*-mRNA mittels eines Myosin V-Motors an Actin transportiert wird.^[40]

Das Potential dieser Methode wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass verschiedene Arbeitsgruppen diese Strategie adaptiert und erfolgreich zur Charakterisierung anderer Ziel-RNAs in unterschiedlichen Zelltypen eingesetzt haben. Forrest und Gavis beispielsweise nutzten dieses System, um den Transport von *nanos*-mRNA in *Drosophila* Oozyten zu visualisieren.^[54] Auch konnte das GFP-MS2-Fusionskonstrukt mit entsprechend modifizierten mRNAs eingesetzt werden, um den Einfluss der 3'-UTR auf den Transport verschiedener mRNAs in Cos7-Zellen^[140] sowie die Mobilität von *CaMKII α* -mRNA-Granula in hippocampalen Dendriten zu charakterisieren.^[141]

Daigle und Ellenberg nutzten ebenfalls die Bindung eines GFP-Fusionskonstrukts an ein spezifisches Sekundärstrukturelement der Ziel-RNA um diese *in vivo* zu visualisieren.^[142] Allerdings wurde hier zur Markierung der RNA das boxB-Motiv des Phagen λ , welches eine 15 nt-Haarnadelstruktur darstellt, genutzt und eine vierfache Wiederholung dieses Motivs war bereits ausreichend um RNA *in vivo* nachzuweisen. Als Reportermolekül wurden repetitiv vier boxB-bindende Peptide λ_{N22} , welche jeweils 22 Aminosäuren enthalten, angeordnet und mit drei eGFP (*enhanced GFP*) fusioniert. Unter Verwendung dieses Systems konnten Daigle und Ellenberg den nukleären Export verschiedener mRNAs beobachten.^[142] Das λ_N -GFP-System ermöglicht nicht nur die Visualisierung von RNA, die mit einer nicht-natürlichen Sequenz von nur etwa 80 nt modifiziert ist, sondern eröffnet, in Kombination mit dem GFP-MS2-System, auch die Möglichkeiten verschiedene RNAs *in vivo* parallel zu charakterisieren. Lange *et al.* nutzten die Kombination beider Systeme um den Transport verschiedener mRNAs in Hefen gleichzeitig zu visualisieren, um zu untersuchen, ob verschiedene subzellulär lokalisierte RNAs in den gleichen Granula transportiert werden können.^[59] Hierzu

wurden boxB-markierte *ASH1*-mRNA und MS2-markierte *IST2*-mRNA sowie als Reportermoleküle GFP- λ_N und RedStar-MS2 in Hefe exprimiert. Lange *et al.* konnten durch Anwendung alternierender Anregungswellenlängen sowohl rot als auch grün fluoreszierende Partikel während des Transports beobachten und hierbei eine Colokalisation beider fluoreszierender Proteine und damit beider mRNA-Spezies feststellen. Dies deutet darauf hin, dass verschiedene lokalisierte mRNA durchaus in gleichen RNPs transportiert werden können.^[59]

Das boxB- λ_N -System wurde unter anderem auch durch Feldbrügge *et al.* eingesetzt, um den Transport verschiedener mRNAs in dem Pilz *Ustilago maydis* zu visualisieren und den Einfluss der subzellulären mRNA-Lokalisation auf dessen Entwicklung zu charakterisieren.^[143]

Ein Nachteil des RNA-Nachweises mittels GFP-Fusionskonstrukten und künstlichen Bindemotiven in der Ziel-RNA liegt darin, dass die zu untersuchende RNA in den Zellen überexprimiert wird, was zu veränderten Transportwegen und somit zu einer fehlerhaften Lokalisation der Ziel-RNA führen kann.^[110,144] Weiterhin müssen die Bindemotive mehrfach (4-64x)^[142] in der mRNA vorliegen, um ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis zu erreichen. Im Falle des MS2-Systems bedeutet dies, dass bis zu 1 300 zusätzliche Nukleotide^[142] in die Sequenz eingebracht werden müssen und so deren native Struktur verändert werden kann, was ebenfalls eine Abweichung vom natürlichen Zustand darstellt.

Ein System basierend auf codierbaren Reportern könnte daher vorteilhafter sein, wenn ein RNA-bindendes Motiv zur Detektion genutzt wird, welches in der endogen exprimierten mRNA vorliegt.

So konnten Calapez *et al.* ein Fusionskonstrukt aus GFP mit dem Poly(A)-bindenden Protein II beziehungsweise TAP (*TIP-associated protein*; TIP, *tyrosine-kinase interacting protein*) nutzen, um Dynamiken Poly(A)-haltiger RNAs im Nukleus und während des nukleocytoplasmatischen Transports zu visualisieren. Durch Einsatz dieses codierbaren Reporters konnten sie nachweisen, dass die Mobilität der mRNPs im Zellkern energieabhängig ist.^[145]

Unabhängig davon, ob eine natürliche oder künstlich eingebrachte Domäne zur Bindung des GFP-Fusionskonstrukts genutzt wird, besteht ein weiterer Nachteil dieser Methode in der permanenten Fluoreszenz des GFP-Reporters, da hierdurch ein hohes Hintergrundsignal auftritt. Die Ziel-RNA kann daher nur detektiert werden, wenn hieran mehrere GFP-Fusionskonstrukte binden. Durch die Bindung einer Vielzahl hochmolekularer Reportermoleküle kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass natürliche Transportprozesse der Ziel-mRNA beeinflusst werden. Darüber hinaus wird meist ein NL-

Signal (NLS) in das Reporterprotein eingebracht, um das Hintergrundsignal weiter zu minimieren. Hierdurch könnte allerdings eine abweichende subzelluläre Lokalisation der Ziel-RNA herbeigeführt werden, da ein entsprechender mRNA-GFP-Komplex, nicht nur über die RNA-spezifischen Lokalisierungssignale, sondern auch über das NLS verfügt.^[144] Aus der permanenten Fluoreszenz des GFPs resultiert daher, dass zur Visualisierung hochmolekulare Detektorsysteme mit NLS eingesetzt werden müssen, wodurch die subzelluläre Lokalisation der Ziel-mRNA beeinflusst werden könnte.

Um dies zu umgehen, wurde die Methode codierbarer *split*-Fluorophore entwickelt, wodurch Fluoreszenzsignale angeschaltet werden können. Hierzu wurden N- und C-terminale Teile fluoreszierender Proteine wie GFP^[146] oder Venus^[147] jeweils mit einem RNA-bindenden Protein fusioniert. Wenn diese an eine gemeinsame Ziel-RNA binden und die Fragmente in räumliche Nähe gebracht werden, kann ein funktioneller Fluorophor rekonstituiert und Fluoreszenz beobachtet werden. Verschiedene Gruppen konnten eine solche Proteinkomplementierung unter Verwendung eines *split*-Fluorophors erfolgreich zur Detektion von RNA *in vivo* nutzen.^[146,148]

Valencia-Burton *et al.* setzten beispielsweise eine solche Strategie ein, um RNA in *E. coli* zu visualisieren. Hierzu wurde die jeweilige Ziel-RNA mit einem eIF4A-bindenden Aptamer fusioniert. Der Translationsinitiationsfaktor wurde in zwei Fragmenten, die jeweils mit einem Teil des eGFP fusioniert waren, produziert. Durch Bindung der eIF4A-Fragmente an das mit der Ziel-RNA fusionierte Aptamer konnte der eGFP-Fluorophor rekonstituiert und hierdurch die *Target*-RNA visualisiert werden. Durch diesen Komplementierungsansatz konnten unterschiedliche Lokalisationsmuster einer untranslatierten RNA, einer mRNA und der 5S-RNA in *E. coli* nachgewiesen werden.^[146]

Ozawa *et al.* konnten sogar eine Methode entwickeln, die nicht nur den Vorteil der rekonstituierbaren Fluoreszenz nutzt, sondern die auch den Nachweis endogener RNA ermöglicht.^[148] Hierzu fusionierten sie Fragmente des eGFP an zwei verschiedene Pumilio-Proteine. Pumilio ist ein RNA-bindendes Protein, das acht *Repeats* aufweist und eine Sequenz von acht Nukleotiden erkennt. Da der Erkennungscode von Pumilio bekannt ist,^[149] können durch Aminosäuresubstitutionen Varianten zur Erkennung beliebiger Sequenzen generiert werden. Ozawa *et al.* konnten zwei Pumilio-Varianten herstellen, die einen Sequenzabschnitt von 16 Nukleotiden in der mitochondrialen RNA, codierend für eine Untereinheit der NADH-Dehydrogenase, erkannten. Hierdurch konnten sie diese RNA sequenzspezifisch in Mitochondrien nachweisen und zeigen, dass diese in Bereichen mitochondrialer DNA

lokalisiert ist.^[148] Yoshimura *et al.* nutzten diese Strategie um β -actin-mRNA in Cos7-Zellen zu visualisieren.^[150]

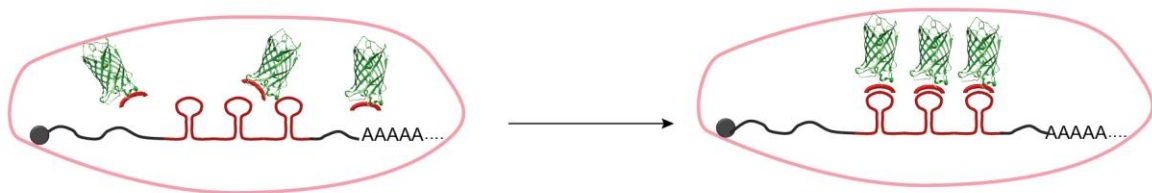
Eine Erweiterung dieses Proteinkomplementierungsansatzes wurde durch Waldo *et al.* erreicht, die ein *superfolder*-GFP in drei Fragmente separierten und bei Assemblierung dieser Fragmente eine Fluoreszenz beobachten konnten.^[151] Hierdurch sollte es ermöglicht werden, kleinere Fusionskonstrukte zu generieren, die besser löslich, weniger anfällig gegenüber einer Missfaltung und somit leichter produzierbar sein sollten. Dieses *split*-GFP-System konnte durch Kellermann *et al.* eingesetzt werden, um RNA sequenzspezifisch *in vitro* zu detektieren. Hierfür wurden entsprechende Pumilio-Varianten generiert, die mit je einem β -Faltblatt des GFP fusioniert wurden. In Anwesenheit der RNA sowie der Pumilio-Varianten und dem GFP-Fragment, welches die Faltblätter 1-9 umfasst, konnte ein funktioneller Fluorophor rekonstituiert und somit RNA nachgewiesen werden.^[152]

Die meisten Methoden, die genetisch-codierbare Reporter einsetzen, nutzen ein proteinbasiertes System mit GFP als Reportermolekül. Auch in der optimierten Strategie, welche die Detektion der Ziel-mRNA auf Basis natürlich vorkommender Bindemotive für *split*-GFP-Fusionskonstrukte ermöglicht, stellen die Reporterproteine immer noch hochmolekulare Verbindungen dar. Dies kann nachteilig sein, da diese *in vivo* unter Umständen agglomerieren^[59] oder Transportmechanismen der Ziel-mRNA^[144] beeinflussen können.

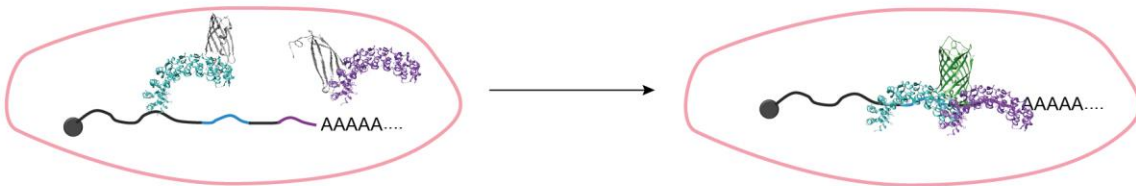
Paige *et al.* ist es hingegen gelungen einen codierbaren, Nukleinsäure-basierten Reporter zu entwickeln, der die Eigenschaften des GFP imitiert.^[153] Hierzu selektierten sie Aptamere, deren Bindung an verschiedene GFP-ähnliche Fluorophore zu einer Erhöhung deren Quantenausbeuten führte, so dass eine Aptamer-induzierte Fluoreszenz zu beobachten war. Einer dieser RNA-Fluorophor-Komplexe hatte, wie auch GFP, ein Emissionsmaximum im grünen Bereich des sichtbaren Lichtes, weshalb dieses Aptamer als *Spinach* bezeichnet wurde. Im Vergleich zu GFP ist der Komplex aber resistenter gegenüber *Photobleaching* und zeigt eine 20 % höhere Quantenausbeute als eGFP. Paige *et al.* war es möglich, die Funktionalität dieses Systems auch *in vivo* zu demonstrieren. Hierzu stellten sie ein Fusionskonstrukt der 5S-RNA mit dem *Spinach*-Aptamer her und transfizierten HEK-Zellen mit diesem. Nach Zugabe des Fluorophors konnte ein Fluoreszenzsignal entsprechend der bekannten Verteilung von 5S-RNA beobachtet werden.^[153] Der Vorteil dieses Ansatzes liegt darin, dass keine Sonden von außen in die Zelle eingebracht werden müssen und keine hochmolekulare Verbindung zur Detektion benötigt wird.

Generell verdeutlichen die gezeigten Methoden, dass die Detektion von mRNA durch die Nutzung codierbarer, anschaltbarer Fluorophore optimiert werden konnte und eine Visualisierung spezifischer mRNAs ohne vorherige Permeabilisierung der Zellen möglich ist. Dennoch weisen diese Methoden auch einige Nachteile auf. Hierzu zählt unter anderem die Notwendigkeit relativ große Moleküle für die Detektion nutzen zu müssen, wodurch Transporteigenschaften der Ziel-mRNA verändert werden können. Darüber hinaus ist es teilweise nötig Bindemotiven in die Ziel-mRNA zu integrieren, wodurch diese nicht mehr den natürlichen Zustand repräsentiert.

A) Protein-basierte Detektion spezifischer Sekundärstrukturen



B) Protein-basierte, sequenzspezifische Detektion



C) Aptamer-basierte Detektion

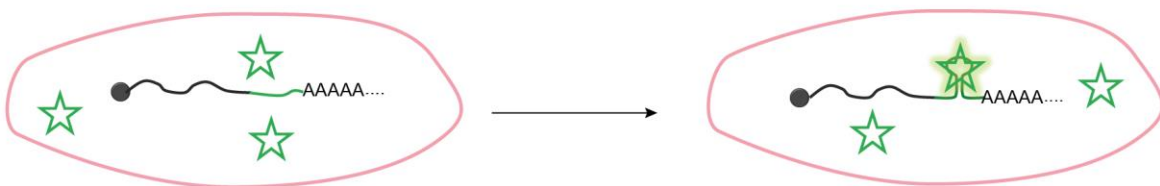


Abbildung 1.5 **Möglichkeiten zur Visualisierung von mRNA mittels codierbarer Reporter.** Codierbare Reporter können eingesetzt werden, um mRNA (schwarze Linie) in lebenden Zellen (rosa) nachzuweisen. **A)** GFP (PDB: 1GFL, grün) kann mit verschiedenen Proteinen (z. B. MS2, eIF4A, roter Halbkreis) fusioniert werden, welche spezifische RNA-Sekundärstrukturen erkennen. Die Ziel-RNA wird dazu als Fusionskonstrukt mit dem entsprechenden Bindemotiv (rote Haarnadelstrukturen) exprimiert. **B)** Fragmente des *split*-GFPs (grau) können mit RNA-bindenden Proteinen, z. B. Pumilio (PDB: 1M8W, lila und blau) fusioniert werden und die Fluoreszenz des GFP (grün) rekonstituiert werden, wenn beide Fusionskonstrukte an die Ziel-RNA binden (Bindedomäne farblich markiert). **C)** Die Fusion des *Spinach*-Aptamers (grün) mit einer Ziel-RNA ermöglicht eine Visualisierung ohne Einsatz von Proteinen. Die Bindung dieses Aptamers an bestimmte Fluorophore (Stern) erhöht deren Quantenausbeute und ermöglicht so die Detektion der Ziel-RNA.

Trotz der Vielzahl an Strategien zur Detektion von mRNA erfüllt keine dieser Methoden alle Anforderungen, um als „ideal“ für die Visualisierung von mRNA-Transportmechanismen bezeichnet zu werden. Eine solche ideale Visualisierungsstrategie müsste eine Vielzahl von Kriterien, wie (i) die Kompatibilität mit lebenden Zellen, (ii) die *in vivo*-Bereitstellung des Reporters, (iii) die Möglichkeit zur sequenzspezifischen Detektion endogener, nicht überexprimierter RNA mittels eines kleinen Reportermoleküls sowie (iv) die Möglichkeit zur Generierung anschaltbarer Fluoreszenzsignale, erfüllen.

1.3 Chemo-enzymatische Markierung von Biomolekülen

Seit den 1990er Jahren wurde eine Vielzahl von Methoden zur mRNA-Visualisierung basierend auf Oligodesoxynukleotiden und codierbaren Reportern entwickelt. Neben diesen Methoden wurden auch chemo-enzymatische Strategien zur Markierung verschiedener Biomoleküle wie Proteinen,^[154] tRNA^[155] und RNA^[156] etabliert und konnten teilweise sogar in lebenden Zellen durchgeführt werden.^[154,157] Chemo-enzymatische Strategien beruhen auf einem zweistufigen Prozess, der in Abbildung 1.6 schematisch dargestellt ist.

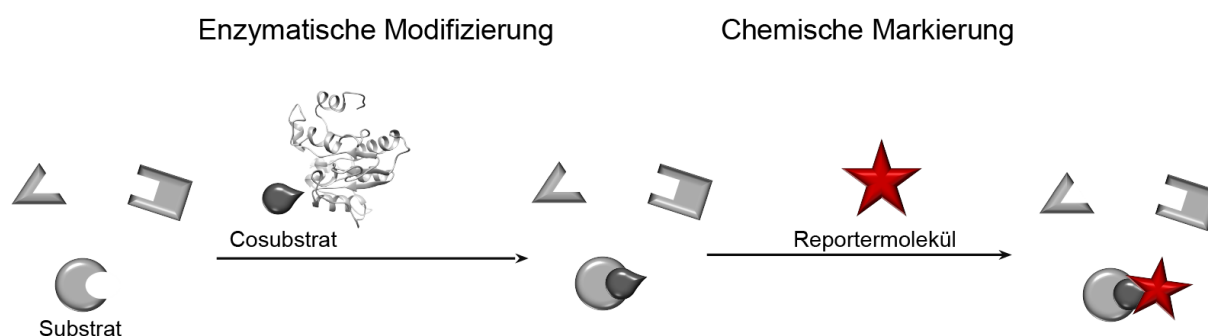


Abbildung 1.6 **Schematische Darstellung eines chemo-enzymatischen Ansatzes zur spezifischen Markierung von Biomolekülen.** In einem ersten Schritt wird das Zielmolekül durch Verwendung eines Enzyms (hier hTgs1, PDB: 3GDH) sowie eines geeigneten Cosubstrats spezifisch mit einer reaktiven Gruppe (dunkelgrau) modifiziert. Diese kann anschließend in einer Click-Reaktion mit einem Reportermolekül (Stern) kovalent verknüpft werden.

In einem ersten Schritt nutzt man das Potential von Enzymen spezifisch bestimmte Strukturen zu erkennen und zu modifizieren. Für diesen Schritt der spezifischen Markierung werden meist Methyltransferasen genutzt, die eigentlich einen Methyltransfer unter Verwendung von *S*-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet oder SAM) als Cosubstrat auf das Zielmolekül katalysieren. Häufig zeigen diese Enzyme aber promiskuitive Aktivität gegenüber AdoMet-Analoga, wodurch unter anderem der Transfer von Alkenyl- oder Alkinylfunktionalitäten ermöglicht wird. Auf diese Weise ist es möglich enzymatisch und somit in der Regel

spezifisch, eine reaktive Funktion in das Zielmolekül einzubringen. Die Alkenyl- oder Alkynylgruppe kann in einem zweiten Schritt chemisch modifiziert werden, wobei sich aufgrund ihrer Eigenschaften hierfür sogenannte Click-Reaktionen bewährt haben.

1.3.1 Click-Reaktionen – Definitionen und Möglichkeiten

Der Terminus „Click-Reaktion“ wurde 2001 durch Sharpless *et al.* eingeführt und definiert.^[158] Aus dieser Definition gehen verschiedene Kriterien hervor, die eine Reaktion erfüllen muss, um als Click-Reaktion bezeichnet zu werden. So müssen Click-Reaktionen modular aufgebaut sein, wobei die jeweiligen Edukte leicht erhältlich sein sollten, weiterhin sollte die Reaktion unabhängig von der Ansatzgröße hohe Ausbeuten liefern und stereospezifisch ablaufen. Die Reaktion sollte idealerweise in Gegenwart von Wasser und Sauerstoff durchführbar sein, wobei Wasser auch das präferierte Solvens für die Reaktion darstellt. Die Reinigung des Produkts sollte nicht chromatographisch erfolgen müssen und das isolierte Produkt muss unter physiologischen Bedingungen stabil sein. Sharpless *et al.* definierten, dass Reaktionen eine hohe thermodynamische Triebkraft von etwa 20 kcal/mol aufweisen müssten, um die Anforderungen einer Click-Reaktion zu erfüllen, da solche meist genügend schnell sowie mit hoher Selektivität ablaufen.^[158] Einige dieser Click-Reaktionen sollen hier kurz beschrieben werden und die zugehörigen Reaktionsschemata sind in Abbildung 1.7 gezeigt.

Das Paradebeispiel einer Click-Reaktion stellt die Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) dar, die im Jahr 2002 erstmals und nahezu zeitgleich durch Sharpless *et al.* sowie Meldal *et al.* beschrieben wurde.^[159,160] In der CuAAC wird bei Raumtemperatur ein Azid mit einem Alkin in Anwesenheit eines Cu(I)-Salzes zum stabilen 1,4-disubstituierten Triazolderivat umgesetzt.

Viele der typischen Eigenschaften einer Click-Reaktion, wie die spezifische Bildung des Produkts und dessen physiologische Stabilität sowie der Reaktionsablauf in Anwesenheit von Wasser und Sauerstoff sind kompatibel mit den Anforderungen zur Markierung von Biomolekülen. Daher ist dieser Reaktionsmechanismus prädestiniert für die Etablierung chemo-enzymatischer Markierungen.

Die Gruppe um Carolyn Bertozzi beschäftigt sich seit den 1990er Jahren mit der Möglichkeit Click-Reaktionen für die Markierung zellulärer Biomoleküle *in vivo* einsetzen zu können. Im Zuge dieser Arbeiten definierten und etablierten sie die Klasse der sogenannten bioorthogonalen Reaktionen. Diese stellen eine Erweiterung klassischer Click-Reaktionen dar und zeichnen sich dadurch aus, dass sie mit dem jeweiligen biologischen System weder

interagieren noch interferieren. Dies setzt voraus, dass kleine Reportergruppen eingebracht werden, die keine Störung des natürlichen Systems induzieren, aber dennoch spezifisch mit dem jeweiligen Reportermolekül zu einem biologisch stabilen Produkt reagieren. Dabei sollte die Reaktion auch bei geringen Eduktkonzentrationen sowie physiologischen pH-Wert und Temperatur ablaufen. Mit Hinblick auf die Markierung von Molekülen in lebenden Zellen dürfen bioorthogonale Reaktionen nicht toxisch sein.^[161]

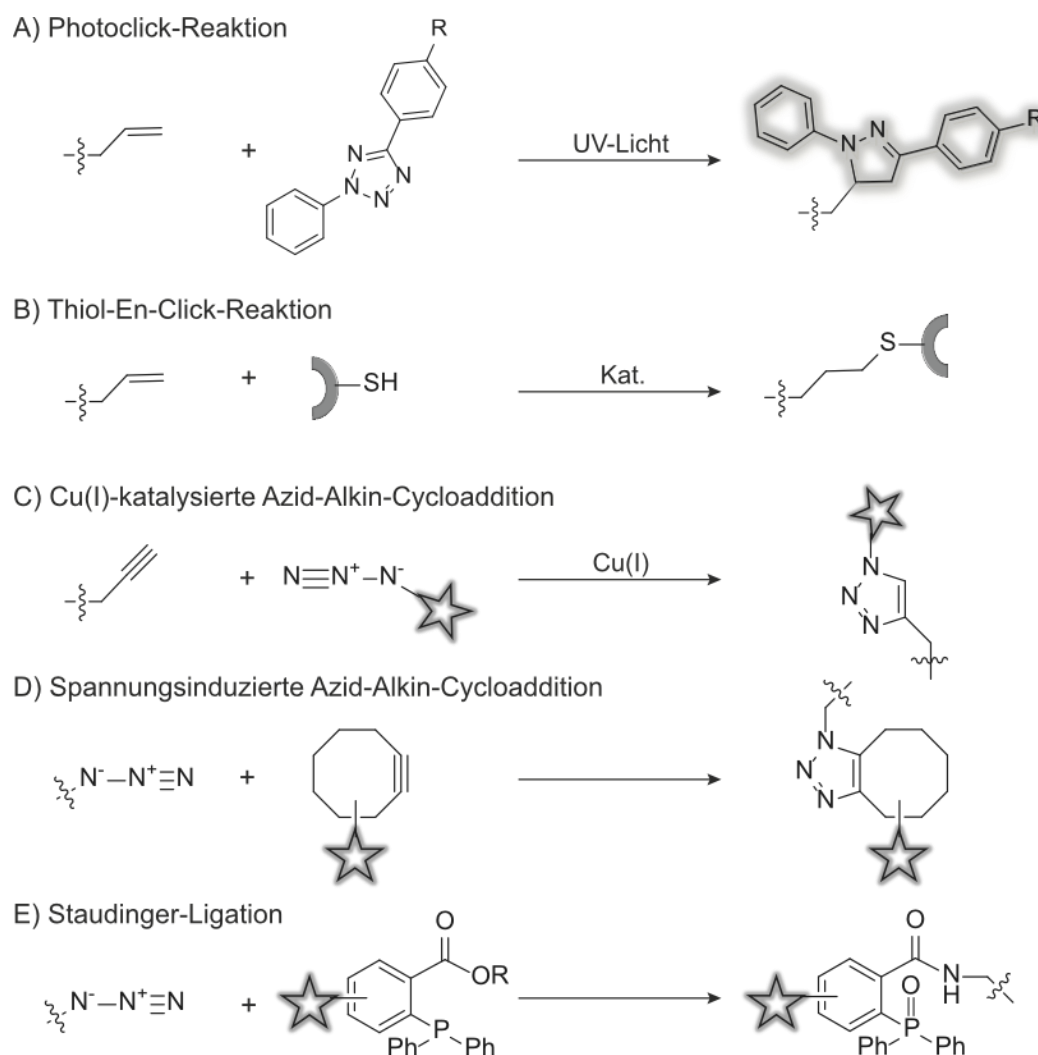


Abbildung 1.7 **Reaktionsschemata verschiedener Click-Reaktionen.** **A)** In der Photoclick-Reaktion wird durch Bestrahlung mit UV-Licht die Cycloreversion eines Tetrazols induziert und N_2 sowie ein Nitril-Imin gebildet. Dieses Intermediat reagiert mit einem terminalen Alken zum fluoreszierenden, 1,5-disubstituierten Pyrazolin. **B)** Die Thiol-En-Click-Reaktion beschreibt die nukleophile oder radikalische Addition eines Thiois an eine Doppelbindung. Hierdurch entsteht ein Thioether, der die kovalente Verknüpfung von Reportermolekül (Halbkreis) und Biomolekül darstellt. **C)** Die Cu(I)-katalysierte Cycloaddition eines Azids mit einem terminalen Alkin führt zur Bildung eines 1,4-disubstituierten Triazols. Hierdurch kann u. a. eine kovalente Verknüpfung von Zielmolekül und Fluorophor (Stern) erreicht werden. **D)** In der spannungsinduzierten Cycloaddition reagieren Azid und Cyclooctin zum Triazol. Hierfür wird kein Katalysator benötigt. **E)** In der Staudinger-Ligation reagiert ein Azid mit einem esterhaltigen Phosphan zu einem Aza-Ylid, welches durch intramolekulare Umlagerung ein stabiles Amid bildet.

Diese Charakteristika werden unter anderem durch die Staudinger-Ligation und die spannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) erfüllt. Beide Reaktionen nutzen ein Azid-Derivat als Reportergruppe. In der Staudinger Ligation reagiert dies mit einem esterhaltigen Phosphan zunächst zu einem Aza-Ylid, welches durch intramolekulare Umlagerung direkt mit der Esterfunktion zum stabilen Amid reagiert.^[162] In der SPAAC reagiert das Azid mit einem Cyclooctin zum Triazolderivat, wobei Energie durch Verlust der Ringspannung freigesetzt und die Reaktion so ohne die Verwendung eines Katalysators vorangetrieben wird.^[163,164] Die SPAAC wird daher auch als Cu-freie Click-Reaktion bezeichnet. Sowohl die Staudinger-Ligation, als auch die SPAAC konnten unter anderem durch Bertozzi *et al.* für die Markierung von Glykanen auf Zelloberflächen eingesetzt werden.^[162,165]

Durch den zweistufigen Aufbau chemo-enzymatischer Methoden können diese leicht zur Markierung verschiedenster Biomoleküle adaptiert werden und stellen so auch eine neue Möglichkeit zur Etablierung von Visualisierungsstrategien dar. Mit dem Ziel chemo-enzymatische Markierungen *in vivo* durchführen zu können, wurden zahlreiche Click-Reaktionen optimiert oder neu etabliert. Die detaillierteren Mechanismen der in dieser Arbeit genutzten Click-Reaktionen sowie einige ihrer Anwendungsbeispiele werden in den nächsten Kapiteln (1.3.1.1-1.3.1.2) genauer beschrieben.

1.3.1.1 Thiol-En-Click-Reaktion

Unter der Thiol-En-Click-Reaktion versteht man die Addition eines Thiolradikals an die Doppelbindung eines Alkens unter Bildung eines Thioethers. Die Radikalbildung kann durch einen thermisch^[166] beziehungsweise photochemisch^[167] induzierbaren Katalysator oder durch direkte Bestrahlung mit UV-Licht^[167] erfolgen.

Dieser Reaktionstypus wurde im Jahr 1905 durch Posner beschrieben, wobei die Reaktion hier noch ohne Einsatz eines Katalysators durchgeführt und die gewünschten Reaktionsprodukte nach einer meist einwöchigen Inkubation erhalten wurden.^[168]

Der Mechanismus der heute genutzten Thiol-En-Click-Reaktion besteht im Idealfall aus zwei alternierenden Schritten und wurde durch Morgan *et al.* vorgeschlagen.^[169] Nach Bildung eines Thiolradikals unter Verwendung eines geeigneten Katalysators erfolgt die Addition des Radikals an das terminale Kohlenstoffatom der Doppelbindung. Hierdurch bildet sich ein Kohlenstoff-zentriertes Radikal, welches in einem zweiten Schritt das Wasserstoffatom eines Thiols abstrahiert. Es werden ein stabiler Thioether sowie ein Thiolradikal gebildet, das in einen weiteren Reaktionscyclus eingehen kann.^[169,170] Die Thiol-En-Click-Reaktion kann

auch mit internen Alkenen ablaufen, wobei die Geschwindigkeit der Reaktion im Vergleich zu terminalen Alkenen drastisch reduziert ist.^[171] Kinetische Betrachtungen zeigten weiterhin, dass die Reaktionsgeschwindigkeit von der Elektronendichte der Doppelbindung sowie der Stabilität des Kohlenstoffradikals abhängt.^[172] Hoyle und Bowman kamen zu dem Schluss, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion in Abhängigkeit von der Stabilität der Reaktanden variieren kann. Bei Verwendung stabiler Alkene ist die Addition des Thiolradikals geschwindigkeitsbestimmend, während im Fall von stabilen Thiolen, die Abstraktion des Wasserstoffatoms den langsamsten Schritt darstellt.^[170]

Die Reaktion zählt unter anderem aufgrund ihrer guten Ausbeuten, der hohen Reaktionsgeschwindigkeit und der Kompatibilität mit Wasser und Sauerstoff^[170] nach der Definition von Sharpless zu den Click-Reaktionen und konnte erfolgreich *in vitro* zur Modifizierung von Polymerstrukturen^[173] oder auch des Biomoleküls BSA mit Glykopeptid-Antigenen^[174] eingesetzt werden. Hingegen gibt es bisher keine Beispiele, die eine erfolgreiche Anwendung in lebenden Zellen belegen, da es hierbei zu Wechselwirkungen mit zellulären funktionellen Gruppen, wie Thiolen in Proteinen und Glutathion kommen kann. Die Thiol-En-Click-Reaktion wird daher, anders als beispielsweise die Photoclick-Reaktion oder SPAAC, gemeinhin nicht zu den bioorthogonalen Click-Reaktionen gezählt.

Allerdings konnte 2011 durch Iwasaki und Matsuno eine Thiol-En-Click-Reaktion erfolgreich genutzt werden, um ein Alken-haltiges Mannosamin-Analogon, welches auf der Oberfläche von HeLa-Zellen präsentiert wurde, zu modifizieren.^[175] Das Saccharid-Analogon wurde von den Zellen zur Biosynthese von Zuckerstrukturen auf der Zelloberfläche genutzt und die auf der Zelloberfläche präsentierte Alkenylgruppen konnten mit PEG₄10K-SH in Gegenwart eines Photoinitiators sowie UV-Licht modifiziert werden.^[175]

Obwohl dieser Reaktionstypus im Kontext lebender Zellen eingesetzt wurde, kann man ihn dennoch nicht als bioorthogonal im engeren Sinne bezeichnen, da die Modifizierung auf der Zelloberfläche und somit in wässriger Lösung erfolgte. Die Kompatibilität der Reaktion mit intrazellulären Komponenten ist nicht belegt.

1.3.1.2 Photoclick-Reaktion

Zu den Click-Reaktionen, die bereits erfolgreich *in vivo* durchgeführt wurden, zählt die Photoclick-Reaktion, die durch die Gruppe um Lin zur Markierung von Proteinen etabliert wurde.^[176] Diese beruht auf der bioorthogonalen Umsetzung eines Alkens mit einem Tetrazol zum Pyrazolin. Wie andere heutzutage vielfach eingesetzte Click-Reaktionen ist auch dieser Reaktionstypus an sich nicht neu. Vielmehr wurde die Cycloaddition zwischen Alken und

Tetrazol erstmals im Jahr 1962 durch Huisgen *et al.* beschrieben und in den folgenden Jahren weiter charakterisiert, woraufhin auch ein Reaktionsmechanismus postuliert werden konnte.^[177,178] Zunächst wird, etwa durch Wärme oder auch Photolyse, eine Cycloreversion des phenylsubstituierten Tetrazols induziert. Dadurch bildet sich unter Abspaltung von Stickstoff ein reaktives, gewinkeltes^[179] Nitril-Imin-Intermediat, welches als Dipol eine konzertierte^[180] Cycloaddition mit dem vorliegenden Dipolarophil, also beispielsweise einem Alken oder Alkin eingehen kann. Als Produkt wird ein stabiles Pyrazolin erhalten.^[177,178] Die dominierende Molekülorbitalinteraktion im Übergangszustand tritt zwischen HOMO des Dipols und LUMO des Dipolarophils auf, wodurch bevorzugt das 1,5-disubstituierte Pyrazolin gebildet wird.^[181] Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 1.8 dargestellt. Generell kann die Reaktivität, wie auch bei anderen 1,3-dipolaren Cycloadditionen, durch Dipolarophile mit konjugierten Mehrfachbindungen gesteigert werden. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass auftretende Partialladungen während der Cycloaddition durch die konjugierte Mehrfachbindung stabilisiert werden, wodurch die Aktivierungsenergie gesenkt und die Reaktion trotz Verlust der Konjugationsenergie bevorzugt ablaufen kann.^[177] Weiterhin liegen in einem konjugierten System geringere Energiedifferenz zwischen den Grenzorbitalen des Dipolarophils vor, was ebenfalls zu einer Verringerung der Aktivierungsenergie und gegebenenfalls auch zu einer besseren Überlappung mit Grenzorbitalen des Dipols führen kann.

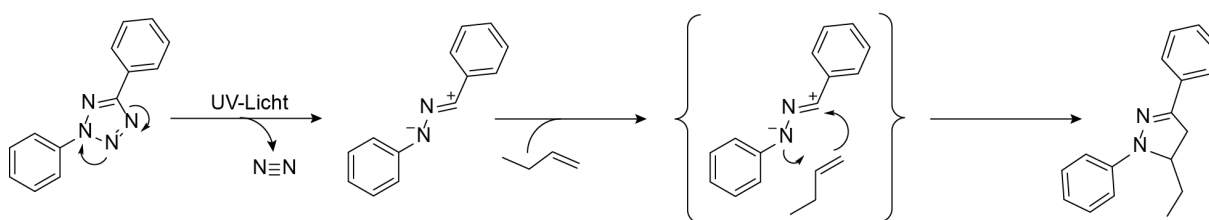


Abbildung 1.8 **Reaktionsmechanismus der Photoclick-Reaktion.** Durch UV-Licht wird die Cycloreversion eines Tetrazols induziert, wobei Stickstoff und ein reaktives Nitril-Imin-Intermediat gebildet werden. Dieses Intermediat reagiert in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition mit einem terminalen Alken zum Pyrazolin umgesetzt werden.

Die Gruppe um Lin erkannte das Potential der von Huisgen beschriebenen Reaktion als neue Möglichkeit, Biomoleküle *in vivo* zu markieren und entwickelte eine zellkompatible Photoclick-Reaktion, zur chemo-enzymatischen Modifizierung von Proteinen in lebenden Zellen.^[154,176,180,182]

Um eine Biokompatibilität der chemischen Markierung zu erreichen, wurden zunächst die Aktivierungsparameter des Tetrazols optimiert.^[180] Dazu sollte eine effiziente Generierung

des Nitril-Imins mittels Photolyse etabliert werden, da die Initiation der Reaktion durch Licht mit Hinblick auf eine Anwendung in lebenden Zellen vorteilhafter wäre als durch Wärme. In ersten Studien erreichten Wang *et al.* dabei quantitative Ausbeuten des Pyrazolins, wenn eine zweistündige Aktivierung von 5-(4-Methoxy)-2-phenyl-2*H*-tetrazol bei 302 nm mit einer handelsüblichen UV-Lampe in Gegenwart von Methylmethacrylat erfolgte. Der Umsatz der Reaktion war dabei nahezu unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel und konnte auch erfolgreich in wässrigem Ethanol durchgeführt werden. Die Cycloaddition erfolgte auch in Anwesenheit von Nitril- oder Aldehydgruppen spezifisch mit der CC-Doppelbindung. Sowohl mit einfachen, als auch konjugierten Systemen konnten die Umsätze gesteigert werden, wenn elektronenziehende Gruppen im Dipolarophil vorlagen. Reaktionen in Gegenwart elektronenreicher Alkene führten hingegen zur Bildung von Tetrazinen, also Nitril-Imin-Dimeren. Die Bildung des Pyrazolins konnte in diesen Fällen nicht beobachtet werden.^[180] Eine weitere Nebenreaktion, die bei Fehlen eines geeigneten Dipolarophils auftrat, war die Bildung eines Nitril-Imin-Wasser-Addukts.^[182,183] Die Ausbeute hing aber nicht nur von der Natur des Dipolarophils sondern auch vom verwendeten Tetrazol ab und war höher, wenn Tetrazole mit elektronen-schiebenden oder elektronen-neutralen Substituenten genutzt wurden.^[180]

Dies ging auch aus einer Studie von Wang *et al.* hervor, die ebenfalls vor dem Hintergrund durchgeführt wurde, Biokompatibilität der Photoclick-Reaktion zu erreichen.^[183] Hierbei wurde der Einfluss verschiedener *para*-substituierter Phenylreste auf die Energie des höchsten besetzten Orbitals des Nitril-Imin-Intermediats und damit auf die Kinetik der Cycloaddition untersucht.^[183] Es konnte eine 200-fache Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet werden, wenn die Phenylgruppe in *para*-Position eine Aminofunktion anstelle eines Protons aufwies.^[183] Dies bedeutet, dass bei Erhöhung der HOMO-Energie des Dipols eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet wurde. Diese Photoclick-Reaktion kann, wie auch Berechnungen zeigten, zu den Cycloadditionen vom Typ I gezählt werden, die sich durch eine geringe Energiedifferenz zwischen HOMO_{Dipol} zu LUMO_{Dipolarophil} auszeichnen.^[184]

Neben den Möglichkeiten zur Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit, weist die Photoclick-Reaktion weitere Eigenschaften auf, die Voraussetzungen für *in vivo* Anwendungen sind. Beispielsweise konnten Song *et al.* zeigen, dass die Photoclick-Reaktion kompatibel mit Proteinen ist und sich das reaktive Intermediat extrem schnell, mit einer Geschwindigkeitskonstante k_1 von $0,14 \text{ s}^{-1}$ bildet, wodurch eine zweiminütige Aktivierung bei 302 nm ausreichend wurde.^[182] Außerdem führte die Cycloaddition zur Bildung eines fluoreszierenden Produkts aus nicht fluoreszierenden Edukten, wodurch das Signal/Rausch-Verhältnis *in vivo* verbessert wird.^[182] Spätere Arbeiten von der Gruppe um Lin zeigten, dass

die etablierte Photoclick-Reaktion bioorthogonal ist, da bei der Durchführung in Zellen weder toxische Effekte noch Nebenreaktionen mit zellulären Komponenten zu beobachten waren.^[154,176] Ein weiterer Vorteil dieser Click-Reaktion ist, dass sie zu einem gewünschten Zeitpunkt an bestimmter Stelle initiiert ist. Die beschriebenen Merkmale prädestinieren diese optimierte Photoclick-Reaktion für Anwendungen *in vivo*.

Die Arbeiten der Gruppe um Lin haben somit die Möglichkeit eröffnet, eine altbekannte Cycloaddition für die Markierung von Biomolekülen in lebenden Zellen nutzen zu können.

1.3.1.3 Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition

Die Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition, die durch die Gruppen von Sharpless und Meldal nahezu zeitgleich entdeckt wurde, stellt eine Weiterentwicklung der Huisgen-Cycloaddition dar.^[159,160] Letztere wurde bereits in den 1960er Jahren durch Huisgen *et al.* beschrieben und umfasst die Reaktion eines Azids mit einem Alkin unter Bildung eines stabilen Triazols.^[185,186] Allerdings muss die Triazolbildung in der Huisgen-Cycloaddition meist bei höheren Temperaturen, etwa bei 55 °C, oder über einen Zeitraum von mehreren Tagen durchgeführt werden.^[185,186] In der katalysierten Variante von Sharpless *et al.* sowie Meldal *et al.* nutzt man hingegen Cu(I)-Ionen, um die hohe Aktivierungsenergie der Huisgen-Cycloaddition^[187,188] zu reduzieren. Als Cu(I)-Quelle können Cu(II)-Ionen dienen, welche in Lösung mittels Ascorbat reduziert werden oder es kann direkt ein Cu(I)-Salz zugesetzt werden. Durch den Einsatz von Cu(I)-Ionen als Katalysator wurde erreicht, dass die Reaktion von Azid und Alkin zum 1,4-disubstituierten Triazol bei milden Bedingungen (Raumtemperatur, wässrige Lösung) hinreichend schnell (um den Faktor 10^7 beschleunigt im Vergleich zur thermal aktivierten Huisgen-Cycloaddition^[187]) abläuft, was diese Reaktion zum Paradebeispiel der Click-Reaktionen macht. Die katalytische Wirkung der Cu(I)-Ionen in dieser Cycloaddition wurde im Jahr 2002 durch die Gruppen von Sharpless und Meldal unabhängig voneinander beschrieben, wobei Sharpless und Mitarbeiter auch einen potentiellen Mechanismus der Reaktion postulierten.^[159,160] Dieser ist in Abbildung 1.9A dargestellt. Die Grundlage für die Möglichkeit zur Katalyse bildet der saure Charakter des terminalen Alkins, welcher auf der sp-Hybridisierung des Kohlenstoffatoms beruht. Aufgrund des hohen s-Anteils dieses Orbitals sind die Elektronen dicht am Atomkern lokalisiert, so dass ein Proton leicht abstrahiert werden kann und sich zunächst ein Cu(I)-Acetylid bildet.^[159] Das Cu(I)-Ion wird dann auch durch das Azid koordiniert und beide Reaktionspartner kommen so in räumliche Nähe, woraufhin die Cycloaddition erfolgen kann. Hierbei addiert das Azid an das interne Kohlenstoffatom der Dreifachbindung, während das terminale Kohlenstoffatom

eine Bindung zum internen Stickstoffatom der Azidverbindung ausbildet, so dass ein 1,4-disubstituiertes Triazol gebildet wird.

Aufgrund kinetischer Analysen,^[189] Strukturdaten und thermodynamischer Kalkulationen^[190] ist dieser Mechanismus allerdings nicht unumstritten und die Katalyse könnte auch durch einen mehrkernigen Cu(I)-Komplex erfolgen, wie von Meldal und Tornøe 2008 zusammenfassend beschrieben wurde^[191] (Abbildung 1.9B). Auch hier wird die Reaktion durch Bildung des Cu(I)-Acetylids initiiert. Es bildet sich anschließend aber ein mehrkerniger Komplex in dem Azid und Alkin einen sechsatomigen Übergangszustand ausbilden, wodurch die reaktiven Atome in eine korrekte Anordnung für die Reaktion gebracht werden. Die Bildung eines Cu-haltigen sechsgliedrigen Metalloacyclus könnte der entscheidende Faktor für die beobachtete, hohe Reaktionsgeschwindigkeit der CuAAC im Vergleich zur unkatalysierten Huisgen-Cycloaddition darstellen. So haben DFT-Rechnungen gezeigt, dass im Falle der CuAAC eine Aktivierungsbarriere von $14,9 \text{ kcal mol}^{-1}$ für die Addition des Stickstoffatoms an C2 des Acetylids vorliegt, während dieser Schritt in der Huisgen-Cycloaddition eine Aktivierungsenergie von $25,7 \text{ kcal mol}^{-1}$ benötigt.^[187]

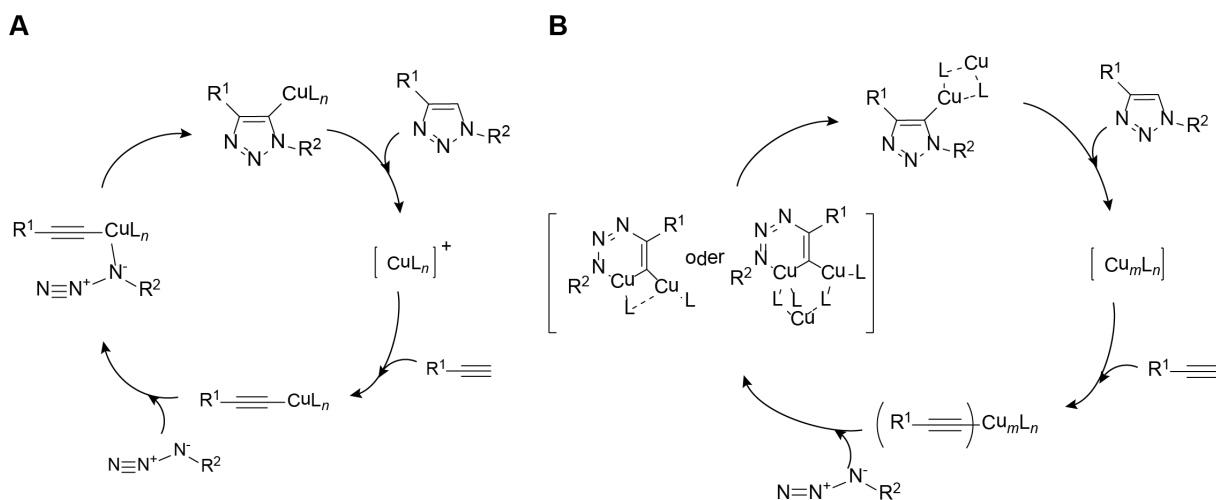


Abbildung 1.9 **Postulierte Mechanismen für die Cu(I)-katalysierten Cycloaddition (CuAAC) nach Rostovtsev et al.**^[159] **(A)** bzw. **Meldal und Tornøe**^[191] **(B)**. **A)** Der Kupferligand CuL_n aktiviert das Alkin in Form des Acetylids. In Gegenwart einer Azidverbindung kann sich ein einkerniger Cu-Komplex bilden, wodurch Alkin und Azid in räumliche Nähe gebracht werden. Es bildet sich ein Heterocyclus aus dem Triazol gebildet wird. **B)** Der von Meldal und Tornøe vorgeschlagene Mechanismus verläuft ebenfalls über Aktivierung des Alkins als Acetylid, allerdings bildet sich ein mehrkerniger Komplex. R^1 und R^2 stellen beliebige Reste dar.

Wie bei allen chemischen Reaktionen hängt die Reaktivität der CuAAC von den Energien sowie den Überlappungsintegralen der Grenzorbitale ab. In der Huisgen-Cycloaddition sind die Energiedifferenzen bei einer Cycloaddition zwischen $HOMO_{Azid}/LUMO_{Alkin}$ ähnlich wie bei der Reaktion zwischen $HOMO_{Alkin}/LUMO_{Azid}$. Es liegt somit eine Cycloaddition vom Typ

II vor, da keine der Grenzorbinale-Interaktionen bevorzugt ist. Hierdurch können beide Regioisomere des Triazols gebildet werden.^[192] In der CuAAC ist die Energie des LUMOs im Cu(I)-Acetylid vermutlich gesenkt, wodurch ein Reaktionsverlauf vom Typ I und damit die Bildung des 1,4-disubstituierten Triazols bevorzugt wird.

Die Cu(I)-katalysierte Cycloaddition weist alle Charakteristika einer Click-Reaktion auf, konnte aber bisher nicht erfolgreich zur chemischen Modifizierung *in vivo* angewendet werden und stellt somit keine bioorthogonale Click-Reaktion dar. Der Grund liegt darin, dass leicht eine Oxidation von Cu(I) zu Cu(II) stattfindet. Hierbei werden *in vivo* reaktive Sauerstoffspezies gebildet, die zu einer Schädigung der Biomoleküle führen^[193] und so die toxische Wirkung der CuAAC verantworten. Mittlerweile werden Cu(I)-stabilisierende Liganden eingesetzt, die zu einer Minimierung der Oxidation führen und so Biomoleküle vor Schädigung schützen. Dennoch sind auch diese nur geeignet für Markierungen *in vivo*, da auch die Komplexe selbst noch toxische Effekte in Zellen zeigen.^[194] Ein Grund hierfür könnte sein, dass sich der Aufbau des Kupferkomplexes *in vivo* ändert, wodurch das Redoxpotential und damit die Möglichkeit des Kupferions reaktive Spezies zu generieren verändert werden.

In vitro konnte durch Komplexierung der Cu(I)-Ionen die Markierung verschiedener Biomoleküle in einer CuAAC erreicht werden.^[155,195] In einem nächsten Schritt könnte eine Optimierung der Cu(I)-Komplexe hinsichtlich ihres Redoxpotentials und ihrer zellulären Aufnahme auch zur Etablierung einer bioorthogonalen CuAAC führen.

1.3.2 Chemo-enzymatische Modifizierung von Proteinen *in vitro* und *in vivo*

In den letzten Jahren wurden unterschiedliche chemo-enzymatische Strategien zur Markierung von Proteinen *in vitro* oder sogar *in vivo* beschrieben. Luo und Mitarbeiter^[196–198] sowie Weinhold und Mitarbeiter^[195,199] nutzten für die Modifizierung von Proteinen einen „klassischen“ chemo-enzymatischen Ansatz. Hierbei wird für die enzymatische Markierung eine Methyltransferase eingesetzt, die den Transfer einer reaktiven Gruppe auf das Ziel-Protein katalysiert. Die Gruppe um Lin nutzte hingegen eine Strategie basierend auf dem genetischen Einbau nicht-natürlicher Aminosäuren für die Proteinmarkierung.^[154,176,200]

Obwohl in diesem Fall die Markierung des Biomoleküls nicht enzymatisch, sondern über den Einbau nicht-natürlicher Aminosäuren während der Translation erfolgt, kann die Methode von Lin dennoch zu den chemo-enzymatischen Ansätzen gezählt werden. Denn für den Einbau modifizierter Aminosäuren in das naszierende Protein, muss zunächst eine enzymatische Beladung der entsprechenden nicht-natürlichen tRNA erfolgen. Daher sollen auch die

Ergebnisse dieser Studien hier kurz beschrieben werden. Insbesondere da die Gruppe um Lin für ihre Versuche die bioorthogonale Photoclick-Reaktion etablieren konnte, welche neue Möglichkeit zur Durchführung chemo-enzymatischer Strategien *in vivo* eröffnete. Diese Reaktion beschreibt die lichtinduzierte 1,3-dipolare Cycloaddition eines terminalen Alkens mit einem Tetrazol zum fluoreszierenden Pyrazolin (Kapitel 1.3.1.2) und konnte durch Song *et al.* im Jahr 2008 erstmals erfolgreich für die Markierung eines Proteins *in vivo* eingesetzt werden.^[176] Dabei nutzten sie die Möglichkeit *O*-Allyltyrosin mithilfe einer zusätzlichen tRNA sowie tRNA-Synthetase in ein spezifisches *E. coli*-Protein einzubauen. Die Zellen wurden anschließend mit einem Tetrazol inkubiert, vier Minuten bei 302 nm beleuchtet und nach einer Inkubation bei 4 °C mikroskopisch analysiert. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Zellen, welche das *O*-Allyltyrosin-Protein produzierten, eine Fluoreszenz zeigten, die bei Zellen, welche das Wildtyp-Protein enthielten, nicht auftrat.^[176] Song *et al.* erweiterten diesen Ansatz und konnten auch eine erfolgreiche Markierung eukaryotischer Proteine *in vivo* zeigen.^[154] Dabei wurden HeLa-Zellen in Homoallylglycin-haltigem Medium inkubiert. Diese nicht-natürliche Aminosäure konnte teilweise anstelle von Methionin in neu translatierte Proteine eingebaut werden. Nach der Photoclick-Reaktion konnte eine vierfach höhere Fluoreszenz in Zellen, welche Homoallylglycin enthielten, im Vergleich zu Kontrollzellen beobachtet werden.^[154] So konnten mittels der Photoclick-Reaktion erfolgreich spezifische Proteine in prokaryotischen sowie neu translatierte Proteine in eukaryotischen Zellen visualisiert werden. Die Gruppe um Lin entwickelte noch eine weitere Methode zur photoinduzierten Markierung von Proteinen. Dazu wurde eine Cyclopropen-haltige Aminosäure ortsgerichtet in pro- und eukaryotische Proteine mittels einer Variante der Pyrrolslyl/tRNA-Synthetase sowie der entsprechenden tRNA_{CUA} eingebaut. Nach der Bestrahlung mit UV-Licht in Anwesenheit von Tetrazol zeigten die so behandelten HEK293-Zellen eine höhere Fluoreszenz als die entsprechenden Kontrollzellen. Die Cycloaddition unter Verwendung der Cyclopropen-haltige Aminosäuren war dabei 60-fach schneller als die vergleichbare Reaktion mit der Aminosäure *O*-Allyltyrosin, welche ein terminales Alken als reaktive Gruppe aufweist.^[200]

Peters *et al.* entwickelten einen „klassischen“ chemo-enzymatischen Ansatz zur Modifizierung des Histons H3. Dazu nutzten sie die promiskuitive Aktivität der fungalen Protein-Methyltransferase Dim-5 sowie der humanen MLL-Methyltransferase gegenüber AdoEnYn (5'-[(*S*)(3*S*)-3-amino-3-carboxypropyl](*E*)pent-2-en-4-ynylsulfonio]-5'-desoxyadenosin) als Cosubstrat, um eine 2-Penten-4-ynylgruppe auf das Histon H3 zu übertragen. Das auf diese Weise markierte Protein konnte mittels CuAAC *in vitro* mit einem Azid-

tragenden Biotin modifiziert werden.^[195] Der enzymatische Transfer der relative großen Seitenkette ist für die meisten WT-Enzyme jedoch schwierig und erfolgt gar nicht oder nur in geringen Ausbeuten.^[196,197,201] Für den Nachweis promiskuitiver Aktivität ist es daher vorteilhafter AdoMet-Analoga einzusetzen, die den Transfer einer kurzen, modifizierbaren Gruppe ermöglichen. Dabei ist zu beachten, dass ein entsprechendes Analogon eine Doppelbindung in β -Position zum Schwefelatom aufweisen sollte. Es wird postuliert, dass diese AdoMet-Analoga eine Stabilisierung des Übergangszustands durch Delokalisierung erfahren und somit prädestiniert für die Untersuchung promiskuitiver Aktivitäten sind.^[201] Ein AdoMet-Analogon mit verkürzter Seitenkette im Vergleich zu AdoEnYn, welches dennoch für CuAAC genutzt werden könnte, war somit AdoYn (5'-[(S)-[(3S)-3-Amino-3-carboxypropyl]prop-2-ynylsulfonio]-5'-desoxyadenosin), welches auch durch Binda *et. al.* zur enzymatischen Markierung von Histon H3 eingesetzt werden konnte.^[202] Für andere Methyltransferasen konnte hingegen keine Aktivität gegenüber AdoYn nachgewiesen werden, was auf einen schnellen Abbau des Cosubstrats zurückgeführt wurde.^[196] Wie die Gruppe um Weinhold aber zeigte, wird AdoYn innerhalb von fünf Minuten hydratisiert und steht somit für die meisten Enzyme nicht über einen ausreichend langen Zeitraum zur Verfügung.^[199] Die Gruppe um Weinhold synthetisierte daher ein Selen-basiertes AdoMet-Analogon (SeAdoYn, 5'-[(Se)-[(3S)-3-Amino-3-carboxypropyl]prop-2-ynylseleno]-5'-desoxyadenosin), welches den effizienten Transfer einer Propinylgruppe erlauben sollte. Die Substitution des Schwefelatoms durch Selen erhöhte nicht nur die Stabilität des Analogons, sondern aktiviert auch die Alkylgruppe, wodurch der enzymatische Transfer erleichtert wird. Unter Verwendung von SeAdoYn konnten promiskuitive Aktivitäten für verschiedene humane und fungale Histon-spezifische Methyltransferasen nachgewiesen werden. Die entsprechend modifizierten Proteine konnten *in vitro* mittels CuAAC fluoreszenzmarkiert werden. SeAdoYn stellt daher aufgrund seiner Stabilität und der relativ kurzen Alkylkette ein vielversprechendes und möglicherweise breit anwendbares Cosubstrat in chemo-enzymatischen Ansätzen mit Methyltransferasen dar.^[199]

Auch die Gruppe um Luo entwickelte chemo-enzymatische Ansätze, um die Ziel-Proteine der Histonmethyltransferase G9a spezifisch zu modifizieren und anschließend chemisch markieren und so identifizieren zu können. Als Grundlage ihrer Strategie nutzten sie, dass nicht alle Enzyme eine promiskuitive Aktivität gegenüber sterisch anspruchsvollen AdoMet-Analoga zeigen.^[196,199] Durch die gezielte Verbesserung der G9a-Aktivität gegenüber eines entsprechenden Analogons, könnte eine spezifische Modifizierung der Substrate dieses Enzyms auch in Gegenwart anderer Proteinmethyltransferasen sowie des natürlichen

Cosubstrats AdoMet erreicht werden.^[196] In einem ersten Schritt generierten sie eine Variante des Enzyms, welche im Gegensatz zum Wildtyp-Enzym in der Lage war, AdoEnYn und Hey-SAM (5'-[(S)(3S)-3-Amino-3-carboxypropyl](E)-hex-2-en-5-ynylsulfonio]-5'-deoxyadenosin) als Cosubstrat zu akzeptieren. Hierdurch wurde eine spezifische Markierung des G9-Substrats erreicht, welches durch CuAAC weiter modifiziert und als Lysin 9 des Histons 3 identifiziert werden konnten.^[196] Mit der Variante der humanen Methyltransferase G9a gelang Luo *et al.* der Einbau nicht-natürlicher, click-modifizierbarer Reste in das Protein H3 unter Verwendung von AdoMet-Analoga *in vitro*. In einem nächsten Schritt sollte die Variante genutzt werden, um eine spezifische Proteinmodifizierung *in vivo* zu etablieren.

Um diesen chemo-enzymatischen Ansatz zur Markierung von Histonen auch in der Zelle zu ermöglichen, musste allerdings auch das AdoMet-Analogon in der Zelle hergestellt werden. Um dies zu erreichen, wurde eine Variante der S-Adenosylmethionin-Synthetase (SamSyn) entwickelt, die nach Zugabe entsprechender Aminosäuren die Synthese der benötigten AdoMet-Analoga Hey-SAM und Pob-SAM (5'-[(S)-[(3S)-3-Amino-3-carboxypropyl]4-propargyloxy-but-2-enylsulfonio]-5'-desoxyadenosin) *in vivo* erlaubt. HEK293T-Zellen, welche die G9a- sowie die SamSyn-Variante produzierten, wurden mit der Aminosäure S-(E)-Hex-2-en-5-ynyl-Homocystein inkubiert. Nach Zellaufnahme wurde aus der Aminosäure mit ATP zunächst Hey-SAM *in vivo* generiert und anschließend die Hex-2-en-5-ynylgruppe durch die Methyltransferase-Variante spezifisch auf das Histon H3 transferiert. Tatsächlich konnte das Histon H3 mittels CuAAC erfolgreich im Zelllysats markiert werden, was verdeutlicht, dass durch diesen Ansatz eine *Target*-spezifische enzymatische Modifizierung *in vivo* möglich ist.^[198] Eine zellulär einsetzbare Click-Reaktion, wie die Photoclick-Reaktion, könnte somit die Möglichkeit eröffnen, ausgehend von den Ergebnissen um Luo, den gesamten zweistufigen Prozess der chemo-enzymatischen Markierung für die Anwendung *in vivo* zugänglich zu machen.

1.3.3 Chemo-enzymatische Modifizierung von Nukleinsäuren *in vitro* und *in vivo*

In Kapitel 1.3.2 wurde erläutert, dass Proteine nach zwei Strategien mit einer click-reaktiven Gruppe markiert werden können. Diese kann entweder während der Synthese oder postsynthetisch, beispielsweise durch Methyltransferasen, eingefügt werden. Diese Konzepte bilden auch die Grundlage chemo-enzymatischer Strategien zur Markierung von Nukleinsäuren.

Die chemo-enzymatische Modifizierung mittels promiskuitiver Methyltransferasen und AdoMet-Analoga wurde vor allem durch Dalhoff *et al.* vorangetrieben, die im Jahr 2006

verschiedene Cosubstrate synthetisierten und in Transalkylierungsreaktionen mit DNA-Methyltransferasen einsetzten.^[201] Sie konnten AdoMet-Analoga mit einer Kettenlänge von bis zu vier Kohlenstoffatomen herstellen, reinigen und für Biokonversionen in Anwesenheit verschiedener DNA-Methyltransferasen sowie der entsprechenden Ziel-DNA einsetzen. Hierbei war auffällig, dass Cosubstrate, die eine Doppelbindung in β -Position zum Schwefelatom aufwiesen, im Vergleich zu Substraten mit kürzerer Alkanketten präferiert wurden. Auf diesen Beobachtungen beruht das Postulat, dass eine Stabilisierung des Übergangszustands durch Delokalisierung den Transfer sterisch anspruchsvoller Gruppen bevorzugt. Obwohl in dieser Studie keine Click-Reaktion der markierten DNA durchgeführt wurde, zeigte die Studie von Dalhoff *et al.* dennoch das grundsätzliche Konzept, Nukleinsäuren postsynthetisch unter Verwendung promiskuitiver Enzyme und geeigneter AdoMet-Analoga zu modifizieren.^[201]

Eine komplette chemo-enzymatische Modifizierung wurde im Folgejahr durch Lukinavičius *et al.* durchgeführt.^[203] Hier wurde zunächst ein Amino-funktionalisiertes Cosubstrat synthetisiert, welches anschließend den Transfer einer Aminogruppe durch die Methyltransferasen M.TaqI sowie durch eine Variante von M.HhaI auf die jeweilige DNA-Sequenz ermöglichte. Die markierte DNA konnte anschließend mit einem Cy5-NHS-Ester kovalent verknüpft werden.^[203]

Auch die Strategie der enzymatischen Modifizierung während der Synthese wurde für DNA erfolgreich realisiert. Gierlich *et al.* nutzten Polymerasen, um verschiedene Alkin-modifizierte Nukleotide in DNA einzubauen und diese anschließend mittels CuAAC zu markieren.^[204]

Neben verschiedener Verfahren zur Modifizierung von DNA, wurden auch chemo-enzymatische Strategien zur RNA-Markierung *in vitro* etabliert, die sich hinsichtlich verwendeter Enzyme und Click-Reaktionen unterscheiden. Schoch *et al.* nutzten beispielsweise eine inverse-Diels-Alder-Reaktion für die Modifizierung einer zuvor enzymatisch markierten RNA.^[205] Hierzu wurde die RNA durch T7-Transkription hergestellt und ein Norbornen-modifiziertes Guanosin als Initiator nukleotid eingesetzt. Die reaktive Gruppe wurde somit während der Synthese des Biomoleküls in dieses eingebaut und bildete dessen 5'-Ende. Diese modifizierte RNA konnte anschließend mit Biotin-Tetrazin in einer inversen-Diels-Alder-Reaktion umgesetzt werden.^[205] Dojahn *et al.* nutzten ebenfalls die Möglichkeit, ein modifiziertes Nukleotid mit Hilfe der T7-Polymerase in ein naszierendes Transkript einzubauen. Allerdings verwendeten sie ein Alkin-modifiziertes Initiator nukleotid, das die Transkripte für CuAAC zugänglich machte.^[206]

Die Strategie der enzymatischen Modifizierung am 5'-Ende während der Transkription wurde auch durch Paredes und Das gewählt. In dieser Studie wurde 5'-Azido-5'-desoxyguanosin als Initiator eingesetzt, so dass in einem zweiten Schritt eine Markierung der RNA mittels CuAAC erfolgen konnte.^[207] Allerdings zielte diese Studie weniger auf eine Verbesserung der enzymatischen, sondern vielmehr der chemischen Modifizierung ab, da die in der CuAAC verwendeten Cu(I)-Ionen normalerweise zu einer Degradation der RNA führen^[208]. Dies wird in den meisten Fällen durch Einsatz eines Cu-stabilisierenden Liganden wie THPTA oder TBTA verhindert. Paredes und Das zeigten in ihren Untersuchungen, dass die Verwendung von Acetonitril einen Liganden-ähnlichen Effekt auf die Kupferionen ausübt und ein 20 %iger Zusatz dieses Lösungsmittels die Durchführung der CuAAC ohne Degradation des Biomoleküls ermöglicht, zumindest wenn die Reaktion in sauerstofffreier Umgebung durchgeführt wird.^[207]

Die Transkription von RNA durch T7-Polymerase ermöglichte die Herstellung verschiedener 5'-modifizierter RNAs. Alternativ kann eine modifizierte Base auch ortsgerichtet während der Transkription in die naszierende RNA eingebaut werden. Dies konnte beispielsweise durch Ishizuka *et al.* gezeigt werden.^[209] Hierbei wurde ausgenutzt, dass die nicht-natürliche Base Pyrrol-2-carbaldehyd (Pa) komplementär zu 7-(2-Thienyl)-imidazo[4,5-b]pyridin, welche im DNA-Templat vorliegt, eingebaut wird. Ein Ethin-modifiziertes Analogon von Pa konnte so zur ortsgerichteten Markierung von RNA während der *in vitro*-Transkription eingesetzt werden. Durch die eingeführte Alkynylgruppe konnte im Anschluss eine Markierung des Biomoleküls durch CuAAC erfolgen.^[209]

Neben der enzymatischen Modifizierung von RNA während der Transkription gibt es in der Literatur auch einige Beispiele, in denen dieses Biomolekül postsynthetisch mittels Transferasen markiert werden konnte.

Winz *et al.* beispielsweise untersuchten verschiedene Nukleotidyltransferasen hinsichtlich ihrer Promiskuität gegenüber Azid-modifizierten Nukleotiden.^[210] Sie konnten zeigen, dass Nukleotidyltransferasen verschiedener Organismen in der Lage sind, 2'-Azid-modifizierte Nukleotide auf das 3'-Ende von RNA zu übertragen. Durch den Einbau der Azidogruppe, konnten die enzymatisch markierten RNAs in einem zweiten Schritt mittels CuAAC oder SPAAC unter Verwendung von terminalen Alkin- beziehungsweise Cyclooctin-tragenden Fluorophoren modifiziert werden. Die chemo-enzymatische Modifizierung mittels einer Nukleotidyltransferase und CuAAC wurde auch erfolgreich zur Fluoreszenzmarkierung von *E. coli* Total-RNA eingesetzt.^[210]

Dem Konzept postsynthetischer Modifikationen folgend, setzten mehrere Arbeitsgruppen promiskuitive Methyltransferasen ein, um reaktive Gruppen auf RNAs zu übertragen.^[155,156] Für diesen Ansatz nutzt man die Substratspezifität des Enzyms, um das Zielmolekül an einer bestimmten Position zu markieren. Die eingeführte Gruppe kann anschließend chemisch modifiziert werden. Motorin *et al.* konnten durch diese Strategie der postsynthetischen chemo-enzymatischen Modifizierung erfolgreich die ortsgerichtete Markierung von tRNA^{Phe} erreichen. Als *Target*-spezifisches Enzym nutzen sie Trm1, eine DNA/RNA-Methyltransferase, die *in vivo* den Transfer einer Methylgruppe auf Position N² des Guanosins 26 der tRNA katalysiert. Motorin *et al.* konnten zeigen, dass dieses Enzym *in vitro* eine Seitenaktivität gegenüber AdoEnYn als Cosubstrat aufweist. Durch den enzymatischen Transfer der reaktiven Alkynylgruppe und anschließender CuAAC konnte eine kovalente Verknüpfung von tRNA und Fluorophor erreicht werden.^[155] Wie auch der Ansatz von Winz *et al.* bietet die Strategie von Motorin *et al.* den Vorteil, dass RNA postsynthetisch mit relativ kleinen Gruppen modifiziert werden kann. Durch die Spezifität dieses Enzyms, kann der beschriebene Ansatz aber nicht genutzt werden, um andere RNAs – beispielsweise mRNAs – zu markieren, obwohl gerade die Untersuchung dieser Spezies *in vivo* neue Erkenntnisse im Bereich der Genregulierung liefern könnte.

Ein erster Schritt zur Markierung anderer RNA-Spezies wurde durch Tomkuvienė *et al.* gemacht.^[156] Sie verwendeten die Methyltransferaseaktivität eines Box C/D Ribonukleoproteins (Box C/D RNP). Bei dieser Methyltransferase wird die Position der Transalkylierung durch Hybridisierung der darin enthaltenen *guide*-RNA mit der Ziel-RNA bestimmt. Durch Reprogrammierung der *guide*-RNA konnten verschiedene Basen in tRNAs sowie in einer pre-mRNA modifiziert werden. Die hierzu genutzte und im RNP-Komplex vorliegende Box C/D Methyltransferase (aFib) ist eine 2'-O-Methyltransferase und zeigte promiskuitive Aktivität gegenüber SeAdoYn. Durch Zusammenspiel der *guide*-RNA und der promiskuitiven RNA-Methyltransferase wurde der ortsgerichtete Transfer einer reaktiven Propinylgruppe katalysiert. Die sequenzspezifisch modifizierten RNAs konnten anschließend durch CuAAC mit Fluorophoren kovalent verknüpft werden.^[156]

Die Strategie von Tomkuvienė *et al.* eröffnet die Möglichkeit, ein breites Spektrum von RNAs *in vitro* zu modifizieren. Allerdings dürfte die Komplexität des Systems einen Nachteil für *in vivo*-Anwendungen darstellen. Für die Markierung von RNAs in Zellen wird derzeit meist der Einbau modifizierter Nukleotide durch RNA-Polymerasen während der Transkription genutzt.

Jao und Salic zeigten mit einem solchen Ansatz im Jahr 2008, dass neu transkribierte RNA erfolgreich *in vivo* markiert und anschließend mittels CuAAC modifiziert werden kann.^[108] Hierfür wurden NIH3T3-Zellen mit Ethinyluridin inkubiert, welches durch die RNA-Polymerasen I-III bei der Transkription in RNAs eingebaut wurde. Die behandelten Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert, permeabilisiert und durch CuAAC eine Fluoreszenzmarkierung Alkin-haltiger RNAs erreicht. Hierdurch wurden Momentaufnahmen von RNA-Synthese und -*Turnover in vivo* erhalten.^[108]

Grammel *et al.* verfolgten eine ähnliche Strategie zur *in vivo*-Markierung von RNA, nutzten aber ein Propinyl-modifiziertes Adenosin-Analogon.^[89] Dieses wurde, wie auch Ethinyluridin, von allen RNA-Polymerasen in naszierende RNAs eingebaut. Darüber hinaus wurde Propinyl-Adenosin auch von Poly(A)-Polymerase in den Poly(A)-Schwanz von RNAs integriert. Die anschließende Markierung mittels CuAAC nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen ermöglichte die Untersuchungen der Poly(A)-Dynamiken *in vivo*.^[89]

Die Markierung von naszierender RNAs *in vivo* durch die Nukleosid-Analoga Ethinyluridin und *N*⁶-Propargyladenosin hatte vielversprechende Ergebnisse geliefert, die Dynamiken von RNA-Synthese und Abbau *in vivo* charakterisieren zu können. Qu *et al.* optimierten diese Strategie durch *Screening* verschiedener weiterer Nukleosid-Analoga hinsichtlich der Geschwindigkeit des Einbaus sowie der Sensitivität.^[109] Ethinylcytidin konnte ebenfalls zur spezifischen Markierung neu transkribierter RNAs durch CuAAC in unterschiedlichen Zelllinien genutzt werden. Qu *et al.* zeigten, gemäß ihrer Aussagen, dass Ethinylcytidin dabei im Vergleich zu Ethinyluridin eine höhere Einbaurrate sowie ähnliche Sensitivität nach Durchführung der CuAAC aufwies.^[109]

Chemo-enzymatische Modifizierungen bieten somit ein großes Repertoire an Möglichkeiten, um sowohl spezifische RNAs als auch sämtliche zellulären RNAs zu markieren. Dennoch müssen diese Strategien auch weiterhin optimiert werden, um hiermit eine allgemein verwendbare Methode zur Markierung von RNA in lebenden Zellen zu erhalten. Hierbei muss vor allem beachtet werden, dass auch die Click-Reaktion selbst zellkompatibel sein muss. Weiterhin sind Optimierungen notwendig, um spezifisch mRNAs zu markieren, da die Markierung dieser Spezies *in vivo* neue Erkenntnisse im Bereich Genexpression und Genregulation liefern könnte.

1.4 Trimethylguanosinsynthasen – neue Wege zur Markierung von mRNA?

Chemo-enzymatische Strategien konnten mittlerweile erfolgreich zur Markierung von DNA, tRNA, Glykanen und Proteinen *in vitro* und teilweise sogar *in vivo* eingesetzt werden. Dies unterstreicht das Potential dieses Ansatzes, neue Impulse für die Untersuchung von Biomolekülen bieten zu können. Denn chemo-enzymatische Modifizierungen erlauben eine spezifische, biokompatible Markierung des Zielmoleküls in komplexen und teilweise sogar zellulären Umgebungen. Durch den enzymatischen Transfer einer reaktiven Gruppe und anschließender chemischer Modifizierung, könnten neue Möglichkeiten eröffnet werden, unterschiedlichste endogene Biomoleküle in der lebenden Zelle zu markieren, ohne große, potentiell störende Reportermoleküle nutzen zu müssen. Bisher wurde diese Strategie allerdings noch nicht für die spezifische Modifizierung von mRNAs etabliert. Die Charakterisierung dieser Molekülklasse könnte aber neue Erkenntnisse über Mechanismen der Genregulation und deren Auswirkungen auf die zelluläre Entwicklung und die Entstehung von Krankheiten liefern. Dies wurde in Kapitel 1.1.4 anhand einiger Beispiele verdeutlicht. Sowohl Charakterisierungen zellulärer als auch isolierter mRNAs könnten Erkenntnisse hinsichtlich der Expressionslevel und der subzellulären Lokalisationen von mRNAs ermöglichen. Visualisierungsstrategien könnten darüber hinaus auch genutzt werden, um Dynamiken des mRNA-Transports zu untersuchen.

Um eine spezifische Markierung von mRNAs durch eine chemo-enzymatische Strategie zu erreichen, setzt die Verwendung mRNA-modifizierender Enzyme voraus. Die eingeführte Funktionalität muss die weitere chemische Modifizierung mit Reportermolekülen erlauben. Durch diesen modularen Aufbau könnte es möglich werden, mRNAs sowohl für die Visualisierung als auch Isolierung zugänglich zu machen.

Es ist sinnvoll für den Schlüsselschritt der enzymatischen Modifizierung ein charakteristisches Merkmal dieser Spezies, wie die Kappe, als Zielstruktur zu nutzen. Eine Möglichkeit hierzu bieten die sogenannten Trimethylguanosinsynthasen (Tgs), die den methylierten Guanosinrest der Kappe erkennen und spezifisch an Position N^2 hypermethylieren.^[211] Diese Enzyme stellen daher einen vielversprechenden Ausgangspunkt für die Etablierung eines chemo-enzymatischen Ansatzes zur Markierung eukaryotischer mRNA dar.

Allerdings ist die Kappe, wie alle der Merkmale der mRNA, kein ausschließliches Merkmal dieser Molekülklassen. So verfügen unter anderem auch snRNAs und snoRNAs über eine Kappe. Diese nicht-codierenden RNAs sind auch die natürlichen Substrate der

Trimethylguanosinsynthasen. Für potentielle *in vivo*-Anwendungen muss daher sorgfältig überprüft werden, ob eine spezifische Markierung der mRNAs erreicht werden kann. Der Einsatz rekombinanter Enzym-Konstrukte, denen Domänen, beispielsweise für die *in vivo*-Regulierung der Aktivität fehlen, könnte vorteilhaft sein, um Kontrollmechanismen des nativen Enzyms zu umgehen und hierdurch eine Modifizierung des nicht-natürlichen Substrats mRNA zu erreichen.

Hierfür ist es jedoch zunächst erforderlich, die Trimethylguanosinsynthasen hinsichtlich ihrer Funktionen und Regulierungen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu charakterisieren und zu verstehen.

1.4.1 Die humane Trimethylguanosinsynthase hTgs1

1.4.1.1 Funktionen der humanen Trimethylguanosinsynthase hTgs1 *in vivo*

Zhu *et al.* beschrieben 2001 ein Protein, das sie als PIMT (PRIP-interagierendes Protein mit Methyltransferase-Domäne; PRIP, *proliferator-activated receptor-interacting protein*) bezeichneten.^[212] Dieses Protein, welches einer humanen Leber-cDNA Bibliothek entstammte, hatten sie zuvor mittels eines *yeast-2-hybrid*-Systems als Interaktionspartner des *nuclear receptor coactivator peroxisome proliferator-activated receptor-(PPAR) interacting* Protein identifiziert. Sie konnten zunächst nachweisen, dass das entsprechende, codierende Gen einen Leserahmen von 2 556 Nukleotiden aufwies und für ein Protein mit 852 Aminosäuren, entsprechend einem Molekulargewicht von 96,5 kDa, codierte. Die erhaltene Sequenz gab erste Rückschlüsse auf eine potentielle Funktion des Proteins, da es charakteristische AdoMet-Bindemotive der Methyltransferasen im C-terminalen Bereich sowie ein Segment des K-Homologie-Motivs, welches charakteristisch für RNA-bindende Proteine ist, enthielt. Zhu *et al.* konnten auch experimentell eine Bindung von AdoMet sowie RNA an die entsprechenden Fragmente des Proteins nachweisen. Unabhängig von diesen Motiven, welche auf potentielle enzymatische Funktionen hindeuteten, zeigte die Gruppe, dass PIMT an der Aktivierung der Translation beteiligt sein könnte, wobei auch C-terminal trunkierte Fragmente, diesen Effekt zeigten. Außerdem konnten sie eine Colokalisation von PIMT mit PRIP im Nukleus von Cos1-Zellen sowie ein ubiquitäres Auftreten der PIMT-codierenden mRNA in allen untersuchten Geweben nachweisen.^[212]

Nur ein Jahr später identifizierten Mouaikel *et al.* in Hefe ein Enzym, welches die Hypermethylierung der Kappe von snRNAs und snoRNAs katalysierte und bezeichneten dies als Trimethylguanosinsynthase (yTgs1, *yeast Tgs1*). Das Fehlen dieses Enzyms war bemerkenswerterweise nur unterhalb einer Temperatur von 16 °C letal, was einen Kälte-

sensitiven Phenotyp darstellt. Auffällig war hier außerdem eine Sequenzidentität von 38 % des Enzyms mit dem C-terminalen Bereich des zuvor beschriebenen, humanen PIMT.^[213]

Diese Sequenzidentität war ein erster Hinweis, dass PIMT das analoge, humane Enzym der in Hefen charakterisierten Trimethylguanosinsynthase darstellt und PIMT somit für die Hypermethylierung der Kappe von snRNAs und snoRNAs im Menschen verantwortlich ist. Ein experimenteller Beweis hierfür wurde im Jahr 2006 durch Lemm *et al.* erbracht.^[214] In dieser Studie wurde der Einfluss verschiedener Proteine auf die Reifung von snRNPs und Integrität der *Cajal bodies* untersucht. Hierzu wurde auch das Level der PIMT/hTgs1 codierenden mRNA in HeLa Zellen durch RNA-Interferenz auf ein Level von 8 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen reduziert. Cytosolische Extrakte beider Zelllinien wurden bezüglich ihres Hypermethylierungspotentials charakterisiert. Hierbei wurde lediglich eine 40 %ige Hypermethylierung beobachtet, wenn das Level von PIMT/hTgs1 reduziert worden war. Die Zugabe von rekombinantem PIMT/hTgs1 stellte das normale Hypermethylierungslevel wieder her. Eine auffällige Parallele zu den zuvor durchgeführten Versuchen in Hefen war auch, dass die Reduzierung des PIMT/hTgs1-Levels nicht zur Entstehung eines letalen Phenotyps führte, wobei nicht näher auf eine mögliche Kälte-Sensitivität eingegangen wurde.^[214] In dieser Studie wurde auch die Bedeutung des SMN-Komplexes (*survival of motor neuron*-Komplex) hinsichtlich der Hypermethylierung untersucht. Es gibt Hinweise, dass dieser Komplex *in vivo* an der Bildung der Sm-Core Domäne beteiligt ist.^[215] Diese besteht aus acht Proteinen (B, B', D1, D2, D3, E, F, G), die an einen Uridyl-reichen Einzelstrang innerhalb der UsnRNAs (U1-U5)^[216,217] binden. Der Sm-Core wurde schon zuvor als essentieller Bestandteil für eine erfolgreiche Hypermethylierung *in vitro* beschrieben, allerdings als aktives Enzym in der Transferreaktion ausgeschlossen. So zeigten im Jahr 1994 Plessel *et al.* mittels *Pulldown*-Experimenten unter Verwendung Kappenspezifischer Antikörper, dass für eine erfolgreiche Hypermethylierung sowohl ein korrekt assemblierter Sm-Core aufgebaut sein muss als auch ein cytosolischer Faktor aus HeLa-Zellen sowie S-Adenosyl-L-methionin vorliegen müssen.^[218] Dieser cytosolische Faktor konnte im Jahr 2001 als PIMT/hTgs1 identifiziert werden. Die Interaktionen zwischen diesem Enzym und dem Sm-Core wurden daraufhin genauer charakterisiert. Mouaikel *et al.* konnten mittels verschiedener *Pulldown*-Experimente zeigen, dass der N-terminale Bereich dieses Enzyms mit dem C-terminalen Bereich des Sm B-Proteins, der C-terminale Bereich des Enzyms hingegen mit dem SMN interagiert.^[219] In Gegenwart der Variante SMN Δ N27 konnte keine Hypermethylierung beobachtet werden, obwohl die essentiellen Faktoren, Sm-Core und U2snRNA, vorlagen.^[220] Eine mögliche aktive Rolle des SMN bei der

Hypermethylierung war bis zu diesem nicht ausgeschlossen worden. Lemm *et al.* gingen daher der Frage nach, ob der SMN-Komplex die Hypermethylierung katalysiert und somit die gesuchte Methyltransferase darstellt. Durch ihre Studien konnten sie dies allerdings ausschließen. Die Reduzierung des SMN-mRNA-Levels hatte keinen Einfluss auf die Hypermethylierung.^[214] Somit konnten Lemm *et al.* erstmals nachweisen, dass PIMT/hTgs1 das humane, homologe Protein der zuvor in Hefen charakterisierten Trimethylguanosinsynthase darstellt und für die Hypermethylierung der Kappe von snRNAs in humanen Zellen verantwortlich ist. Dieses Enzym wurde somit entsprechend des Hefe-Analogons als hTgs1 bezeichnet.

Das Enzym wurde nicht nur hinsichtlich seiner Aktivität und Interaktionspartner charakterisiert, sondern auch bezüglich seiner subzellulären Lokalisation. Mehrere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass in HeLa-Zellen unterschiedliche Isoformen des Enzyms vorliegen, die sich in ihrem Molekulargewicht unterscheiden. Bezüglich deren subzellulären Lokalisationen liegen bisher allerdings widersprüchliche Ergebnisse vor. Enünlü *et al.* konnten mittels Immunblot-Analysen unter Verwendung eines *anti-Tgs*-Antikörpers nachweisen, dass eine kleinere Isoform von hTgs1 mit einer Masse von 55 kDa im Cytoplasma und eine Isoform mit einem Molekulargewicht von 90 kDa im Nukleus vorliegt.^[221] Auch die Gruppe um Bordonné zeigte im Jahr 2008, dass zwei Isoformen des Enzyms in HeLa-Zellen vorliegen. Allerdings ging aus ihren Ergebnissen hervor, dass eine kleinere, dennoch aktive Isoform von 65-70 kDa im Nukleus, assoziiert mit Box C/D und H/ACA snRNPs, vorliegt. Eine längere Isoform mit einem Molekulargewicht von 110 kDa konnte im Cytoplasma nachgewiesen werden. Diese durch Immunblot-Analysen erhaltenen Ergebnisse wurden durch siRNA-Experimente verifiziert. Hierfür wurde das Level von hTgs1 reduziert und die zellulären Extrakte wurden mittels eines Immunblots analysiert, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers auszuschließen. Tatsächlich konnten sie in diesen Experimenten keine der beiden oben beschriebenen Isoformen nachweisen, was bestätigt, dass beide Isoformen der gesuchten hTgs1 entsprechen.^[222]

Die Tatsache, dass hTgs1, wenn auch in verschiedenen Isoformen, sowohl im Nukleus, als auch im Cytoplasma vorliegt, unterstreicht ihre Bedeutung für die Hypermethylierung von snRNAs und snoRNAs, da snRNAs im Cytoplasma und snoRNAs im Nukleus hypermethyliert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass PIMT/hTgs1 seit seiner Entdeckung in einer Vielzahl von Studien charakterisiert wurde. Nachdem PIMT zunächst als humanes Homolog der Trimethylguanosinsynthase aus Hefen beschrieben und nachgewiesen werden konnte,^[212]

wurde 2006 durch Lemm *et al.* gezeigt, dass das identifizierte Protein in Menschen in der Tat die gleiche Funktion wie yTgs1 aufweist und damit für die Hypermethylierung der Kappen von snRNAs und snoRNAs verantwortlich ist^[214]. Da dieser Prozess sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma abläuft, ist es nötig, dass das Enzym auch in beiden Kompartimenten vorliegt, was durch verschiedene Gruppen bestätigt wurde.^[221,222] In verschiedenen Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass die Sm-Core-Domäne, anders als der SMN-Komplex, essentiell für die erfolgreiche Hypermethylierung *in vitro* ist.^[214,218] Allerdings muss diesbezüglich auch beachtet werden, dass die Ergebnisse stark vom durchgeführten Versuchsaufbau abhängen. Meister *et al.* konnten zeigen, dass die Sm-Core-Domäne nur gebildet werden kann, wenn der SMN-Komplex vorliegt.^[223] Dies deutet darauf hin, dass SMN *in vivo* durchaus eine essentielle Funktion bei der Hypermethylierung der snRNAs und snoRNAs haben und wichtig für die Bildung des Sm-Cores sein könnte. Diese essentielle Rolle *in vivo*, im Gegensatz zu den Ergebnissen aus *in vitro*-Experimenten, wird auch durch die Tatsache untermauert, dass der Komplex mit hTgs1 interagiert.^[219]

Dass dem SMN-Komplex *in vivo* eine wichtigere Rolle zukommt als aus *in vitro* Versuchen hervorgeht, wird auch durch die Beobachtung verstärkt, dass die Variante SMN Δ N27 zwar zur Rekrutierung des Sm-Cores und der U2snRNA führt, aber eine Trimethylierung der Kappe *in vivo* dennoch nicht beobachtet werden konnte.^[220]

Die Gesamtheit aller beschriebenen Ergebnisse verdeutlicht, dass die Rolle von hTgs1 als Enzym der Hypermethylierung zwar nachgewiesen werden konnte, die Vorgänge der Rekrutierung und Regulierung des Enzyms, die Assemblierung der snRNPs/snoRNPs sowie deren Transportprozesse aber äußerst komplex sind. Dies zeigt sich auch in teilweise widersprüchlichen Ergebnissen, beispielsweise bei der subzellulären Lokalisation des Enzyms und der Rolle des SMN-Komplexes. So kann bisher zwar ein grobes Bild der Vorgänge zur Hypermethylierung von snRNAs und snoRNAs *in vivo* gezeichnet werden (Abbildung 1.10), dennoch werden weitere Untersuchungen notwendig sein, um die Rolle aller Interaktionspartner und Bedeutung der Hypermethylierung für die zelluläre Integrität aufklären zu können.

Unabhängig von diesen Fragen konnte die humane Trimethylguanosinsynthase in verschiedenen Studien rekombinant produziert und *in vitro* genauer charakterisiert werden. Die Ergebnisse hierzu sind in 1.4.1.2 zusammengefasst.

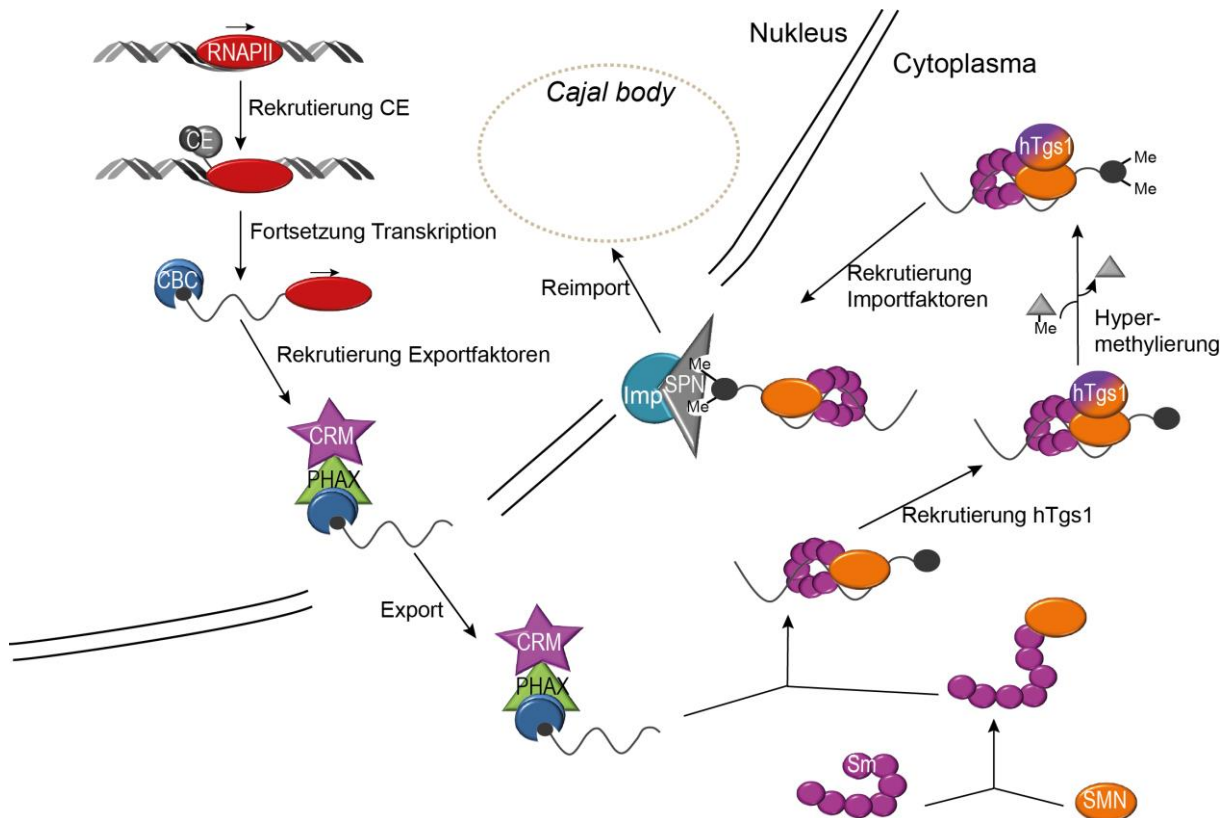


Abbildung 1.10 **Der Weg einer humanen snRNA *in vivo*.** Wie auch humane mRNAs werden snRNAs durch die RNA-Polymerase II (RNAPII, rot) synthetisiert. Diese pausiert nach etwa 20 Nukleotiden und rekrutiert die Capping-Enzyme (CE, grau) zum 5'-Ende des Transkripts. Nach der Modifikation der naszierenden snRNA mit der 5'-Kappe (dunkelgrau), bindet der CBC (blau). Anschließend wird über die Adapter- und Transportproteine (PHAX: grün; CRM/RanGTP: violett) der Export der snRNA vermittelt. Im Cytoplasma erfolgt die Assemblierung des SMN-Komplexes (orange) und der Sm-Proteine (lila). Die snRNA wird zu diesem Komplex transportiert und es erfolgt die Bildung der Sm-Core-Domäne, bevor hTgs1 (orange/lila) über Bindung an SMN und Sm-Proteine an die snRNA rekrutiert wird. Es folgt die Hypermethylierung der Kappe an N^2 unter Verwendung von AdoMet (graues Dreieck mit Me). Die hypermethylierte Kappe wird durch Snurportin (SPN, dunkelgrau) gebunden, wodurch Importin- β rekrutiert und der Import der hypermethylierten snRNAs in *Cajal bodies* erfolgen kann. Einige Schritte, die unter anderem bei Burghes und Beattie^[224] beschrieben sind, werden in der Abbildung nicht wiedergegeben, da sie in diesem Kapitel nicht thematisiert wurden.

1.4.1.2 Charakterisierung der humanen Trimethylguanosinsynthase hTgs1 *in vitro*

Besonders durch Monecke *et al.*, Benarroch *et al.* sowie Hausmann *et al.* wurde das rekombinant produzierte hTgs1 *in vitro* genauer charakterisiert. Dies beinhaltete unter anderem die Aufklärung der Proteinstruktur, die Charakterisierung des Substratspektrums und kinetischer Parameter sowie Mutationsstudien.^[211,225–227]

Hausmann *et al.* charakterisierten im Jahr 2008 zunächst das Substratspektrum des Enzyms.^[225] Hierzu wurde der C-terminale Bereich des Enzyms, der die Aminosäuren 576–853 umfasst, rekombinant produziert, gereinigt und auf Aktivität getestet. Der Methyltransfer von AdoMet auf m^7GpppA wurde erfolgreich durchgeführt, was bestätigte, dass es sich bei dem untersuchten Enzym um eine Transferase handelte. Genauere Untersuchungen zeigten, dass hTgs1 zwei Methylgruppen auf N^2 der N^7 -methylierten Kappenstruktur überträgt, wobei

hierfür ein distributiver Mechanismus angenommen wird. Im Folgenden konnte das Substratspektrum des Enzyms genauer charakterisiert werden. Dabei wurde festgestellt, dass das Enzym Kappen-spezifisch ist und einen Methyltransfer lediglich auf *N*⁷-methylierte Guanosinderivate, wie m⁷GDP, m⁷GTP und m⁷GpppA ermöglicht, nicht aber auf die jeweiligen unmethylierten Substrate. Auch ein Transfer auf andere Nukleotide konnte nicht nachgewiesen werden. Kinetische Analysen unter Verwendung von m⁷GDP als Substrat erlaubten die Bestimmung der Substrataffinität ($K_M=30\text{ }\mu\text{M}$) sowie der Wechselzahl des Enzyms ($k_{\text{cat}}=2,4\text{ min}^{-1}$) hinsichtlich des ersten Methyltransfers. Für die enzymatische Aktivität sind die Aminosäuren 631-853 essentiell, was durch Studien mit trunkierten Enzym-Varianten gezeigt werden konnte. Als besonders wichtige Reste für die Enzymkatalyse konnten mittels eines Alaninscans die Positionen F655, D696, D719 und W766 identifiziert werden, da entsprechende Varianten weniger als 1 % der Wildtyp-Aktivität zeigten.^[225]

Monecke *et al.* präsentierten im Jahr 2009 erste Ergebnisse zur Struktur des Enzyms. Hierzu hatten sie eine trunkierte Variante des Enzyms, welche die konservierte Methyltransferasedomäne (aa 653-853) umfasste, gereinigt und in Anwesenheit von m⁷GpppA kristallisiert.^[226] Die Kristallstruktur zeigte, dass das Kappen-Analogon über den Adenosinrest an die AdoMet-Bindetasche gebunden hatte und eine Erkennung der Kappe durch das Enzym nicht stattfand. Dies wurde auch durch Aktivitätsstudien verifiziert, bei denen nachgewiesen wurde, dass diese Variante des Enzyms inaktiv war.^[226]

Daraufhin wurde die Methyltransferasedomäne von hTgs1 durch Monecke *et al.* erneut kristallisiert, allerdings wurde hierbei eine Variante eingesetzt welche die Aminosäuren 618-853 umfasste und nachweislich den Methyltransfer auf die mRNA-Kappe katalysierte.^[227] Das Enzym wurde mit m⁷GTP und *S*-Adenosylhomocystein (AdoHcy, SAH) kokristallisiert und die Kristallstruktur konnte in einer Auflösung von 2,0 Å erhalten werden (Abbildung 1.11). Der N-terminale Bereich des Enzyms umfasst elf α -Helices und sieben β -Faltblätter. Diese bilden eine Kerndomäne, welche als Motiv die klassische Methyltransferase-Faltung Klasse 1 (Rossmann-Faltung) enthält. Darüber hinaus weist das Enzym einen α -helicalen N-terminalen Bereich auf. Neben der Struktur konnten auch Interaktionen zwischen den Substraten und dem Enzym genauer bestimmt werden. Die Base von AdoHcy ist zwischen F698 und I720 lokalisiert. Eine Vielzahl von Interaktionen auf Basis von Wasserstoffbrückenbindungen tritt zwischen dem Enzym sowie der Carboxyl- und Aminofunktion des Homocysteinrests des Cosubstrats auf. Die Kappe wird in unmittelbarer Nähe von AdoHcy gebunden, wobei die Ausrichtung beider Substrate so erfolgt, dass die Methylgruppe auf die Position *N*² von m⁷G übertragbar ist. Das Guanosin der Kappe liegt

coplanar zu W766 vor, wodurch π - π -Interaktionen der aromatischen Ringe erfolgen können. Auf der gegenüberliegenden Seite wird die Bindetasche durch S671 begrenzt. Die Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Katalyse wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese untersucht. Hierbei wurden die Reste W766, S763, D696, F804, die teilweise bereits durch Hausmann *et al.* als wichtig für die Katalyse eingestuft worden waren,^[225] jeweils durch Alanin, Asparat oder Asparagin substituiert und die entsprechenden Varianten hinsichtlich ihrer Aktivität charakterisiert. Die Substitution von W766 gegen Alanin führte zu einem kompletten Verlust der enzymatischen Aktivität. Eine Reduzierung der Aktivität auf 18 % konnte beobachtet werden, wenn S763 gegen Alanin getauscht wurde, hingegen hatte eine Substitution mit Asparagin an dieser Position kaum Einfluss auf die enzymatische Aktivität. Aus den erhaltenen Daten wurde ein Katalysemechanismus für hTgs1 postuliert. Es wird angenommen, dass dieser nach einem S_N2 -Mechanismus erfolgt, indem das m^7G über das Stickstoffatom N^2 nukleophil an der Methylgruppe angreift und AdoHcy freigesetzt wird, wobei das N^2 -Atom zunächst in einen sp^3 -Zustand übergeht. Diese Elektronenkonfiguration könnte durch S763 und P764 stabilisiert werden. Außerdem wird die Nukleophilie des Stickstoffatoms durch Abstraktion eines Protons erhöht. Dieser Vorgang wird durch die positive Ladung des Guanosins begünstigt und S763 gilt als potentieller Akzeptor. Allerdings ist die Rolle dieser Aminosäure in der Katalyse nicht vollständig geklärt, da die Mutationsstudien zeigten, dass sie nicht essentiell für die Aktivität ist. Durch die Studien von Monecke *et al.* konnten somit nicht nur Aussagen über die Struktur des Enzyms, sondern auch über den katalytischen Mechanismus und essentielle Aminosäuren erhalten werden.^[227]

Benarroch *et al.* erweiterten die Kenntnisse über hTgs1 durch Studien, die sich vor allem mit der Kinetik der Reaktion sowie dem Substratspektrum des Enzyms beschäftigten.^[211] Sie zeigten zunächst am Beispiel von $m^7G(p)_xN/m^2G(p)_xN/G(p)_xN$ und $m^7G(p)_x/m^2G(p)_x/G(p)_x$, dass nur N^7 -methylierte Guanosine als Substrat für hTgs1 fungieren und mit diesen eine zweifache Methylierung an N^2 erfolgt. Als entscheidendes Charakteristikum für die Erkennung durch hTgs1 konnte somit das methylierte Stickstoffatom an Position 7 des Guanosins nachgewiesen werden. Daher untersuchten Benarroch *et al.* im Folgenden den Einfluss anderer Alkylreste an dieser Position auf die Aktivität von hTgs1. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass sowohl benzylierte als auch ethylierte Substrate durch hTgs1 erkannt und modifiziert werden, wobei Benzyl-substituierte Kappen-Analoga sogar effektiver als ethylierte umgesetzt werden. Somit scheint nicht die Modifizierung selbst, sondern die hierdurch entstehende positive Ladung das entscheidende Kriterium für die Erkennung der Kappe durch das Enzym zu sein.

Kinetische Analysen wurden in dieser Studie unter anderem mit m^7GpppG als Kappen-Analogon durchgeführt. Hierbei konnte eine Substrataffinität (K_M) von $134 \mu M$ sowie eine Umsatzzahl (k_{cat}) von $0,73 \text{ min}^{-1}$ bestimmt werden.^[211]

Diese Ergebnisse zeigen, dass hTgs1 eine spezifische Modifikation der Kappe ermöglicht und promiskuitive Eigenschaften hinsichtlich der $N7$ -Modifizierung aufweist. Somit könnte dieses Enzym einen guten Ausgangspunkt darstellen, um eine Markierung der mRNA-Kappe mit einer reaktiven Gruppe zu katalysieren. Dies wäre ein essentieller Schritt zur Etablierung eines chemo-enzymatischen Ansatzes.

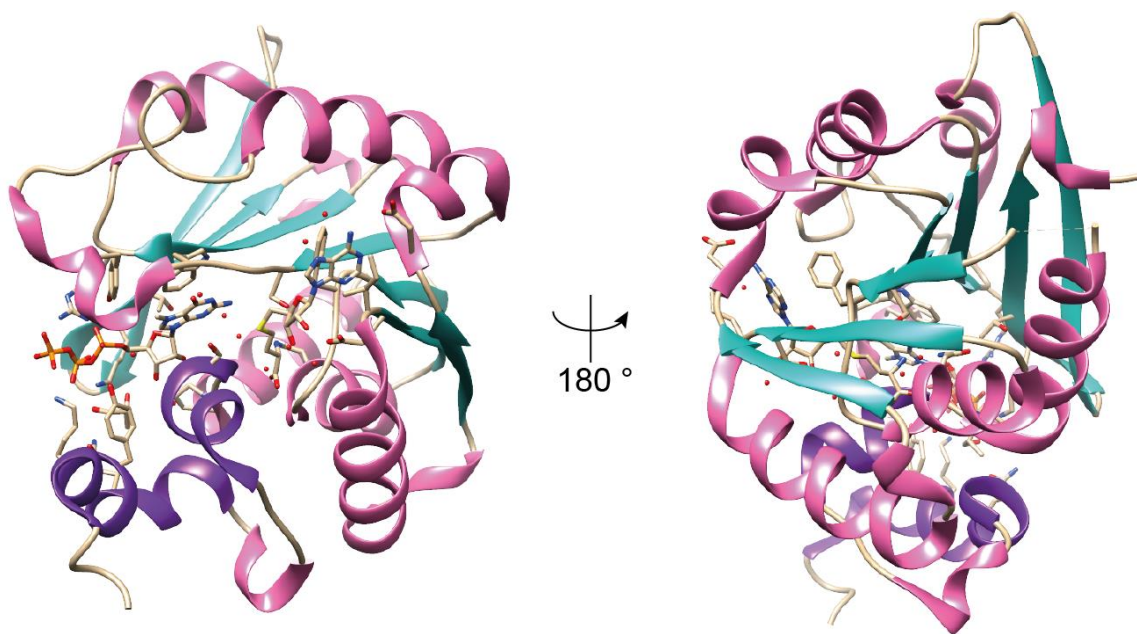


Abbildung 1.11 **Kristallstruktur des N-terminalen Bereichs der Trimethylguanosinsynthase hTgs1 (aa 618-853, PDB: 3GDH).** Die α -helicalen Bereiche sind in rosa dargestellt, wobei die N-terminale helicale Extension dunkler gefärbt ist. Die β -Faltblätter sind in blau dargestellt. Die kokristallisierten Moleküle m^7GTP und S-Adenosylhomocystein sowie die Aminosäuren L646, Y647, D719, I720, D747, W766, Y771 und R807 sind in Form des Stäbchenmodells dargestellt.

1.4.2 Die Trimethylguanosinsynthase GlaTgs2 des Darmparasiten *Giardia lamblia*

So wie die Kappenstruktur m^7G ein spezifisches Merkmal eukaryotischer mRNAs darstellt, kann die hypermethylierte Form als ubiquitäres Merkmal der snRNAs und snoRNAs, angenommen werden. Zahlreiche Studien belegen, dass nicht nur im Menschen hypermethylierte Kappen vorkommen, sondern auch in Hefen, *Drosophila* und auch in dem Darmparasiten *Giardia lamblia*. Dieser gehört zur Ordnung der Diplomonadida und ist ein einzelliger eukaryotischer Darmparasit, der eine frühe eukaryotische Spezies darstellt. Durch das frühzeitige Auftreten dieser Spezies im evolutionären Stammbaum, unterscheidet sie sich in einigen Charakteristika von höheren Eukaryoten. So besitzt *Giardia lamblia* weder

Mitochondrien noch ein endoplasmatisches Retikulum, verfügt aber über zwei Zellkerne.^[228] In einigen Merkmalen sind *Giardia lamblia* und höhere Eukaryoten aber auch identisch. So konnte durch Hausmann *et al.* sowie Li und Wang nachgewiesen werden, dass die typischen Mechanismen der mRNA-Modifizierung und Translation auch in *Giardia lamblia* ablaufen.^[229,230] Weiterhin wurden durch Li und Wang sowie Niu *et al.* Hinweise gefunden, dass auch hypermethylierte Kappen schon in diesem frühen evolutionären Stadium vorkommen. Niu *et al.* zeigten dies durch Antikörperinteraktionsstudien.^[228] Auch der Nachweis eines m^{2,2,7}G-bindenden Proteins in *Giardia lamblia* deutete auf Präsenz der hypermethylierten Kappenstruktur hin.^[230] Ein entsprechendes Enzym, das für diese Hypermethylierung in *Giardia lamblia* verantwortlich war, konnte aber bis zum Jahr 2005 nicht gefunden werden.

Zu diesem Zeitpunkt identifizierten Hausmann und Shuman zwei potentielle Trimethylguanosinsynthase-codierende Gene im Genom von *Giardia lamblia*. Die paralogen Proteine wurden als GlaTgs1, welches 300 Aminosäuren umfasst und eine Sequenzidentität von 32 % zur *S. pombe* Tgs aufweist sowie GlaTgs2, welches 258 Aminosäuren und 25 % Sequenzidentität zu *S. pombe* Tgs^[229] beziehungsweise 31 % Sequenzidentität zu hTgs1₆₁₈₋₈₅₃ aufweist, bezeichnet. Neben der generellen Sequenzidentität war eine starke Konservierung spezifischer Sequenzabschnitte auffällig,^[229] die in Bezug auf hTgs1 als AdoMet- sowie m⁷G Bindedomäne identifiziert worden waren^[231]. Hieraus konnten erste Rückschlüsse auf die potentielle Funktion der Enzyme geschlossen werden.

Die Trimethylguanosinsynthase 2 (GlaTgs2) konnte durch Hausmann und Shuman erfolgreich rekombinant produziert, gereinigt und *in vitro* charakterisiert werden. Hierbei zeigte sich, dass das Enzym spezifisch die m⁷G-Struktur erkennt und diese sowohl von anderen Nukleotiden, als auch unmethylierten Guanosinen unterscheiden kann. Allerdings wurde auch gezeigt, dass das Enzym nur den Transfer einer Methylgruppe auf die Position N² des methylierten Guanosinrestes katalysiert und eigentlich nicht als Tri- sondern als Dimethylguanosinsynthase bezeichnet werden müsste. In weiteren Versuchen wurden auch kinetische Parameter des Enzyms, wie die Substrataffinität und die Wechselzahl, näher charakterisiert. Die Affinität gegenüber der Kappe nimmt mit zunehmender Länge und Ladung von m⁷GDP (65 µM) über m⁷GTP (30 µM) zu m⁷GpppA (7 µM) zu. Für das Substrat m⁷GDP konnte außerdem eine Wechselzahl k_{cat} von 14 min⁻¹ unter Verwendung des natürlichen Cosubstrats AdoMet nachgewiesen werden. Für das Cosubstrat konnte eine Affinität von 6 µM bestimmt werden. Eine Verifizierung, dass der Methyltransfer durch GlaTgs2 katalysiert wird, erfolgte durch Austausch verschiedener Reste in der putativen AdoMet- sowie der m⁷G-Bindedomäne gegen

Alanin (D68, E91, W143). Alle diese Varianten waren nicht in der Lage eine Hypermethylierung der Kappe zu katalysieren. Durch diese Studie konnten Hausmann und Shuman zeigen, dass GluTgs2 ein Enzym ist, das den einfachen Methyltransfer auf die Position N^2 der Kappe katalysiert. Die Entstehung der trimethylierten Kappe *in vivo* konnte für *Giardia lamblia* bis heute nicht aufgeklärt werden. Es wird vermutet, dass GluTgs1 hieran beteiligt sein könnte.^[229]

Ebenfalls durch die Gruppe um Shuman wurden weitere Struktur-Funktionsanalysen von GluTgs2 durchgeführt. Zum einen wurden N- und C-terminal verkürzte Varianten generiert. Zum anderen wurden an 17 Positionen Aminosäuren durch Alanin substituiert.^[229] Hierfür wurden konservierte Reste sowohl innerhalb, als auch außerhalb der AdoMet- und m^7G -Bindedomänen gewählt. Insgesamt acht der Substitutionen führten zu Enzym-Varianten, welche weniger als 15 % der Wildtyp-Aktivität zeigten. Hierdurch konnten die entsprechenden Positionen F18, T40, D76, N103, D140, P142, Y148 und P185 als essentiell für die enzymatische Aktivität hinsichtlich der Modifizierung der mRNA-Kappe mit AdoMet als Cosubstrat eingestuft werden. Nach Identifizierung dieser wichtigen Positionen im Alaninscan wurden konservative Substitutionen dieser Aminosäuren durchgeführt. Aus den Aktivitäten der Varianten leiteten Hausmann *et al.* Aussagen über essentielle Aminosäuren und reaktiven Gruppen für die Enzymkatalyse ab. Für die enzymatische Funktion sind Carboxylatgruppen an den Positionen 76 und 91 sowie eine Hydroxylgruppe an Position 40 essentiell. Jeder durchgeführte Austausch der Reste D140, N103 und W143 führte zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität, was die Wichtigkeit dieser Positionen verdeutlicht. Es wird angenommen, dass der Rest W143 an π -Interaktionen zum Guanosin der Kappe beteiligt und der Rest N103 wichtig für die Bildung der AdoMet-Bindetasche sein könnte.^[229]

Im Folgenden wurde das Substratspektrum hinsichtlich der Alkylsubstitution an N^7 durch Benarroch *et al.* untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass für den Transfer einer Methylgruppe auf die Position N^2 der Kappe durch GluTgs eine Modifizierung an N^7 essentiell ist. Dabei muss es sich nicht zwingend um eine Methylgruppe handeln. Ein Methyltransfer durch GluTgs2 konnte ebenfalls nachgewiesen werden, wenn Ethyl oder Benzyl als Substituenten vorlagen.^[211]

Die Funktion und Spezifität von GluTgs2 konnte somit *in vitro* charakterisiert werden. Obwohl sich hieraus bisher keine Erklärung für die Monomethylierung durch das Enzym ergeben und seine Rolle *in vivo* sowie potentielle Interaktionen mit GluTgs1 unklar sind, deuten die vorhandenen Daten darauf hin, dass GluTgs2 geeignet sein könnte, um die mRNA-Kappe spezifisch zu modifizieren.

1.5 Zielsetzung

Die Funktionalität einer Zelle zu gewährleisten, stellt die Grundlage des Lebens dar. Für dieses Ziel ist Regulation der Proteinbiosynthese essentiell, denn hierdurch wird der Zelle ermöglicht ihr Proteom an äußere Einflüsse zu adaptieren. Es ist bekannt, dass diese Regulation sowohl auf DNA-Ebene,^[35] beispielsweise durch Methylierung, als auch durch Regulation von Proteinen selbst,^[36] etwa durch Phosphorylierung, erfolgen kann. Schon diese Beispiele zeigen, dass die Proteinbiosynthese durch eine Vielzahl komplexer Mechanismen reguliert wird und auf Basis unterschiedlicher Biomoleküle erfolgen kann. Auch auf mRNA-Ebene kann eine Regulation der Genexpression erfolgen. Durch asymmetrische Verteilung subzellulär lokalisierter mRNAs kann eine zeitlich und räumlich kontrollierbare Initiation der Translation erreicht werden.^[37] Fehlregulierungen dieser Vorgänge könnten unter Umständen an der Entstehung verschiedener Krankheiten wie FmRX oder MS beteiligt sein.^[85–87]

Um die Mechanismen und Auswirkungen von Fehlregulationen subzellulär lokalisierter mRNAs genauer zu verstehen, können sowohl zelluläre als auch isolierte mRNAs hinsichtlich ihrer Expressionslevel und subzellulären Lokalisationen analysiert werden. Visualisierungsstrategien können darüber hinaus genutzt werden, um Dynamiken des mRNA-Transports zu untersuchen.

Besonders eine Analyse dieser Biomoleküle in lebenden Zellen könnte daher neue Erkenntnisse über Mechanismen und Dynamiken subzellulär lokalisierter mRNAs liefern. Eine hierfür notwendige *in vivo*-Detektionsmethode sollte dabei idealerweise ermöglichen, sequenzspezifisch endogene mRNAs zu markieren. Darüber hinaus sollte die verwendete Sonde ein geringes Molekulargewicht aufweisen, um den natürlichen Zustand wenig zu beeinflussen und es sollte möglich sein, markierte Spezies vom Hintergrundsignal zu unterscheiden. Derzeitig genutzte Systeme beruhen meist auf Oligonukleotidsonden oder codierbaren GFP-Fusionskonstrukten und erfüllen diese Kriterien nur teilweise.

Das Ziel dieser Arbeit war daher, eine neue Strategie zur Markierung von mRNAs basierend auf einem chemo-enzymatischen Ansatz zu entwickeln und zu etablieren. In einer solchen Strategie wird das Zielmolekül zunächst enzymatisch mit einer reaktiven Gruppe kovalent verknüpft, um es für eine anschließende chemische Modifizierung mittels Click-Reaktionen zugänglich zu machen. Der modulare Aufbau dieses Systems aus enzymatischer und folgender bioorthogonaler chemischer Modifizierung, ermöglicht (i) die Markierung endogener Biomoleküle, (ii) eine geringe Störung des nativen Systems durch Transfer kleiner Gruppen, (iii) die Bildung fluoreszierender Produkte aus nicht fluoreszierenden Edukten und (iv) die einfache Adaption an verschiedene Fragestellungen. Ein chemo-enzymatischer Ansatz

zur Markierung von mRNA könnte daher eine Vielzahl der Kriterien einer optimalen Detektionsmethode erfüllen.

Um eine solche Strategie zu etablieren, sollten für den Schritt der enzymatische Modifizierung zunächst passende Enzyme gewählt und hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber des synthetisierten AdoMet-Analogons AdoPropen getestet werden, wobei für entsprechende Aktivitätstests zunächst eine passende Methode etabliert werden musste. Nach Identifizierung eines promiskuitiven Enzyms sollte durch Mutagenese die Aktivität gegenüber des nicht-natürlichen Substrats verbessert und so die effiziente Markierung eukaryotischer mRNAs mit einer reaktiven Gruppe ermöglicht werden.

Diese enzymatisch modifizierten mRNAs sollten dann durch unterschiedliche Click-Reaktionen markiert werden, wobei entsprechende Substrate hierfür zunächst synthetisiert werden mussten.

Die etablierten Protokolle zur Markierung eukaryotischer mRNA *in vitro*, sollten genutzt werden, um zelluläre mRNAs zu markieren und so die Grundlage einer neuen potentiellen Methode zur Visualisierung endogener mRNA in lebenden Zellen bilden.

Die Idee zur spezifischen Markierung eukaryotischer mRNA sowie die einzelnen hierfür zu etablierenden Schritte sind in Abbildung 1.12 dargestellt.

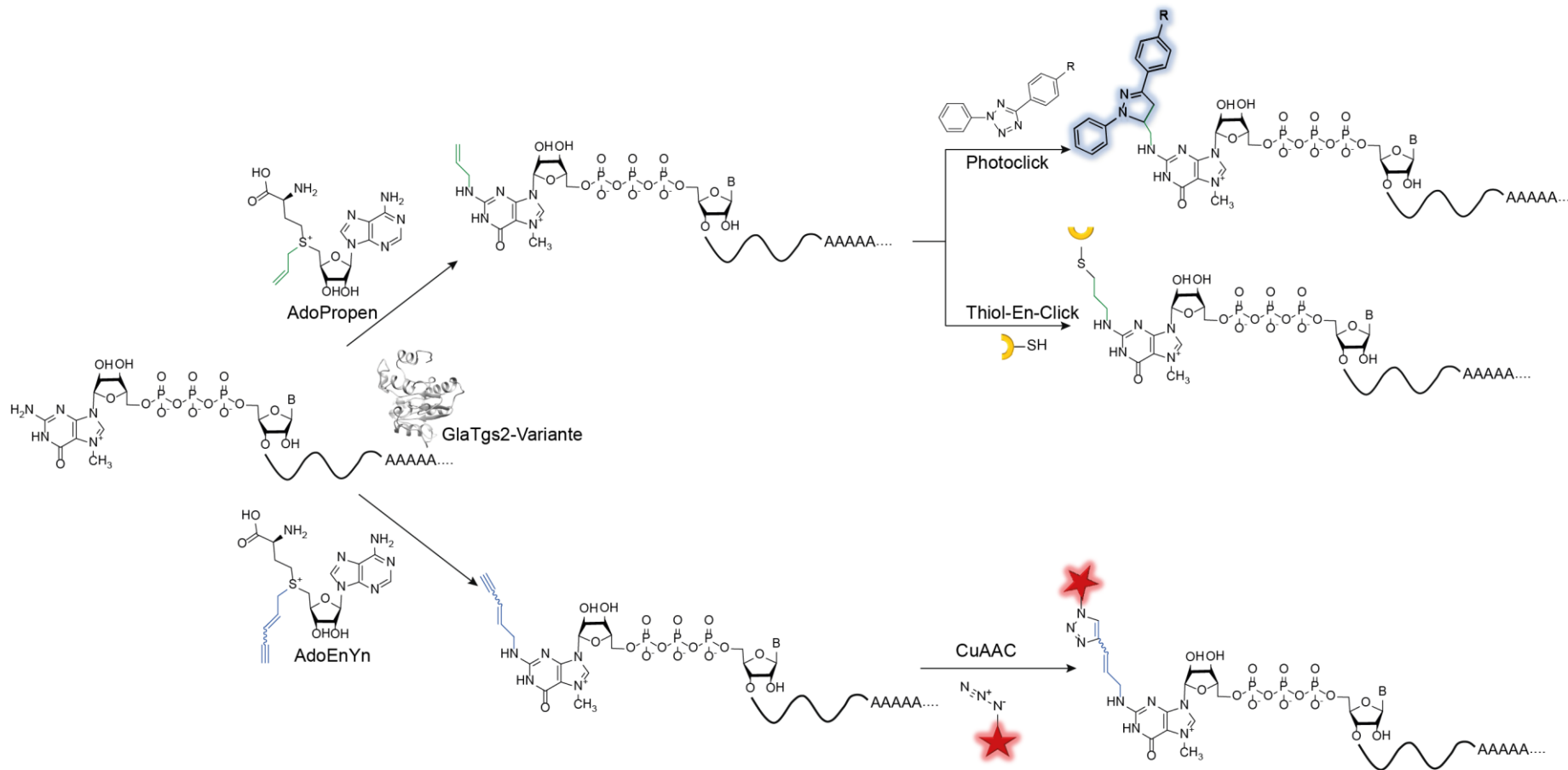


Abbildung 1.12 **Schematische Darstellung möglicher Strategien zur chemo-enzymatischen Markierung der mRNA-Kappe.** Die Abbildung zeigt verschiedene Möglichkeiten die mRNA-Kappe zunächst gezielt enzymatisch mit einer reaktiven Gruppe zu verknüpfen, um sie dann chemisch modifizieren zu können. Hierdurch könnte eine neue Methode zur spezifischen Markierung von mRNAs etabliert werden. Die Trimethylguanosinsynthase GlaTgs2 oder eine Variante hiervon sollte genutzt werden, um einen Allylrest auf die Position N^2 der Kappe zu übertragen. Dieser könnte anschließend über eine Thiol-En-Click-Reaktion oder Photoclick-Reaktion modifiziert werden, wobei sich bei letzterer ein fluoreszierendes Pyrazolin bilden könnte. Das Enzym beziehungsweise eine Variante hiervon sollte weiterhin genutzt werden, um einen Pentenylrest regiospezifisch auf die Kappe zu übertragen, wodurch diese für die Cu(I)-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition zugänglich würde und beispielsweise mit einem Fluorophor (Stern) verknüpft werden könnte.

2. Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte eine Strategie zur chemo-enzymatischen Markierung eukaryotischer mRNA entwickelt und etabliert werden. Hierzu mussten zunächst verschiedene Verbindungen synthetisiert werden, die als Cosubstrate oder als Edukte der Click-Reaktionen benötigt wurden. Weiterhin mussten verschiedene Enzyme rekombinant produziert, gereinigt und hinsichtlich ihrer Aktivitäten charakterisiert werden. Die erhaltenen Verbindungen und Proteine konnten eingesetzt werden, um verschiedene, mögliche Strategien zur Markierung eukaryotischer mRNA zu etablieren. Die Ergebnisse der einzelnen Schritte dieses Projekts sind in den folgenden Kapiteln dargestellt und wurden teilweise auch veröffentlicht.^[232,233]

2.1 Enzymatische Modifizierung – Synthese der AdoMet-Analoga

Um den enzymatischen Transfer einer reaktiven Gruppe auf die mRNA-Kappe zu ermöglichen, wurde zunächst das AdoMet-Analogon AdoPropen (5'-[(R/S)-[(3S)-3-Amino-3-carboxypropyl]prop-2-enylsulfonio]-5'-desoxyadenosin) **1**, entsprechend der Vorschrift von Dalhoff *et al.*,^[234] synthetisiert. In dieser Synthese wird S-Adenosylhomocystein (AdoHcy, SAH, **13**) in Gegenwart von Essigsäure und Ameisensäure mit 3-Brompropen inkubiert. Unter diesen Bedingungen sind die nukleophilen Atome des Adenins protoniert und eine Substitution des Broms in einer S_N2-Reaktion kann nur durch das Schwefelatom des AdoHcy **13** erfolgen. Die Reaktion verläuft nicht stereoselektiv, so dass bei Bildung des AdoPropens **1** am Schwefelatom sowohl S- als auch R-Konfiguration erhalten und das Rohprodukt als Diastereomerengemisch gebildet wird. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch mittels RP-HPLC. Fraktionen, welche das gereinigte Produkt enthielten wurden gesammelt, lyophilisiert und in ddH₂O gelöst. AdoPropen **1** konnte in Ausbeuten von 7±6 % bezogen auf die jeweils eingesetzte Menge S-Adenosylhomocystein **13** erhalten werden und lag in Konzentrationen von 11±6 mM vor. Die Konzentration der erhaltenen AdoPropen-Lösung wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Als molarer Extinktionsfaktor wurde ein Wert von 15 400 mol L⁻¹ cm⁻¹ angenommen.^[234] Das erhaltene Produkt wurde mittels ESI-TOF-MS sowie RP-HPLC charakterisiert (Abbildung 2.1). Die Analyse mittels RP-HPLC zeigte zwei Produktsignale bei einer Absorption von 260 nm mit Retentionszeiten von 8,2 Minuten sowie 8,5 Minuten, die vermutlich auf die in der Reaktion gebildeten Diastereomere zurückzuführen waren. In einigen der gereinigten AdoPropen-Präparationen konnten weitere Signale detektiert werden, die auf Verunreinigungen, wie beispielsweise

geringe Anteile des Edukts AdoHcy **13** zurückgeführt, aber nicht genauer charakterisiert wurden.

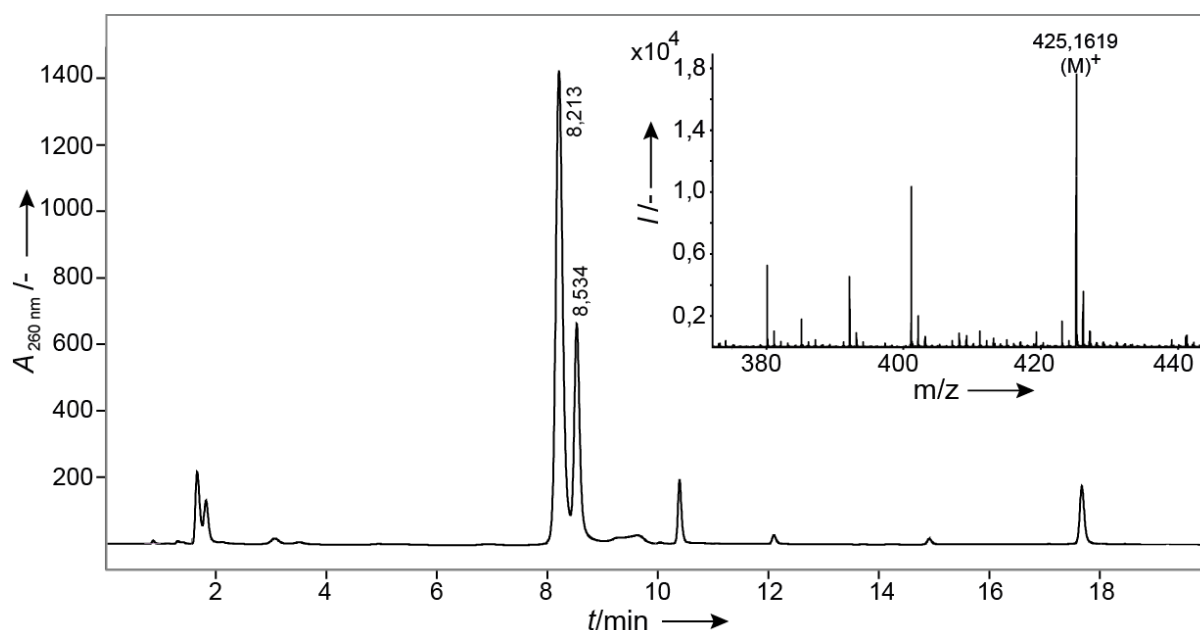


Abbildung 2.1 **Charakterisierung von AdoPropen mittels RP-HPLC und ESI-TOF-MS.** Die RP-HPLC-Analyse einer 1 mM AdoPropen-Lösung zeigte, dass das Produkt als Diastereomerengemisch ($t_R=8,2$ min und $t_R=8,5$ min) erhalten wurde. Die anderen Signale wurden nicht zugeordnet. In der massenspektrometrischen Analyse konnte die Masse des Produkts (ber. $[M]^+=425,16$ m/z, det. $[M]^+=425,16$ m/z) nachgewiesen werden.

Bei Verwendung einer neuen präparativen Säule konnte AdoPropen **1** auch als diastereomerenreines Produkt erhalten werden (Daten hier nicht gezeigt). Der Erfolg von Synthese und Reinigung wurde weiterhin mittels ESI-TOF-MS überprüft, wobei die erwartete Masse des Produkts ($[M]^+=425,16$ m/z) detektiert werden konnte. Für die enzymatische Modifizierung der mRNA-Kappe wurde AdoPropen **1** in finalen Konzentrationen von 0,5-1 mM als Cosubstrat eingesetzt und es konnte eine promiskuitive Aktivität der Trimethylguanosinsynthase 2 des Darmparasiten *Giardia lamblia* gegenüber diesem AdoMet-Analogen nachgewiesen werden (Kapitel 2.4). Um das Substratspektrum dieses Enzyms genauer zu charakterisieren, wurden weitere AdoMet-Analoga, 2-Me-AdoPropen (5'-[(R/S)-[(3S)-3-Amino-3-carboxypropyl]2-methyl-prop-2-enyl-sulfonio]-5'-desoxyadenosin) **2** sowie AdoBenzyl (5'-[(R/S)(3S)-3-Amino-3-carboxypropyl]benzylsulfonio]-5'-desoxyadenosin) **3**, synthetisiert.

Mittels dieser Cosubstrate sollte die Promiskuität des Enzyms gegenüber verzweigter Kohlenwasserstoffketten, beziehungsweise planarer, aromatischer Systeme charakterisiert werden. Sowohl 2-Me-AdoPropen **2**, als auch AdoBenzyl **3** zeichneten sich durch eine Doppelbindung in β -Position zum Schwefelatom aus, was gemäß Dalhoff *et al.* eine Prämisse

für den effizienten, enzymatischen Transfer nicht-natürlicher Seitenketten darstellt.^[201] Analoga, welche eine solche Mehrfachbindung aufweisen, könnten eine Stabilisierung des Übergangszustandes während des Transfers durch Delokalisierung ermöglichen^[201] und hierdurch den Transfer auch sterisch anspruchsvoller Gruppen im Vergleich zu entsprechenden ungesättigten Verbindungen bevorzugen. Beide Analoga wurden in dieser Arbeit gemäß der Vorschrift für AdoPropen **1** von Dalhoff *et al.*^[234] synthetisiert und gereinigt. Hierbei konnten 200 µL einer 4 mM Lösung 2-Me-AdoPropen **2** erhalten werden. Bezogen auf die eingesetzte Menge *S*-Adenosylhomocystein **13** entspricht dies einer Ausbeute von 5 %. Weiterhin konnten 200 µL einer 8 mM Lösung AdoBenzyl **3** erhalten werden, was einer Ausbeute von 8 % entspricht. Beide Analoga wurden, wie auch AdoPropen **1**, mittels RP-HPLC und ESI-TOF-MS, charakterisiert. Die chromatographische Analyse mittels RP-HPLC bei einer Detektionswellenlänge von 260 nm zeigte, dass 2-Me-AdoPropen **2** als Diastereomergemisch erhalten wurde. Die Produkte wiesen Retentionszeiten von 10,2 Minuten und 10,4 Minuten auf. AdoBenzyl **3** zeigte in der Analyse mittels RP-HPLC bei 260 nm ein einziges Signal mit einer Retentionszeit von 12,1 Minuten und konnte somit vermutlich diastereomerenrein erhalten werden. Die erwarteten Massen von $[M]^+ = 439,18$ m/z für 2-Me-AdoPropen **2** sowie $[M]^+ = 475,18$ m/z für AdoBenzyl **3** konnten mittels ESI-TOF-MS nachgewiesen werden (Daten im Anhang, Kapitel 8.5).

Für die chemo-enzymatische Modifizierung wurde ebenfalls AdoEnYn (5'-[(*R/S*)-[(3*S*)-3-Amino-3-carboxypropyl]pent-2-en-4-ynylsulfonio]-5'-desoxyadenosin) **4** eingesetzt (Kapitel 2.8). Die Synthese dieses AdoMet-Analogons wurde durch Josephin Holstein im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.^[235] Die Strukturformeln der verwendeten AdoMet-Analoga sind in Abbildung 2.2 dargestellt.

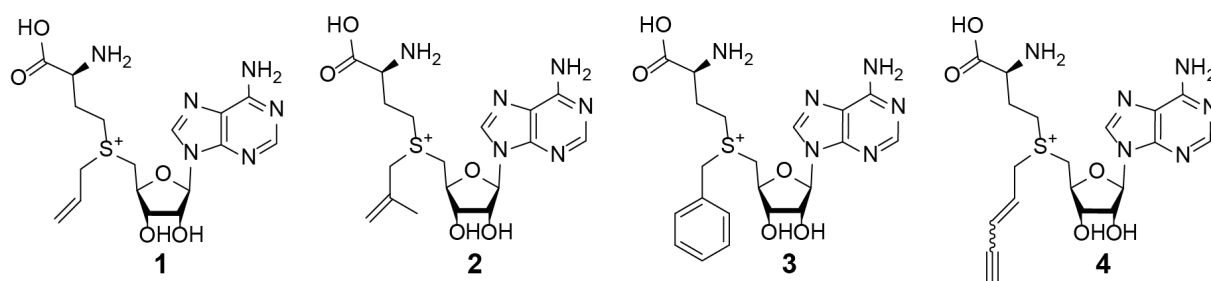


Abbildung 2.2 Strukturformeln der in dieser Arbeit synthetisierten bzw. genutzten AdoMet-Analoga. AdoPropen **1**, 2-Me-AdoPropen **2**, AdoBenzyl **3** sowie AdoEnYn **4** (synthetisiert durch Josephin Holstein).

2.2 Click-Reaktionen – Synthese und Charakterisierung der Edukte

Um eine chemo-enzymatische Modifizierung von mRNAs zu etablieren, mussten neben den entsprechenden Cosubstrat-Analoga auch verschiedene Edukte für die Click-Reaktionen synthetisiert werden. In dieser Arbeit wurden daher sowohl Reporter für die Thiol-En-Click- als auch für die Photoclick-Reaktion hergestellt, welche für die chemische Markierung alkenylierter Kappen eingesetzt werden konnten.

2.2.1 Synthese von 2-(Biotinamido)ethanthiol

Für die Etablierung der Thiol-En-Click-Reaktion wurde ein Thiol-haltiges Molekül als Reporter benötigt. Als Reporter eignen sich besonders Fluorophore oder solche Moleküle, die starke Interaktionen mit anderen Molekülen ausbilden können, wie beispielsweise Biotin. In dieser Arbeit wurde daher Biotinthiol (2-(Biotinamido)ethanthiol) **5** nach einer Vorschrift von Lo Conte *et al.* synthetisiert.^[236] Die Strukturformel ist in Abbildung 2.3 dargestellt. Es wurden in unabhängigen Synthesen 3,3 mg (12 μmol), 5,0 mg (17 μmol) bzw. 11,0 mg (36,3 μmol) eines weißen Feststoffes erhalten, was einer durchschnittlichen Ausbeute von $28 \pm 9\%$ (Lit.^[236] 86 %) bezogen auf die jeweils eingesetzte Menge Biotin-NHS entspricht. Das Produkt wurde mittels ESI-TOF-MS analysiert und die erwartete Masse von $[\text{M}+\text{H}]^+ = 304,12 \text{ m/z}$ konnte nachgewiesen werden (Abbildung 2.3).

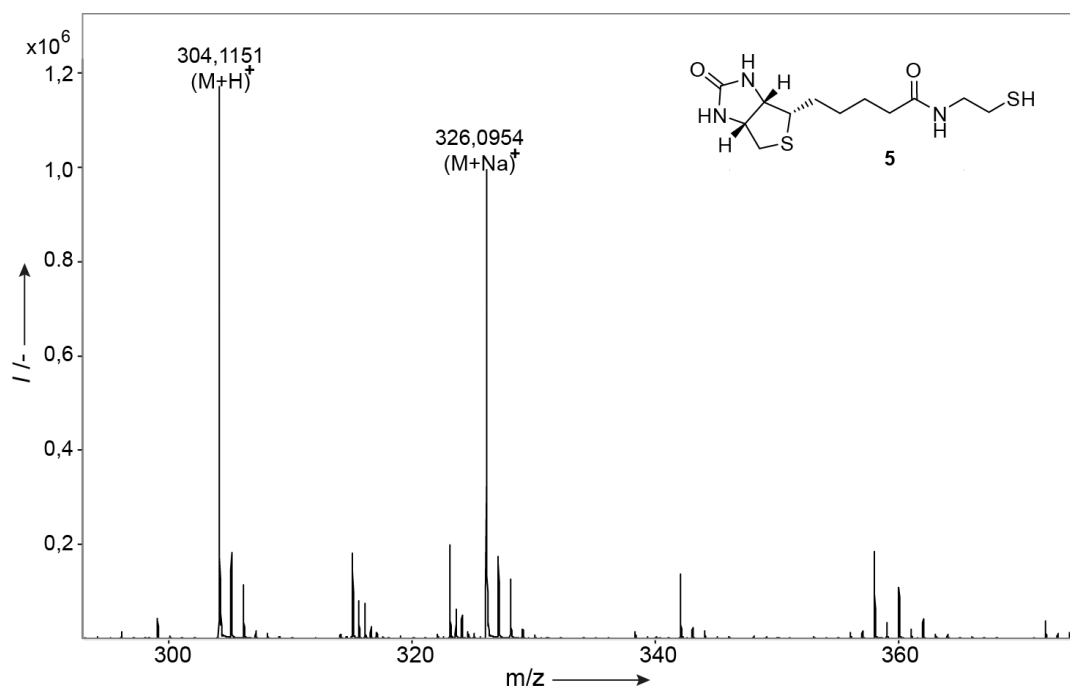


Abbildung 2.3 **Charakterisierung des synthetisierten Biotinthiols mittels ESI-TOF-MS sowie Darstellung der Strukturformel.** Die erwarteten Massen des Produkts **5** (ber. $[\text{M}+\text{H}]^+ = 304,11 \text{ m/z}$; det. $[\text{M}+\text{H}]^+ = 304,12 \text{ m/z}$ sowie ber. $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 326,10 \text{ m/z}$; det. $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 326,10 \text{ m/z}$) konnten nachgewiesen werden. Die Strukturformel des Biotinthiols **5** ist oben rechts dargestellt.

Für die Etablierung der Thiol-En-Click-Reaktion (Kapitel 2.6) wurde eine 200 mM Lösung von Biotinthiol **5** in DMF hergestellt, die mit Argon entgast und bei 4 °C unter Luftausschluss gelagert wurde.

2.2.2 Synthese und Charakterisierung verschiedener Tetrazole

Neben der Thiol-En-Click-Reaktion und CuAAC (Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition, *copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*), sollte ein Ansatz zur chemo-enzymatischen Markierung der mRNA-Kappe auf Basis der Photoclick-Reaktion etabliert werden. In einer solchen Strategie würde die enzymatisch allylierte Kappe in einer photoinduzierten Cycloaddition mit einem Tetrazol zum fluoreszierenden Pyrazolin umgesetzt werden. Diese Reaktion zeichnet sich unter anderem durch die Bildung eines fluoreszierenden Produkts aus nicht fluoreszierenden Edukten aus, wodurch ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis auch *in vivo* erreicht werden kann. Im Gegensatz zu der CuAAC und Thiol-En-Click-Reaktion konnte die Photoclick-Reaktion bereits erfolgreich für Markierungen von Biomolekülen *in vivo* eingesetzt werden.^[154,176] Diese Click-Reaktion bietet somit großes Potential einen entsprechenden Ansatz auch zur Visualisierung eukaryotischer mRNA in lebenden Zellen nutzbar zu machen.

Zunächst sollten in dieser Arbeit Protokolle für die Markierung der mRNA-Kappe mittels Photoclick-Reaktionen *in vitro* etabliert werden, um die Möglichkeiten dieser Strategie zur Markierung eukaryotischer mRNA untersuchen zu können (Kapitel 2.7.2). Hierfür sollten verschiedene Tetrazole eingesetzt werden, die sich in den Energien des jeweils höchsten besetzten Grenzorbitals (HOMO) unterscheiden (Abschnitt 2.7.1), da dies Einfluss auf die Reaktivität gegenüber der allylierten Kappe sowie auf Emissionsmaxima der gebildeten Cycloaddukte haben könnte. Als Edukte der Photoclick-Reaktionen wurden daher verschiedene Tetrazole (Strukturformeln in Abbildung 2.5) gemäß der Vorschrift von Ito *et al.*^[237] synthetisiert und gereinigt.

Methoxy-Tetrazol (5-(4-Methoxyphenyl)-2-phenyl-2H-tetrazol) **6** wurde in einer Menge von 144 mg (571 µmol) als eierschalenfarbener, kristalliner Feststoff erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute von 11 % (Lit.^[237] 44 %) bezogen auf die eingesetzte Menge Anilin (5,0 mmol). Das erhaltene Produkt wurde mittels ESI-TOF-MS sowie ¹H-NMR charakterisiert. In den Analysen konnten sowohl die erwartete Masse von $[M+H]^+ = 253,1$ m/z als auch die erwarteten Verschiebungen und Multiplizitäten der Protonensignale^[183] nachgewiesen werden (Abbildung 2.4).

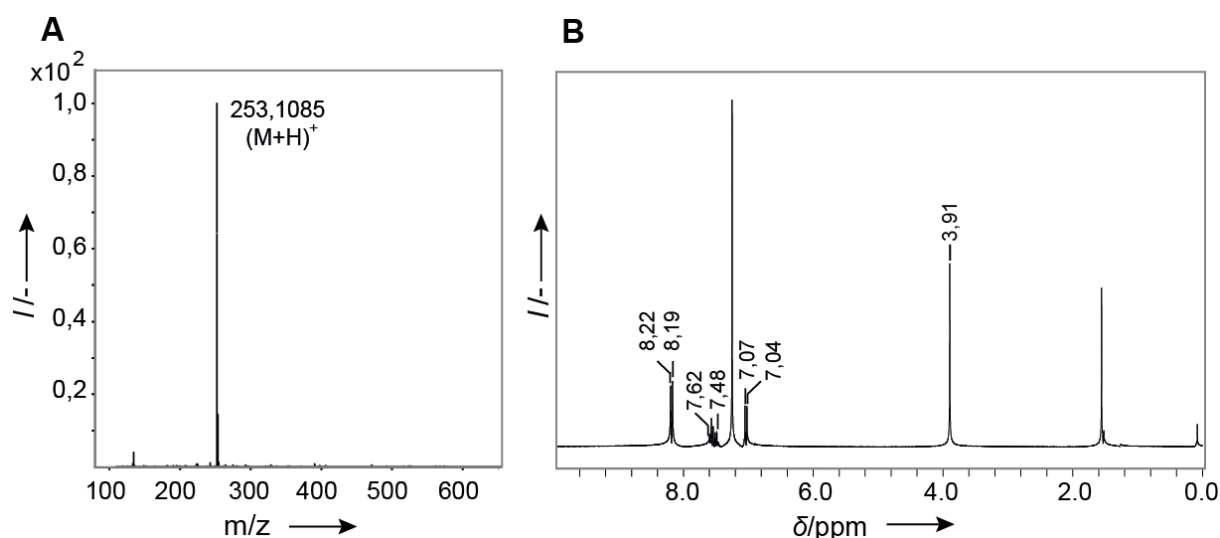


Abbildung 2.4 **Charakterisierung von Methoxy-Tetrazol mittels ESI-TOF-MS sowie ^1H -NMR.** A) In der massenspektrometrischen Analyse konnte die erwartete Masse (ber. $[M+H]^+=253,11$ m/z; det. $[M+H]^+=253,11$ m/z) detektiert werden. B) Das ^1H -NMR-Spektrum zeigte die erwarteten Multiplizitäten und chemischen Verschiebungen der Protonensignale.^[183] ^1H -NMR (300 Hz, $CDCl_3$) δ 8,20 (d, $J=9,0$ Hz, 4H), 7,63-7,50 (m, 3H), 7,27 ppm ($CHCl_3$), 7,08-7,04 (d, $J=9,0$ Hz, 2H), 3,91 (s, 3H), δ 1,56 ppm (ddH_2O).

Die erhaltenen Daten zeigten, dass Methoxy-Tetrazol **6** erfolgreich synthetisiert und gereinigt wurde. Im Folgenden sollte die Bildung eines fluoreszierenden Pyrazolins überprüft werden. Als Dipolarophil wurde dafür zunächst Acrylamid eingesetzt, da es leichter zugänglich war als die modifizierten Kappenstrukturen, aber eine ähnliche LUMO-Energie wie diese aufwies. Dies ging aus Kalkulationen der Grenzorbitalenergien verschiedener Nitril-Imine sowie der modifizierten Kappenstrukturen und Acrylamid hervor, die von Prof. Herrmann (Institut für Anorganische Chemie, Universität Hamburg) durchgeführt worden waren (Kapitel 2.7.1). Die Energiedifferenz $HOMO_{Dipol}/LUMO_{Dipolarophil}$ liegt für das System Tetrazol **6**/Acrylamid bei $\Delta E=2,35$ eV. Für diese Modell-Photoclick-Reaktion wurde eine Umsetzung von **6** mit Acrylamid durch 10-minütige Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht (254 nm) induziert und die Bildung eines fluoreszierenden Produkts überprüft. Die Analyse erfolgte durch Anregung der entsprechenden Proben bei 365 nm und Detektion fluoreszierender Signale im Bereich von 400-550 nm. Es zeigte sich, dass Methoxy-Tetrazol **6** mit Acrylamid zur Bildung eines fluoreszierenden Produkts führt, dessen Emissionsmaximum bei 465 ± 5 nm liegt. In den Negativkontrollen, welche die Probe vor Belichtung sowie eine Reaktion ohne das Substrat Acrylamid beinhalteten, wurde die Bildung eines solchen Produkts nicht beobachtet (Abbildung 2.5).

Auch die Synthese und Reinigung von Benzoat-Tetrazol (5-(4-Methoxybenzoat)-2-phenyl-2H-tetrazol) **7** konnte erfolgreich durchgeführt werden, wie Analysen mittels ESI-TOF-MS sowie ^1H -NMR zeigten (Daten im Anhang, Kapitel 8.5) Hierbei konnte

massenspektrometrisch die erwartete Masse $[M+H]^+ = 281,1$ m/z detektiert und die erwarteten Protonensignale^[183] mittels NMR nachgewiesen werden. Benzoat-Tetrazol **7** lag als weißer Feststoff vor. Es wurden 31,5 mg erhalten, was einer Ausbeute von 4,5 %, bezogen auf die eingesetzte Menge Anilin (2,5 mmol) entspricht. Benzoat-Tetrazol **7** wurde ebenfalls mit Acrylamid als Substrat in einer Photoclick-Reaktion umgesetzt. Die Analyse des gebildeten Produkts zeigte, dass ein grün-fluoreszierendes Pyrazolin entsteht, welches ein Fluoreszenzmaximum von 535 ± 5 nm aufweist. Auch hier zeigten entsprechende Negativkontrollen, dass die beobachtete Fluoreszenz spezifisch durch Bildung des Addukts hervorgerufen wird (Abbildung 2.5).

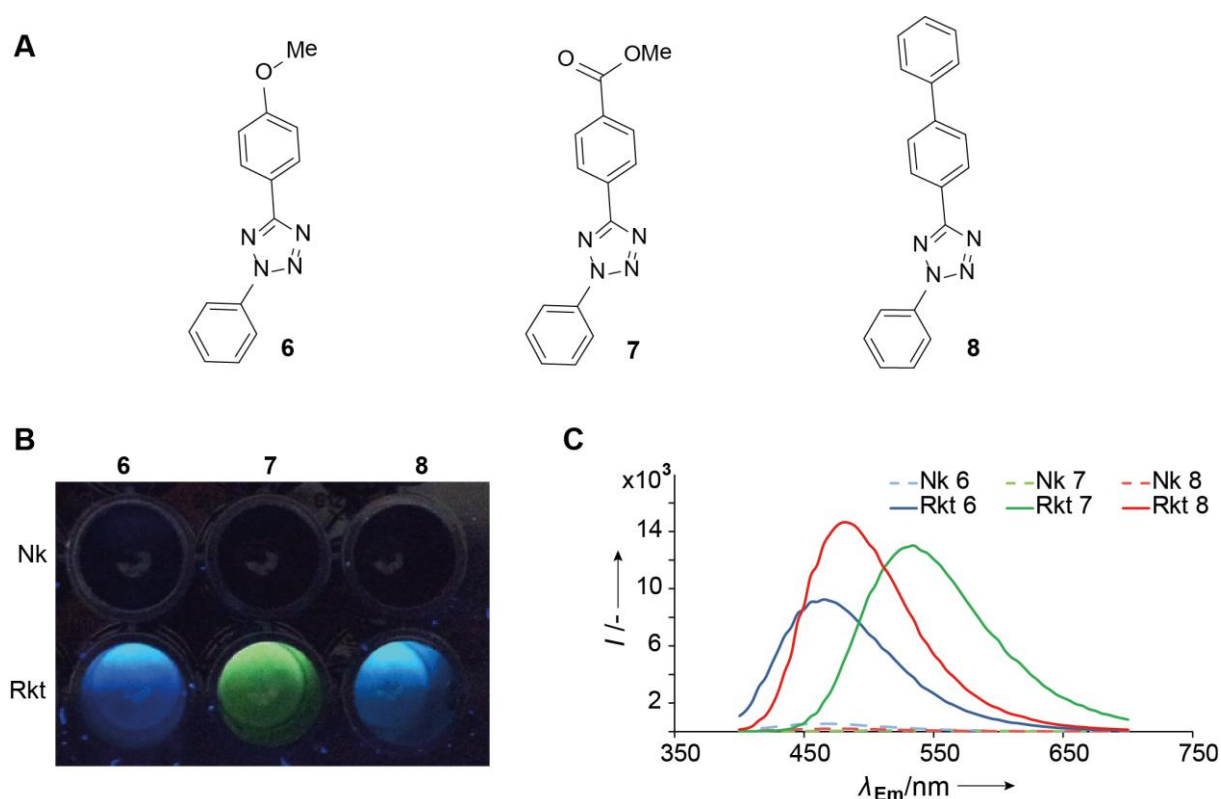


Abbildung 2.5 **Strukturformeln synthetisierter Tetrazole sowie Fluoreszenzeigenschaften der erhaltenen Pyrazoline unter Verwendung von Acrylamid als Dipolarophil.** A) Strukturformeln und Nummerierungen synthetisierter Tetrazole. B) Die Tetrazole (**6-8**) wurden in Anwesenheit von Acrylamid (Rkt) beziehungsweise H₂O als Negativkontrolle (Nk) 10 min bei einer Wellenlänge von 254 nm bestrahlt. Die Fluoreszenz der gebildeten Pyrazoline ($\lambda_{\text{Ex}} = 365$ nm) wurde fotografisch dokumentiert. C) Fluoreszenzspektren der in B) dargestellten Proben. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 365 nm.

Die massenspektrometrische Analyse mittels ESI-TOF-MS zeigt, dass auch Biphenyl-Tetrazol (5-(Biphenyl)-2-phenyl-2H-tetrazol) **8** erfolgreich synthetisiert und gereinigt wurde (Daten im Anhang, Kapitel 8.5).

Dieses Tetrazol wurde in einer Ausbeute von 3,1 % (46 mg) bezogen auf Anilin (5,0 mmol) erhalten und lag als violetter Feststoff vor. Die Umsetzung mit Acrylamid als Substrat führte

zur Bildung eines blau-fluoreszierenden Produkts, welches ein Emissionsmaximum von 485 ± 5 nm aufweist.

Die hier beschriebenen Tetrazole wurden zur Etablierung einer Photoclick-basierten Fluoreszenzmarkierung der eukaryotischen mRNA-Kappe eingesetzt (Kapitel 2.7).

2.3 Charakterisierung der Trimethylguanosinsynthasen hTgs1 und GlaTgs2

Eine Voraussetzung zur erfolgreichen Etablierung eines chemo-enzymatischen Ansatzes ist der spezifische, enzymkatalysierte Transfer einer reaktiven Gruppe auf das jeweilige Zielmolekül. Zur Markierung eukaryotischer mRNAs sollten daher Enzyme genutzt werden, die ein charakteristisches Merkmal dieser Spezies erkennen und modifizieren. Die Trimethylguanosinsynthasen des Menschen sowie des Darmparasiten *Giardia lamblia* erfüllen diese Merkmale. Beide Enzyme wurden *in vitro* bereits charakterisiert und es ist bekannt, dass sie spezifisch eine Hypermethylierung von N^2 des für die mRNA-Kappe charakteristischen N^7 -methylierten Guanosins katalysieren.^[211,225,229] Diese in der Literatur beschriebenen Ergebnisse sollten zunächst reproduziert und die hierfür erforderlichen Arbeitsschritte etabliert werden. Im Folgenden sollten beide Enzyme hinsichtlich promiskuitiver Aktivitäten gegenüber AdoMet-Analoga getestet werden, um sie so für die Modifizierung der mRNA-Kappe nutzen zu können, wodurch diese für Markierungen mittels verschiedener Click-Reaktionen zugänglich würde.

2.3.1 Expression und Reinigung der Enzyme hTgs1 und GlaTgs2

Zunächst sollten die gewählten Enzyme rekombinant produziert, gereinigt und hinsichtlich ihrer natürlichen Aktivität untersucht werden. Das Gen, das für die jeweilige Trimethylguanosinsynthase codiert, wurde hierfür zunächst in den Vektor pRSET-A kloniert, so dass es als Fusionskonstrukt mit einem N-terminalen His-Tag exprimiert werden konnte. Die rekombinant hergestellten Enzyme wurden anschließend affinitätschromatographisch unter Verwendung einer Ni(II)-haltigen Säule sowie eines Imidazol-Gradienten gereinigt. Proben der einzelnen Produktions- und Reinigungsschritte wurden analysiert. Hierzu wurden diese auf 10 %ige Tris-Tricin-Gele aufgetragen und die enthaltenen Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes elektrophoretisch getrennt. Der Nachweis aller enthaltenen Proteine erfolgte durch Färbung der Gele mit *Coomassie Brilliant Blau*. Sowohl nach Induktion der Genexpression, als auch in den gereinigten Fraktionen der humanen Trimethylguanosin-

synthese hTgs1 konnte eine deutliche Bande bei dem erwarteten Molekulargewicht von 30,4 kDa nachgewiesen werden. Die Reinigung von GlaTgs2 führte wie erwartet zur Elution eines Proteins mit einem Molekulargewicht von etwa 33,2 kDa (Abbildung 2.6).

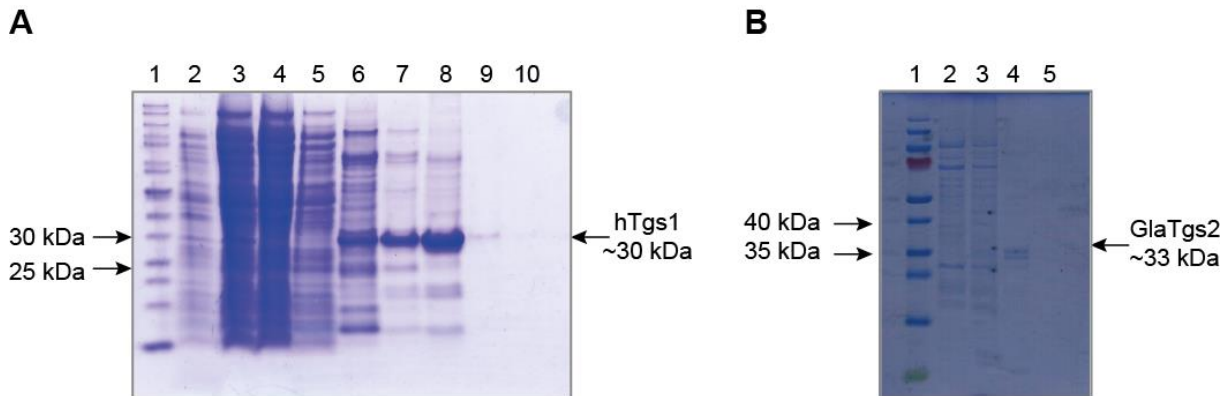


Abbildung 2.6 **Analyse der Produktion und Reinigung von hTgs1 und GlaTgs2.** Die Bestandteile der Proben wurden mittels dSDS-PAGE (10 %iges Tris-Tricin-Gel, nicht-reduzierende Bedingungen) entsprechend des Molekulargewichts getrennt und Proteine durch Färbung mit *Coomassie Brilliant Blau* nachgewiesen. **A)** Analyse der Reinigung von hTgs1 (30,4 kDa). Bahn 1: *PAGERuler Unstained Protein Ladder*, Bahn 2: Zellextrakt vor Induktion, Bahn 3: Lysat, Bahn 4: Durchlauf, Bahn 5: Waschfraktion, Bahnen 6-10: Elutionsfraktionen. **B)** Analyse der Reinigung von GlaTgs2 (33,2 kDa). Bahn 1: *PAGERuler Prestained Protein Ladder*, Bahnen 2-5: Elutionsfraktionen.

Um zu überprüfen, ob die entsprechende Bande dem jeweils gewünschten Protein entsprach, wurden nach gelelektrophoretischer Trennung Immunblots unter Verwendung des *penta* His-Antikörpers durchgeführt. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die Proteine, welche die erwarteten Molekulargewichte zeigten, auch über einen *His-Tag* verfügten. Somit konnte angenommen werden, dass beide Enzyme erfolgreich produziert und gereinigt worden waren. Fraktionen, welche das jeweilige Enzym enthielten, wurden vereinigt und dialysiert. Die gereinigten Enzyme wurden abschließend nach gelelektrophoretischer Trennung durch *Coomassie Brilliant Blau*-Färbung und Anfertigung eines Immunblots charakterisiert (Abbildung 2.7).

Die erhaltenen, gereinigten Proteine sollten anschließend hinsichtlich ihrer Methyltransferaseaktivität unter Verwendung von m^7 GTP als Substrat und *S*-Adenosyl-L-methionin (SAM, AdoMet, **12**) als Cosubstrat charakterisiert werden. Durch diese Enzymaktivitätstests, deren Ergebnisse in Kapitel 2.3.2 dargestellt sind, sollten sowohl die Identitäten der gereinigten Proteine abschließend bestätigt als auch notwendige Arbeitsschritte zur Untersuchung promiskuitiver Aktivitäten etabliert werden.

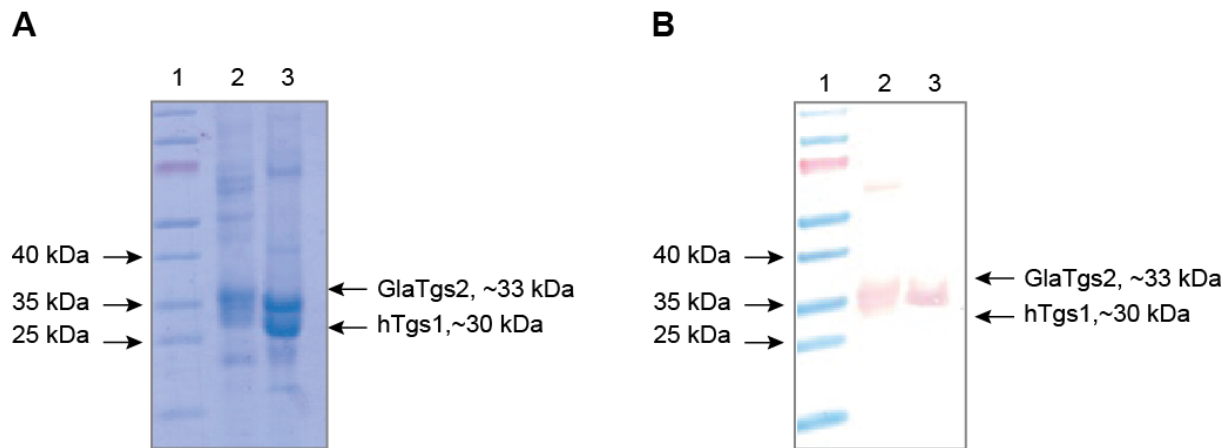


Abbildung 2.7 **Analyse der gereinigten Enzyme hTgs1 und GlaTgs2.** **A)** Charakterisierung von hTgs1 und GlaTgs2 durch *Coomassie Brilliant Blau*-Färbung. Die gereinigten Enzyme wurden nach dSDS-PAGE (10 %iges Tris-Tricin-Gel, nicht-reduzierende Bedingungen) durch Färbung mit *Coomassie Brilliant Blau* analysiert. **B)** Immunblot von hTgs1 und GlaTgs2. Nach Durchführung einer dSDS-PAGE (10 %iges Tris-Tricin-Gel, nicht-reduzierende Bedingungen) erfolgte der Nachweis von His-Tags mittels eines Immunblots. Für die Detektion wurde *penta* His-IgG (1: 2 000 in 2 % (w/v) BSA-PBS) als Primär- sowie anti-mouse-IgG-AP (1: 30 000 in 2 % (w/v) BSA-PBS) als Sekundärantikörper eingesetzt. Bahn 1: *PAGERuler Prestained Protein Ladder*, Bahn 2: GlaTgs2, Bahn 3: hTgs1.

Um die Biokonversionen unter definierten, reproduzierbaren Bedingungen durchführen zu können, wurden die Konzentrationen der gereinigten Proteine mittels der *Software LabImage 1D Gel and Western Blot Analysis* im Vergleich zu einer BSA-Standradreihe bestimmt. Die Auswertung der erhaltenen Daten ergab, dass nach der Reinigung 2 ± 1 mg hTgs1/L Kultur und $1 \pm 0,4$ mg GlaTgs2/L Kultur erhalten wurden. Dabei konnte hTgs1 in Konzentrationen von $0,8 \pm 0,5$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (23 ± 16 μM) sowie GlaTgs2 in Konzentrationen von $0,8 \pm 0,2$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (23 ± 7 μM) erhalten werden.

2.3.2 Colorimetrischer und chromatographischer Nachweis der Enzymaktivität von Trimethylguanosinsynthasen

Die gereinigten Enzyme wurden zunächst zur Katalyse des Methyltransfers von AdoMet **12** auf das Stickstoffatom N^2 der $m^7\text{G}$ -Struktur eingesetzt, wobei AdoHcy **13** als Coprodukt gebildet wird. Hierdurch sollte zum einen verifiziert werden, dass es sich bei den erhaltenen Proteinen um Trimethylguanosinsynthasen handelte. Zum anderen waren die Durchführungen und Analysen von Biokonversionen mit den natürlichen Substraten, $m^7\text{G}$ und AdoMet **12**, essentiell, um Methoden zur Charakterisierung der Enzyme etablieren zu können. Hierfür sollten zwei unterschiedliche Strategien verfolgt werden. So sollte ein HTS-Assay (*high throughput screening-assay*) etabliert werden, welcher die Hypermethylierung der mRNA-Kappe direkt aus Lysat Tgs-produzierender *E. coli*-Zellen erlauben sollte. Als Grundlage hierfür diente eine Veröffentlichung von Hendricks *et al.*, die eine Strategie zum Nachweis

der Methylierung von Salicylsäure durch die Salicylsäure-Carboxyl-Methyltransferase (SAMT) beschreibt, wobei die Bildung des Nebenprodukts AdoHcy **13** zum Nachweis der Methyltransferreaktion genutzt wird.^[238] Neben eines HTS sollte weiterhin ein Protokoll basierend auf einer Veröffentlichung von Monecke *et al.* etabliert werden.^[227] In diesem Fall sollten die Komponenten einer Biokonversionen mittels RP-HPLC (*reversed phase high performance liquid chromatography*) chromatographisch getrennt und in Abhängigkeit ihrer Retentionszeiten spektroskopisch detektiert werden. Im Gegensatz zum HTS-Ansatz kann so zwar nur eine geringere Anzahl an Proben analysiert werden, allerdings bietet die HPLC-basierte Methode den Vorteil, dass die Bildung hypermethylierter Produkte direkt nachweisbar ist.

Die Ergebnisse zur Etablierung beider Strategien unter Verwendung der Trimethylguanosinsynthasen hTgs1 und GlTgs2 sind in den Abschnitten 2.3.2.1 und 2.3.2.2 zusammengefasst.

2.3.2.1 Nachweis der natürlichen Trimethylguanosinsynthaseaktivität mittels eines HTS

Der HTS, welcher in dieser Arbeit zum Nachweis der Trimethylguanosinsynthaseaktivität etabliert werden sollte, basiert auf einer Veröffentlichung von Hendricks *et al.* aus dem Jahr 2004.^[238] Bis zu diesem Zeitpunkt wurde die Aktivität von Methyltransferasen meist unter Verwendung des radioaktiv markierten Cosubstrats ¹⁴C-AdoMet oder ³H-AdoMet bestimmt. Um das Arbeiten mit radioaktiven Substanzen zu umgehen, entwickelte die Gruppe um Zhou eine Methode, um das Coprodukt der Reaktion AdoHcy **13** direkt nachzuweisen. Für diese Studie nutzten sie die Biokonversion von Salicylsäure zu Methylsalicylat, katalysiert durch die Salicylsäure-Carboxyl-Methyltransferase (SAMT). Dieses Enzym, wie auch die Mehrzahl aller bekannten Methyltransferasen, nutzt einen S_N2-Mechanismus, um eine Methylgruppe von dem Cosubstrat AdoMet **12** auf das jeweilige, Methyltransferase-spezifische Substrat, in diesem Fall Salicylsäure, zu übertragen. Obwohl alle Methyltransferasen die Methylierung unterschiedlicher Substrate katalysieren, wird in allen diesen Reaktionen AdoHcy **13** aus dem Cosubstrat AdoMet **12** gebildet. Hendricks *et al.* nutzten die Bildung dieses Coprodukts, um Methyltransferaseaktivität zu detektieren. In einem zweistufigen enzymatischen Prozess wurde hierzu Homocystein aus AdoHcy **13** gebildet. In einem ersten Schritt wurde MTAN (5'-Methylthioadenosin/S-Adenosylhomocystein Nukleosidase, AdoHcy Nukleosidase) eingesetzt, welches AdoHcy **13** zu Adenin und S-Ribosylhomocystein umsetzt. Letzteres stellt ein Substrat für das Enzym LuxS (S-Ribosylhomocystein Lyase) dar, welches hieraus Homocystein und 4,5-Dihydroxypentan-2,3-dion bildet. Die Thiolgruppe des Homocysteins

wurde dann diskontinuierlich durch 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellmanns Reagenz) nachgewiesen. Durch Bildung einer Disulfidbrücke mit Homocystein wird hieraus TNB freigesetzt, welches ein Absorptionsmaximum bei 414 nm besitzt und so spektroskopisch nachgewiesen werden kann. Ein entsprechendes Schema dieses Assays, adaptiert zur Detektion der Trimethylguanosinsynthaseaktivität, ist in Abbildung 2.8 dargestellt.

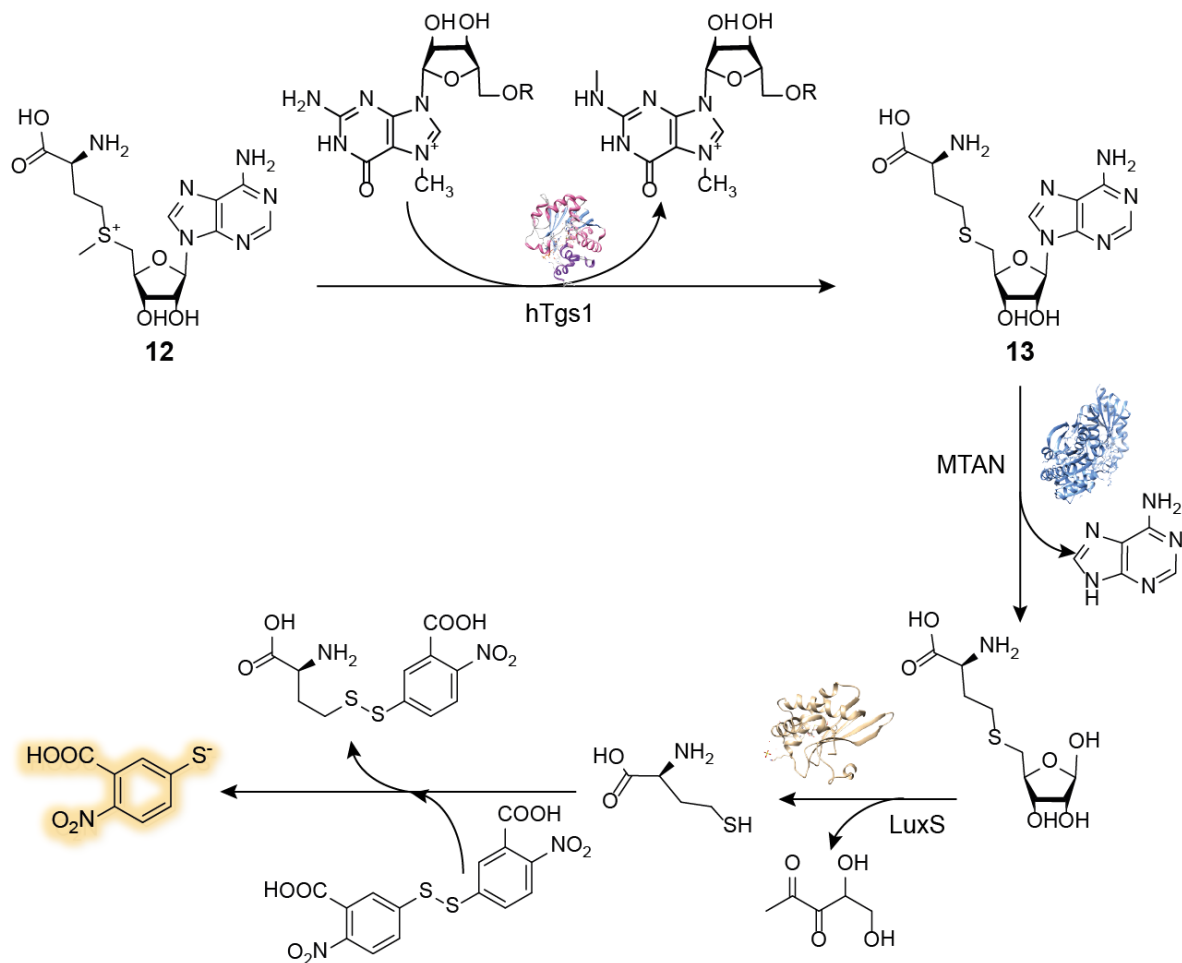


Abbildung 2.8 **Reaktionsschema zur colorimetrischen Detektion der Trimethylguanosinsynthaseaktivität.** Trimethylguanosinsynthasen, hier hTgs1 (rosa, PDB: 3GDH), katalysieren den Methyltransfer von einer Methylgruppe von dem Cosubstrat AdoMet **12** auf die mRNA-Kappe m⁷G (R=Triphosphat). Neben der hypermethylierten Kappe wird AdoHcy **13** gebildet. Letzteres wird durch MTAN (blau, PDB: 3O4V) hydrolysiert, wobei Adenin und Ribosylhomocystein gebildet werden. LuxS (braun, PDB: 2FQT) spaltet Ribosylhomocystein zu 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion und Homocystein. Die gebildete Thiolgruppe kann durch DTNB nachgewiesen werden, wobei dieses eine Disulfidbrücke mit Homocystein ausbildet und dabei TNB freigesetzt wird. TNB kann durch Messung der Absorption bei 414 nm nachgewiesen und quantifiziert werden.

Der Assay von Hendricks *et al.* bietet verschiedene Vorteile. Das Arbeiten mit radioaktiven Substanzen wird vermieden. Außerdem wird das Coprodukt AdoHcy **13** in diesem Assay abgebaut, wodurch eine mögliche Produktinhibierung der Methyltransferasen umgangen wird. Da das Coprodukt der Reaktion nachgewiesen wird, kann diese Methode außerdem zur

Charakterisierung einer Vielzahl verschiedener Methyltransferasen eingesetzt werden. Weiterhin kann diese Strategie auch bei der Verwendung von AdoMet-Analoga zum Aktivitätsnachweis eingesetzt werden, da unabhängig von der transferierten Gruppe das Coprodukt der Reaktion immer AdoHcy **13** ist.

Der beschriebene Assay könnte daher unter Umständen auch genutzt werden, um Trimethylguanosinsynthasen hinsichtlich promiskuitiver Aktivitäten zu charakterisieren. Für die Etablierung dieser Methode war es zunächst nötig, die entsprechenden Enzyme zu produzieren und zu reinigen, sowie den Assay von Hendricks *et al.* zum Nachweis von Trimethylguanosinsynthaseaktivität zu etablieren.

2.3.2.1.1 Produktion, Reinigung und Charakterisierung von MTAN und LuxS

Um den Assay zu etablieren, wurden die Enzyme MTAN und LuxS benötigt. Diese katalysieren die Degradation von S-Adenosylhomocystein **13** zu Homocystein und ermöglichen hierdurch den Nachweis von Methyltransferaseaktivität auf Basis von DTNB.

Die Plasmide pProEx-MTAN sowie pET-29a-LuxS, welche für diese Enzyme codieren, wurden durch Frau Prof. Dräger und Frau Dr. Sichart (Universität Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt und für die Produktion der Proteine eingesetzt. Die anschließende Reinigung erfolgte mithilfe des jeweils codierten His-Tags über eine Ni(II)-NTA-Säule. Die einzelnen Schritte der Reinigung wurden nach gelelektrophoretischer Trennung durch Coomassie Brilliant Blau-Färbung überprüft (Abbildung 2.9).

Es konnte in den Elutionsfraktionen jeweils eine deutliche Bande bei einem erwarteten Molekulargewicht von 28,8 kDa für MTAN bzw. von 23 kDa für LuxS nachgewiesen werden. Die entsprechenden Proben wurden dialysiert und die Konzentration des jeweiligen gereinigten Enzyms bestimmt. MTAN konnte in einer Konzentration von 10 mg/mL erhalten werden, was einer Ausbeute von 72 mg/L Kultur entspricht. Die für LuxS bestimmte Konzentration lag bei 13 mg/mL. Dies entspricht einer Ausbeute von 20 mg/L Kultur.

Die gereinigten Enzyme wurden anschließend hinsichtlich ihrer Aktivität getestet. Hierzu wurden 1,2 mM AdoHcy **13** mit LuxS (17 μ M) und MTAN (3 μ M) bei 37 °C inkubiert und die Reaktion nach verschiedenen Zeitintervallen gestoppt. Die Homocysteinbildung wurde jeweils durch DTNB detektiert. Als Kontrolle wurde die Reaktion sowohl ohne Enzyme als auch ohne AdoHcy **13** durchgeführt. Letztgenannte Kontrolle war besonders wichtig, da durch Reaktion der Thiolgruppen von Proteinen mit DTNB ein Hintergrundsignal erhalten wurde. Bei der Etablierung und Durchführung des Assays musste daher beachtet werden, dass die jeweils detektierte Absorption der Proben von dem Hintergrundsignal unterscheidbar war.

Erst hierdurch konnte verifiziert werden, dass eine Bildung von Homocystein aus AdoHcy **13** als Coprodukt eines Methyltransfers stattgefunden hatte und das Signal nicht durch Thiolgruppen der verwendeten Enzyme hervorgerufen wurde.

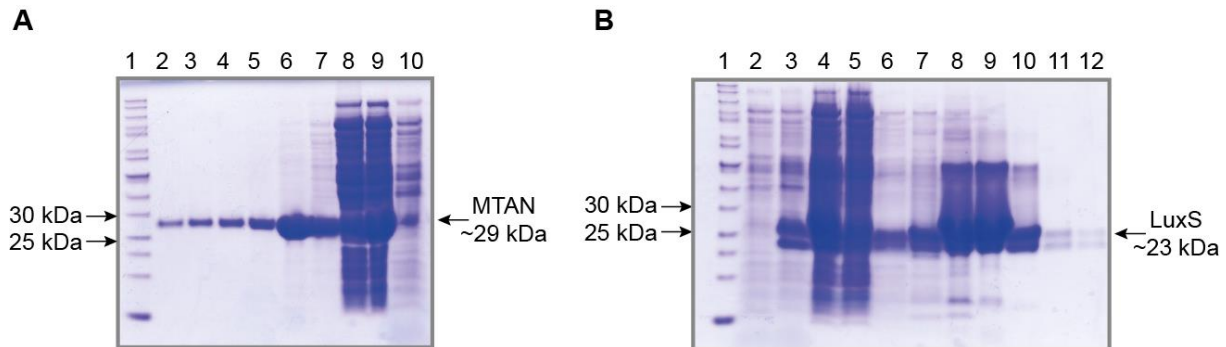


Abbildung 2.9 **Analyse der Expression und Reinigung von MTAN und LuxS.** Proben der Reinigungen von MTAN und LuxS wurden nach dSDS-PAGE (10 %iges Tris-Tricin-Gel, nicht-reduzierende Bedingungen) durch Färbung mit *Coomassie Brilliant Blue* analysiert. **A)** Analyse der Reinigung von MTAN (28,8 kDa). Bahn 1: *PAGERuler Unstained Protein Ladder*, Bahnen 2-6: Elutionsfraktionen, Bahn 7: Waschfraktion, Bahn 8: Durchlauf, Bahn 9: Lysat, Bahn 10: vor Induktion. **B)** Analyse der Reinigung von LuxS (23 kDa). Bahn 1: *PAGERuler Unstained Protein Ladder*, Bahn 2: vor Induktion, Bahn 3: nach Induktion, Bahn 4: Lysat, Bahn 5: Durchlauf, Bahn 6: Waschfraktionen, Bahnen 7-12: Elutionsfraktionen.

In dieser ersten Charakterisierung der Assay-Enzyme MTAN und LuxS wurde beobachtet, dass nach einer Inkubation von drei Minuten ein Wert von 0,8 a. U. und damit eine dreifach höhere Absorption der Probe im Vergleich zur Kontrolle ohne AdoHcy **13** vorlag (Abbildung 2.10). Hierdurch konnte eine Aktivität der gereinigten Enzyme nachgewiesen werden. Auf Basis der katalytischen Wechselzahlen der Enzyme, von $0,02 \text{ sec}^{-1}$ - $0,07 \text{ sec}^{-1}$ (abhängig von Metallionen) für LuxS^[239] und 46 sec^{-1} für MTAN,^[240] wurde angenommen, dass in einem Zeitraum von drei Minuten der Umsatz von mindestens 18 nmol (60 μM) AdoHcy **13** katalysiert worden sein müsste. In der Probe sollten somit noch 342 nmol AdoHcy **13** als Substrat vorliegen. Dies konnte durch Analyse der Reaktion nach weiteren sieben Minuten Inkubation bestätigt werden. Hier war eine Zunahme der Absorption von 0,8 a. U. auf 1,0 a. U. zu beobachten, was bestätigte, dass ein weiterer Abbau von AdoHcy **13** zu Homocystein durch LuxS und MTAN erfolgt war. Das Signal der Probe war zu diesem Zeitpunkt 6,2x höher als das der Kontrolle ohne AdoHcy **13** (Abbildung 2.10).

Im Weiteren wurde das Detektionslimit der Biokonversion von AdoHcy **13** durch MTAN und LuxS bestimmt. Hierzu wurden die Enzyme mit unterschiedlichen Konzentration AdoHcy **13** inkubiert. Als Kontrolle wurde die Reaktion ohne Substrat **13** durchgeführt. Die Reaktionen wurden nach zehn Minuten gestoppt und die Bildung von Homocystein durch Reaktion mit DTNB quantifiziert. Dabei konnte, im Einklang mit Hendricks *et al.*,^[238] ein linearer

Zusammenhang von AdoHcy-Konzentration und Absorptionsintensität in einem Bereich von 10 μM bis etwa 200 μM initialer Substratkonzentration **13** beobachtet werden. Aus den erhaltenen Daten wurde eine Anfangskonzentration von $7 \pm 0,8 \mu\text{M}$ AdoHcy **13** als Nachweisgrenze bestimmt (Abbildung 2.10).

Bei dieser Konzentration AdoHcy **13** konnte durch MTAN und LuxS innerhalb von zehn Minuten eine nachweisbare Menge Homocystein gebildet werden. Die Nachweisgrenze wurde definiert als die Konzentration, deren Absorption dem Hintergrundsignal inklusive dessen dreifacher Standardabweichung entsprach. Versuche, das Hintergrundsignal (verursacht durch Thiole der Proteine) zu reduzieren, (beispielsweise durch Fällung der Proteine oder durch Immobilisierung auf einer Nickel-Agarose-Matrix) brachten keine Verbesserung.

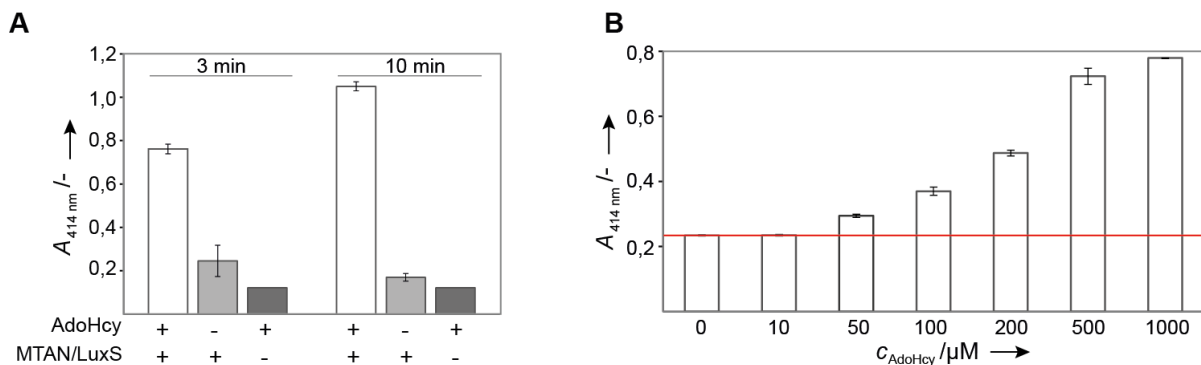


Abbildung 2.10 Aktivitätstest der Enzyme MTAN und LuxS sowie Bestimmung des Detektionslimits für die Biokonversion von AdoHcy zu Homocystein. **A)** Aktivitätstest der Assay-Enzyme. Die Enzyme MTAN und LuxS wurden mit 1,2 mM AdoHcy **13** (weiß) inkubiert, die Reaktion wurde nach 3 min sowie nach 10 min gestoppt und die Absorption der Probe bei 414 nm gemessen. Als Kontrollen wurden die Reaktionen ohne Substrat AdoHcy **13** (hellgrau) bzw. ohne die Enzyme (dunkelgrau) durchgeführt. Die Absorptionen der jeweiligen Proben sowie die Standardabweichungen (Dreifachbestimmung) sind dargestellt. **B)** Linearer Zusammenhang von AdoHcy-Konzentration/Absorption und Detektionslimit der Biokonversion von AdoHcy **13** zu Homocystein durch MTAN und LuxS. Unterschiedliche Konzentrationen AdoHcy **13** wurden in Gegenwart von MTAN und LuxS zu Homocystein umgesetzt. Die Reaktionen wurden nach 10 min gestoppt und die Absorption bei 414 nm bestimmt. Als Kontrolle wurde die Reaktion ohne AdoHcy **13** (0) durchgeführt. Die Nachweisgrenze (rote Linie) ist angegeben.

2.3.2.1.2 Nachweis von hTgs1-Aktivität und Screening von Inhibitoren mittels HTS

In dieser Arbeit konnte zunächst die Funktionalität der Enzyme MTAN und LuxS verifiziert sowie die Nachweisgrenze für die Konversion von AdoHcy **13** zu Homocystein bestimmt werden. Im Folgenden sollten diese Enzyme genutzt werden, um die Aktivität von hTgs1 in einem 96-well Format colorimetrisch nachzuweisen. Finales Ziel war es, den Assay direkt aus Lysat durchführen zu können. Hierdurch sollte es möglich werden, eine Vielzahl von Enzym-

Varianten gleichzeitig hinsichtlich ihrer Aktivität auf AdoMet **12** oder dessen Analoga zu testen.

Zunächst musste ein entsprechendes Verfahren mit dem gereinigten Enzym hTgs1 etabliert werden. Dabei war es erforderlich, den Assay hinsichtlich Inkubationsdauer und Substratkonzentration zu optimieren, da die Daten aus den Vorversuchen mit LuxS und MTAN (Abschnitt 2.3.2.1.1) hierfür nicht direkt übertragen werden konnten. Dies hatte verschiedene Gründe. Die katalytische Effizienz der Trimethylguanosinsynthase hTgs1 ist mit einem k_{cat} -Wert (Wechselzahl, katalytische Konstante) von $0,73 \text{ min}^{-1}$ (bezogen auf den ersten Methyltransfer mit m^7GpppA als Substrat)^[211] geringer als die der Assay-Enzyme, so dass der Methyltransfer den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Assays darstellt. Dies bedeutet, dass die Reaktion entsprechend länger inkubiert werden muss, um eine nachweisbare Menge AdoHcy **13** zu erhalten. Durch die Enzyme MTAN und LuxS wird gleichzeitig Homocystein aus jedem gebildetem Molekül AdoHcy **13** freigesetzt. Da die Inkubationsdauer verlängert werden muss, kann es in Folge zu einer Oxidation des erzeugten Homocysteins kommen. Der Umsatz von $10 \text{ }\mu\text{M}$ AdoMet **12** durch hTgs1 würde demnach nicht zur Generierung von $10 \text{ }\mu\text{M}$ nachweisbarem Homocystein führen (was als Nachweisgrenze in den Vorversuchen bestimmt wurde), da die effektive Konzentration an Homocysteins durch Oxidation verringert würde. Um diese Oxidationsverluste auszugleichen, sollte daher über einen längeren Zeitraum eine gleichbleibend hohe Generierung von AdoHcy **13** durch hTgs1 gewährleistet werden. Hierzu sollten die Konzentrationen der Substrate angepasst werden, um über den gesamten Zeitraum der Messung den Ablauf der Reaktion bei maximaler Geschwindigkeit sicherzustellen.

Weiterhin wurde erwartet, dass die Nachweisgrenze auch durch die Methyltransferase selbst beeinflusst würde, da diese aufgrund enthaltener Thiole zum Hintergrundsignal beiträgt. Für den Nachweis der Aktivität von hTgs1 mussten die Bedingungen des Assays somit bezüglich der Substrat- und Enzymkonzentrationen sowie der Inkubationsdauer optimiert werden.

Zunächst wurden für den Assay finale hTgs1-Konzentrationen von $2 \text{ }\mu\text{M}$ sowie Inkubationszeiten von 30 bis 90 Minuten gewählt. Da die Trimethylguanosinsynthase hTgs1 eine katalytische Konstante von $0,73 \text{ min}^{-1}$ aufweist,^[211] wurde erwartet, dass in den genannten Reaktionszeiten die Bildung von $48 \text{ }\mu\text{M}$ bis $140 \text{ }\mu\text{M}$ AdoHcy **13** durch hTgs1 katalysiert würde. Trotz Oxidation des gebildeten Homocysteins und der Anwesenheit von hTgs1 als weitere Thiol-haltige Komponente im Assay, sollte bei diesen Konzentrationen ein vom Hintergrund unterscheidbares Signal erhalten werden. Da hTgs1 eine Affinität von $30\text{--}109 \text{ }\mu\text{M}$ ^[211,225,241] gegenüber dem RNA-Substrat aufweist, wurde für den Assay m^7GTP in

einer finalen Konzentrationen von 200 μM eingesetzt. Die Affinität gegenüber AdoMet **12** liegt hingegen bei 5 μM .^[225] Um dennoch gleichbleibend hohe Transferraten über Zeiträume von 30, 60, und 90 Minuten zu gewährleisten, wurde auch AdoMet **12** in entsprechend höheren Konzentrationen von 50 μM (Probe 1), 150 μM (Probe 2) und 300 μM (Probe 3) eingesetzt. Hierüber sollten Aussagen erhalten werden, welche Bedingungen (Inkubationszeit, Substratkonzentrationen) optimal hinsichtlich des Signal/Rausch-Verhältnisses sind und gleichzeitig einen verantwortungsvollen Umgang mit Ressourcen ermöglichen.

Das durchgeführte Experiment zeigte, dass nach 30 Minuten unabhängig von der AdoMet-Konzentration unter allen getesteten Reaktionsbedingungen eine signifikant höhere Absorption in der Reaktion als in der entsprechenden Negativkontrolle detektiert wurde. Hierdurch konnte die hTgs1-Aktivität erfolgreich nachgewiesen werden. Es zeigte sich außerdem, dass das detektierte Signal umso höher war, je höher die initiale AdoMet-Konzentration war. Dies kann auf Basis der Wechselzahl k_{cat} erklärt werden. Nach 30 Minuten müssten demnach bereits 48 μM AdoMet umgesetzt worden sein. Im Falle der Probe 1 wurde AdoMet **12** lediglich in einer Anfangskonzentration von 50 μM eingesetzt, so dass zu diesem Zeitpunkt nur noch 2 μM AdoMet **12** vorliegen sollten. Die Umsetzung von m^7GTP zu $\text{m}^{2,2,7}\text{GTP}$ durch hTgs1 würde hier nicht mehr mit maximaler Geschwindigkeit ablaufen und damit pro Zeiteinheit weniger Homocystein als in Proben mit 150 μM bzw. 300 μM AdoMet gebildet werden. Diese Reaktionen sollten somit über einen längeren Zeitraum bei maximaler Geschwindigkeit ablaufen, so dass hier auch zu späteren Zeitpunkten eine Zunahme der Homocysteinkonzentration zu beobachten sein sollte. Dies konnte durch Messung der Homocysteinkonzentration nach 60 Minuten bestätigt werden. Die Proben 2 und 3 zeigten hier eine Zunahme der Absorption, was auf weitere Bildung von Homocystein zurückzuführen war. Hingegen konnte auch nachgewiesen werden, dass AdoMet **12** in Probe 1 nahezu verbraucht war und keine signifikante Zunahme der Absorption beobachtet werden konnte. Nach 90 Minuten wurde auch in der Probe 2, welche 150 μM AdoMet **12** enthalten hatte, keine weitere Bildung von Homocystein beobachtet. Auch dies ist in guter Übereinstimmung mit den kalkulierten Umsätzen auf Basis der Wechselzahl k_{cat} , da sich hieraus ergibt, dass nach 90 Minuten 144 μM AdoMet **12** bereits umgesetzt sein sollten. In Probe 1 konnte zu diesem Zeitpunkt sogar eine Abnahme der Absorption beobachtet werden. Daraus lässt sich schließen, dass AdoMet **12** hier als Cosubstrat in zu geringer Konzentration vorlag, so dass kein weiterer Methyltransfer erfolgte. Gleichzeitig kam es zur Oxidation von bereits zuvor gebildetem Homocystein, wodurch die nachweisbare Menge des Produkts und damit die Intensität des Signals abnahmen.

Als optimale Assay-Bedingungen zur Bestimmung der hTgs1-Aktivität wurden aus den erhaltenen Daten eine initiale AdoMet-Konzentration von 150 μM sowie eine Inkubationszeit von 60 Minuten bestimmt. Bei dieser Konzentration wurde ein 1,6-fach höheres und damit deutlich von den Kontrollen unterscheidbares Signal gemessen. Unter Verwendung von 300 μM AdoMet konnte eine 2,3-fach höhere Absorption der Probe im Vergleich zu den Kontrollen und damit ein noch besseres Signal/Rausch-Verhältnis erreicht werden (Abbildung 2.11A). In dieser Arbeit wurde allerdings im Hinblick auf einen verantwortungsvollen Umgang mit Ressourcen routinemäßig die ebenfalls ausreichende Konzentration von 150 μM AdoMet **12** zur Durchführung des Assays eingesetzt.

Durch diese Arbeiten wurde gezeigt, dass der Assay eingesetzt werden kann, um die Aktivität gereinigter hTgs1-Präparationen zu überprüfen. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob es prinzipiell möglich wäre, das Anwendungsgebiet dieser Methode zu erweitern und diese so auch zum Nachweis von RNA-Methyltransferaseinhibitoren nutzen zu können. Ein Vorteil des hier beschriebenen Assays wäre dabei, dass durch die einfache Durchführbarkeit im 96-well-Format eine Vielzahl sogenannter „*small molecules*“ hinsichtlich ihres inhibitorischen Potentials gegenüber unterschiedlichsten RNA-Methyltransferasen zu charakterisieren wäre. Die Regulierung solcher Enzyme ist unter anderem von pharmakologischem Interesse, da viele Viren eigene Methyltransferasen nutzen, um so die entsprechende virale mRNA beispielsweise mit einer Kappe zu modifizieren (zusammengefasst durch Ferron *et al.*^[242]). Durch diese Prozesse kann unter anderem die mRNA in der Wirtszelle mimikriert oder die Translationsrate erhöht werden.^[243,244] Inhibitoren, die solche Enzyme blockieren, könnten neue Therapieansätze bieten. So wurde gezeigt, dass eine Flavivirus-Methyltransferase, welche den Guanosinrest der Kappe an Position *N7* sowie das erste Nukleotid des Transkripts 2'-*O*-methyliert, als *Target* zur Behandlung einer Dengue Virus-Infektion genutzt werden könnte.^[245] Lim *et al.* untersuchten mittels eines radioaktiven Assays verschiedene kleine Moleküle, die sie auf der Grundlage der Kristallstruktur des Proteins als potentielle Inhibitoren identifiziert hatten.^[246] Durch dieses rationale Design konnten erfolgreich Inhibitoren vorhergesagt werden. Allerdings war hierbei eine weitere Charakterisierung einer Vielzahl kleiner Moleküle, die unter Umständen bessere inhibitorische Parameter aufweisen würden, nicht möglich. Weiterhin ist die Methode des rationalen Designs nur durchführbar, wenn die Struktur des zu inhibierenden Enzyms bekannt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Möglichkeit untersucht, auf Basis des oben beschriebenen Assays, Inhibitoren für hTgs1 zu identifizieren. Als potentielle Inhibitoren wurden (-)-Epigallocatechingallat, Kaffeesäure sowie Chlorogensäure gewählt, da diese als

Inhibitoren verschiedener Methyltransferasen beschrieben und käuflich erwerbbar sind.^[247,248] Zur Charakterisierung der inhibitorischen Eigenschaften dieser Moleküle gegenüber hTgs1 wurde der Assay in Anwesenheit von 25 μM sowie 100 μM der entsprechenden Verbindungen durchgeführt. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 2.11B dargestellt.

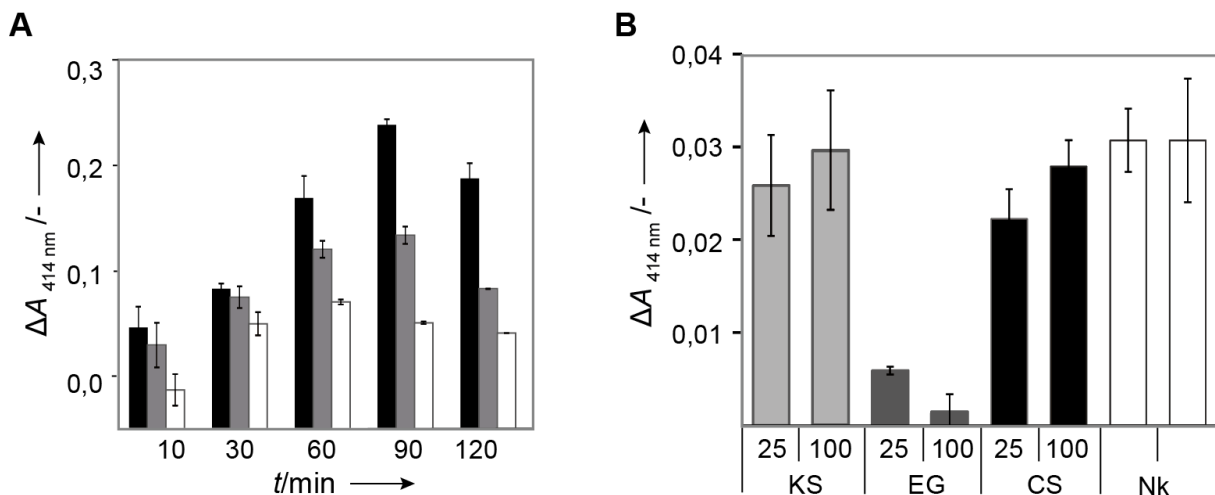


Abbildung 2.11 **Colorimetrischer Nachweis der Trimethylguanosinsynthaseaktivität.** Ausgehend von Hendricks *et al.*^[238] konnte ein Assay zum Nachweis der Trimethylguanosinsynthaseaktivität etabliert werden. **A)** Colorimetrischer Nachweis der Trimethylguanosinsynthaseaktivität in Abhängigkeit unterschiedlicher AdoMet-Konzentrationen. Das gereinigte Enzym hTgs1 wurde in Gegenwart des Substrats $m^7\text{GTP}$ sowie verschiedener Konzentrationen AdoMet **12** (300 μM , schwarz; 150 μM , hellgrau; 50 μM , weiß) inkubiert und die Reaktion zu den angegebenen Zeitpunkten gestoppt. Als Kontrolle wurden alle Reaktionen in Abwesenheit des Substrats $m^7\text{GTP}$ durchgeführt. Die Absorption wurde bei 414 nm gemessen und die Nettoabsorption ($\Delta A_{414 \text{ nm}}$) durch Subtraktion des Signals der Kontrollreaktion von der jeweiligen Reaktion bestimmt. **B)** Charakterisierung potentieller Tgs-Inhibitoren. Die Biokonversion von $m^7\text{G}$ zur hypermethylierten Kappe durch hTgs1 wurde in Gegenwart verschiedener Methyltransferaseinhibitoren (KS: Kaffeesäure; EG: Epigallocatechingallat; CS: Chlorogensäure, finale Konzentration 25 μM (25) bzw. 100 μM (100)) durchgeführt. Die Proben wurden 60 min inkubiert und die jeweils gebildete Menge Homocystein durch Zugabe von DTNB und Messung der Absorption bestimmt. Die Nettoabsorption wurde durch Subtraktion der jeweiligen Kontrolle (ohne $m^7\text{GTP}$) ermittelt.

In Gegenwart von Kaffeesäure oder Chlorogensäure konnte nahezu kein Effekt auf die Reaktion beobachtet werden. Die Absorption der Proben unterschied sich nicht signifikant von der Kontrolle ohne Inhibitor. Dies bedeutet, dass in allen Proben die gleiche Menge Homocystein pro Zeiteinheit gebildet worden war und somit keine Inhibierung von hTgs1 erfolgte. Im Falle von (-)-Epigallocatechin wurde hingegen eine deutlich geringere Absorption sowie ein konzentrationsabhängiger Effekt beobachtet. In Anwesenheit von 25 μM bzw. 100 μM des Moleküls wurde die Aktivität von hTgs1 auf 20 % bzw. 5 % reduziert. Dies lässt darauf schließen, dass (-)-Epigallocatechingallat Einfluss auf den hTgs1-katalysierten Methyltransfer hat und somit als potentieller Inhibitor dieses Enzyms betrachtet werden kann. Diese Studie zeigte, dass es möglich wäre diesen Assay zu nutzen, um eine

Vielzahl verschiedener Moleküle in einer ersten Näherung hinsichtlich ihres Einflusses auf die Enzymaktivität unterschiedlicher Methyltransferasen zu untersuchen und hierdurch die Effizienz von Inhibitor-Screenings in diesem Bereich zu verbessern.

2.3.2.1.3 Anwendung des Assays zur Bestimmung von Tgs-Aktivität aus *E. coli* Lysat

Das Auffinden einer Trimethylguanosinsynthase oder Variante hiervon, welche den Transfer chemisch-modifizierbarer Gruppen unter Nutzung sogenannter AdoMet-Analoga anstelle eines Methyltransfers katalysieren könnte, war ein essentieller Schritt dieser Arbeit. Durch ein solches Enzym sollte es möglich werden, die mRNA-Kappe zu modifizieren und so für die Markierung durch unterschiedlichste Click-Reaktionen zugänglich machen. Dabei muss beachtet werden, dass Enzyme häufig ein enges Substratspektrum aufweisen und keinesfalls immer promiskuitive Aktivität gegenüber den jeweiligen Substrat-Analoga aufweisen. Dies macht es unter Umständen nötig, eine Vielzahl von Varianten des Enzyms hinsichtlich des gewünschten Substratspektrums zu charakterisieren. Eine effiziente Methode solche Fragestellungen zu beantworten, bieten colorimetrische Detektionsmethoden, die in sogenannten Hochdurchsatzverfahren die Analyse der jeweiligen Enzymreaktion ermöglichen. Grundlage hierfür ist, dass die jeweilige Biokonversion genutzt werden kann, um ein Molekül zu erzeugen, welches durch Messung der Absorption oder Fluoreszenz nachweisbar ist. In dieser Arbeit sollte die Möglichkeit, hTgs1-Aktivität auf Basis der Generierung von Homocystein nachzuweisen, genutzt werden, um hieraus ein Hochdurchsatzverfahren zu etablieren. Eine Voraussetzung hierfür war, diesen Assay aus Lysat der jeweiligen Protein-produzierenden Zellen durchführen zu können, um im potentiellen *Screening* die Reinigung einer Vielzahl von Varianten zu umgehen.

Nachdem der Assay zur Detektion des hTgs1-katalysierten Enzymtransfers unter Verwendung des gereinigten Enzyms etabliert werden konnte (Abschnitt 2.3.2.1.2), sollte in einem nächsten Schritt Lysat als Enzymquelle eingesetzt werden. Hierfür mussten im Wesentlichen zwei Probleme gelöst werden. Zum einen musste gezeigt werden, dass eine Detektion des Produkts TNB durch Messung der Absorption bei 414 nm auch in Gegenwart des typischerweise gelblichen Lysats möglich ist. Zum anderen musste der Assay unter Bedingungen durchgeführt werden, die einen spezifischen Nachweis von gebildetem Homocystein auch in Anwesenheit zellulärer Thiole (z. B. aus Proteinen oder Glutathion) ermöglichen. Hierbei war weiterhin zu beachten, dass ein durch diese Moleküle hervorgerufenen Signal variieren würde, da in keinem Fall gleiche Zellzahlen und gleiche Konzentrationen zellulärer Thiole in jedem Lysat vorliegen würden. In dieser Arbeit konnte

jedoch gezeigt werden, dass die Detektion von Trimethylguanosinsynthaseaktivität auch aus Lysat und somit in Anwesenheit zellulärer Thiole möglich ist. Hierfür wurden verschiedene Klone hTgs1-produzierender *E. coli* TunerTM(DE3)pLacI-Zellen kultiviert und die erhaltenen Lysate für den Nachweis von Tgs-Aktivität eingesetzt. Für die erfolgreiche Etablierung des Assays aus Lysat war entscheidend, dass für jede einzelne Probe bestimmt werden konnte, welcher Anteil der gemessenen Absorption auf die jeweils vorliegenden zellulären Thiole zurückzuführen war und somit das Hintergrundsignal darstellte. Um hierüber eine Aussage zu erhalten, wurde der Assay mit jedem einzelnen Lysat sowohl in An- als auch in Abwesenheit von m⁷GTP durchgeführt und die Absorption nach Zugabe von DTNB zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Da ohne m⁷GTP als Substrat kein Methyltransfer durch hTgs1 erfolgte, wurde so das jeweils Proben-spezifische Hintergrundsignal ermittelt. Dieses konnte von der zugehörigen Reaktion, die in Anwesenheit von m⁷GTP durchgeführt wurde, subtrahiert und so die Nettoabsorption bestimmt werden (Abbildung 2.12). Hierbei konnte für hTgs1-produzierende Zellen ein positiver Wert ermittelt werden. Dies implizierte, dass in Anwesenheit von m⁷GTP eine höhere Konzentration Thiol-haltiger Moleküle in der Probe vorlag, als in Abwesenheit dieses Substrats. Diese Thiole konnten auf Homocystein und damit auf die hTgs1-katalysierte Hypermethylierung von m⁷GTP zurückgeführt werden. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, welche mit dem Plasmid pRSET-A transformiert worden waren und daher kein hTgs1 produzierten, keine deutlich höhere Absorption in Gegenwart von m⁷GTP als in dessen Abwesenheit (Abbildung 2.12). Es wurde somit gezeigt, dass Trimethylguanosinsynthaseaktivität nicht nur mit gereinigtem Enzym, sondern auch direkt aus prokaryotischem Lysat entsprechender Tgs-produzierender Zellen nachzuweisen ist. Entscheidend für die erfolgreiche Etablierung des colorimetrischen Tgs-Nachweises aus Lysat dieser Zellen, war neben der Definition des jeweiligen Hintergrundsignals, dass m⁷G charakteristisch für Eukaryoten ist und somit nicht durch prokaryotische Enzyme modifiziert werden kann.

Die Anwesenheit von hTgs1 im Zelllysate jedes einzelnen, für den Assay eingesetzten Klons wurde mittels eines Immunblot unter Verwendung von His-Detect nachgewiesen. In hTgs1-produzierenden Zellen konnte jeweils eine Bande bei dem erwarteten Molekulargewicht für hTgs1 von etwa 30,4 kDa detektiert werden. Dieses Signal konnte in Zellen, die mit dem Leerplasmid transformiert worden waren, nicht nachgewiesen werden (Abbildung 2.12).

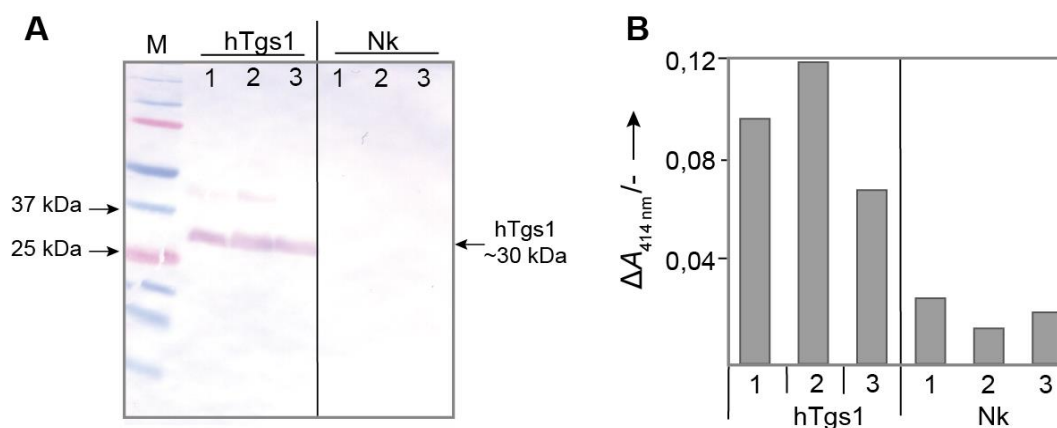


Abbildung 2.12 Colorimetrische Detektion von hTgs1-Aktivität in prokaryotischem Lysat sowie Nachweis der Proteinproduktion mittels Immunblot. Einzelne Klone hTgs1-produzierender Zellen sowie Kontrollzellen, welche mit dem Leerplasmid transformiert worden waren, wurden kultiviert. Die Lysate wurde mittels eines Immunblots charakterisiert und für den Nachweis von hTgs1-Aktivität eingesetzt. **A)** Immunblot der Zellextrakte hTgs1-produzierender und Kontrollzellen. Nach dSDS-PAGE (10 %iges Tris-Tricin-Gel, nicht-reduzierende Bedingungen) und Transfer auf Nitrocellulose wurden Proteine mit His-Tag durch His-Detect nachgewiesen. In den Bahnen hTgs1-produzierender Zellen konnte eine Bande bei dem erwarteten Molekulargewicht von 30,4 kDa detektiert werden. Bahn M: *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*, Bahnen hTgs1 1-3: Lysate hTgs1-produzierender Klone 1-3, Bahnen Nk 1-3: Lysate einzelner Klone der Kontrollzellen. **B)** Colorimetrischer Nachweis von hTgs1-Aktivität in Zelllysate. Lysate hTgs1-produzierender und Kontrollzellen wurden für den Assay eingesetzt und die Biokonversion je in An- und Abwesenheit von $m^7\text{GTP}$ durchgeführt. Nach Zugabe von DTNB wurde die Absorption bei 414 nm bestimmt und $\Delta A_{414 \text{ nm}}$ (Nettoabsorption) berechnet. Diese lag für Klone 1-3 der hTgs1-produzierenden Zellen zwischen 0,07 und 0,12. In den Kontrollzellen war die Absorption in An- und Abwesenheit des Substrats $m^7\text{GTP}$ ähnlich.

Der Nachweis der Trimethylguanosinsynthaseaktivität aus Lysat zeigte, dass DTNB und damit die Messung der Absorption bei 414 nm zum Nachweis von Homocystein auch in Gegenwart zellulärer Bestandteile genutzt werden kann. Die Absorption der Proben, in denen hTgs1 produziert wurde, war nach Subtraktion des Hintergrundsignals deutlich höher als die der Kontrollen (Abbildung 2.12). Dennoch wären Moleküle, welche eine Detektion bei höheren Wellenlängen (z. B. 8-Oxo-8*H*-acenaphthol[1,2-*b*]pyrrol-9-carbonitril) oder die Messung von Fluoreszenz ermöglichen (z. B. ThioGlo1^[249]) unter Umständen vorteilhaft, um die Nachweisgrenze zu verbessern. Weiterhin könnte auch die Nutzung von Methylviologen, welches die spezifische Detektion von Homocystein anstelle des generellen Thiolnachweises ermöglichen würde, zu einer Verbesserung dieser Methode führen.

Um den Assay allerdings zum Nachweis von hTgs1-Aktivität gegenüber Substrat-Analoga in Lysat zu etablieren, müsste in weiterführenden Arbeiten eine Einschränkung des Assays gelöst werden. Durch natürlich vorkommendes AdoMet **12** im Lysat kann es auch in Anwesenheit von AdoMet-Analoga zu einem Methyltransfer kommen. Es kann daher in dem hier etablierten Assay bisher nicht unterschieden werden, ob AdoHcy **13** und damit Homocystein lediglich durch einen Methyltransfer oder durch die gewünschte Übertragung einer reaktiven Gruppe generiert wurde. Um hier eine klare Aussage zu erhalten, wäre es

unter Umständen möglich, zelluläres AdoMet **13** zunächst enzymatisch abzubauen, bevor die Zugabe des Substrats m^7GTP sowie des jeweiligen AdoMet-Analogons erfolgt. Hierfür könnte beispielsweise die S-Adenosylmethionin-Decarboxylase getestet werden, die eine Decarboxylierung von AdoMet **12** und so die Bildung von S-Adenosyl-5'-3-methylthiopropylamin katalysiert.^[250] Hierdurch würde zunächst im Lysat vorliegendes AdoMet **12** abgebaut werden, ohne zur Bildung von Homocystein beizutragen. Im Folgenden könnte das AdoMet-Analogon eingesetzt und die Promiskuität der Trimethylguanosinsynthasen auf Grundlage der Bildung von Homocystein charakterisiert werden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der colorimetrische Assay genutzt werden kann, um Trimethylguanosinsynthaseaktivität nachzuweisen sowie Inhibitoren von Methyltransferasen zu identifizieren. Basierend auf solchen Inhibitoren könnten unter Umständen neue Therapiestrategien, beispielsweise im Falle viraler Erkrankungen, entwickelt werden. In dieser Arbeit sollte der allerdings Assay genutzt werden, um Substratspektren der Trimethylguanosinsynthasen zu charakterisieren, was allerdings nicht final umgesetzt werden konnte. Die Etablierung eines Nachweises der Tgs-Aktivität gegenüber den natürlichen Substraten in Lysat stellt aber einen ersten Schritt zur Etablierung eines Hochdurchsatzverfahrens dar. Außerdem konnten mögliche Lösungsansätze für weiterführende notwendige Arbeiten gezeigt werden, um den Assay final zur Beantwortung diese Fragestellung nutzen zu können.

2.3.2.2 Nachweis der Trimethylguanosinsynthaseaktivität mittels RP-HPLC

Trimethylguanosinsynthasen katalysieren den Methyltransfer von S-Adenosyl-L-methionin **12** auf das Stickstoffatom N^2 der mRNA-Kappe m^7G . Durch die humane Tgs (hTgs1) werden sowohl di- als auch trimethylierte Kappenstrukturen ($m^{2,7}G$ bzw. $m^{2,2,7}G$) gebildet.^[225,227] GluTgs2 transferiert hingegen nur einen Methylrest auf die Kappe und katalysiert so die Bildung des dimethylierten Produkts $m^{2,7}G$.^[229] In beiden Biokonversionen wird S-Adenosylhomocystein **13** aus dem Cosubstrat AdoMet **12** gebildet. Durch den etablierten Assay (Kapitel 2.3.2.1) konnte die Entstehung dieses Coprodukts nachgewiesen werden. Jedoch könnte dessen Generierung unter Umständen auch auf andere Faktoren, wie auf eine Hydrolyse des Cosubstrats AdoMet **12** zurückzuführen sein. Um einen direkten Nachweis für die enzymkatalysierte Hypermethylierung der mRNA-Kappe zu erhalten, sollte eine Methode zur direkten Detektion dieser Moleküle mittels RP-HPLC und MALDI-TOF-MS etabliert werden.

Standardmäßig wurden 200-275 μM des Kappen-Analogons m^7GTP bzw. m^7GpppA **9** mit 300 μM AdoMet **12** in Anwesenheit von 2 μM der jeweiligen Tgs bei 37 °C inkubiert und die Reaktionen mittels RP-HPLC sowie MALDI-TOF-MS analysiert.

Mittels RP-HPLC wurden in der Probe vorliegende Moleküle chromatographisch entsprechend ihrer Hydrophobizität getrennt und durch Messung der Absorption bei den Wellenlängen 260 nm sowie 300 nm detektiert. In allen durchgeführten Biokonversionen zur Hypermethylierung des Kappen-Analogons m^7GpppA **9** konnten vor der Inkubation zwei Verbindungen nachgewiesen werden, die Retentionszeiten von 3,3 Minuten bzw. 8,9 Minuten und ein Absorptionsmaximum von 260 nm aufwiesen. Diese konnten den Edukten AdoMet **12** sowie m^7GpppA **9** zugewiesen werden. In hTgs1-katalysierten Reaktionen konnten nach der Inkubation bei 37 °C drei neue Produkte mit Retentionszeiten zwischen 8,8 und 10 Minuten nachgewiesen werden (Abbildung 2.13). Zwei der Signale zeigten UV-Spektren, welche sich neben einem Absorptionsmaximum bei 260 nm durch ein weiteres Maximum bei etwa 300 nm auszeichneten, was ein charakteristisches Merkmal der *Cap* 0-Struktur und hypermethylierter Kappen ist.^[251] Aufgrund der beobachteten Retentionszeiten und UV-Spektren der Moleküle sowie durch Vergleich mit ähnlichen in der Literatur beschriebenen Experimenten,^[227] konnten die Signale den hypermethylierten Kappenstrukturen $\text{m}^{2,7}\text{GpppA}$ **10** bzw. $\text{m}^{2,2,7}\text{GpppA}$ **11** sowie dem Coprodukt AdoHcy **13** zugeordnet werden. Die Daten der chromatographischen Charakterisierung hTgs1-katalysierter Reaktionen wurden massenspektrometrisch verifiziert. Durch MALDI-TOF-MS konnten die Massen der di- und trimethylierten Kappen-Analoga $\text{m}^{2,7}\text{GTP}/\text{m}^{2,2,7}\text{GTP}$ bzw. $\text{m}^{2,7}\text{GpppA}/\text{m}^{2,2,7}\text{GpppA}$ spezifisch in hTgs1-katalysierten Reaktionen nachgewiesen werden (Daten im Anhang, Kapitel 8.5). Es konnte somit nach der colorimetrischen Bestimmung der Enzymaktivität auch durch die chromatographische sowie die massenspektrometrische Untersuchung bestätigt werden, dass aktives hTgs1 vorlag.

Übereinstimmend mit den in der Literatur beschriebenen Eigenschaften von GlaTgs2 sowie den hier erhaltenen Ergebnissen der Biokonversionen mittels hTgs1, konnte in den chromatographischen Analysen bei 260 nm der GlaTgs2-katalysierten Reaktionen neben der Bildung von AdoHcy **13** nur die Entstehung eines weiteren Produktsignals beobachtet werden. Dieses wies eine Retentionszeit von 8,2 Minuten bzw. 9,5 Minuten in Abhängigkeit des eingesetzten Kappen-Analogons m^7GTP bzw. m^7GpppA **9** auf und zeichnete sich ebenfalls durch ein Kappen-typisches UV-Spektrum aus. Retentionszeit und UV-Spektrum dieses Signals entsprachen dem zuerst eluierten Produkt hTgs1-katalysierter Reaktionen, was

darauf hindeutete, dass es sich um das dimethylierte Kappen-Analogon **10** handelte (Abbildung 2.13).

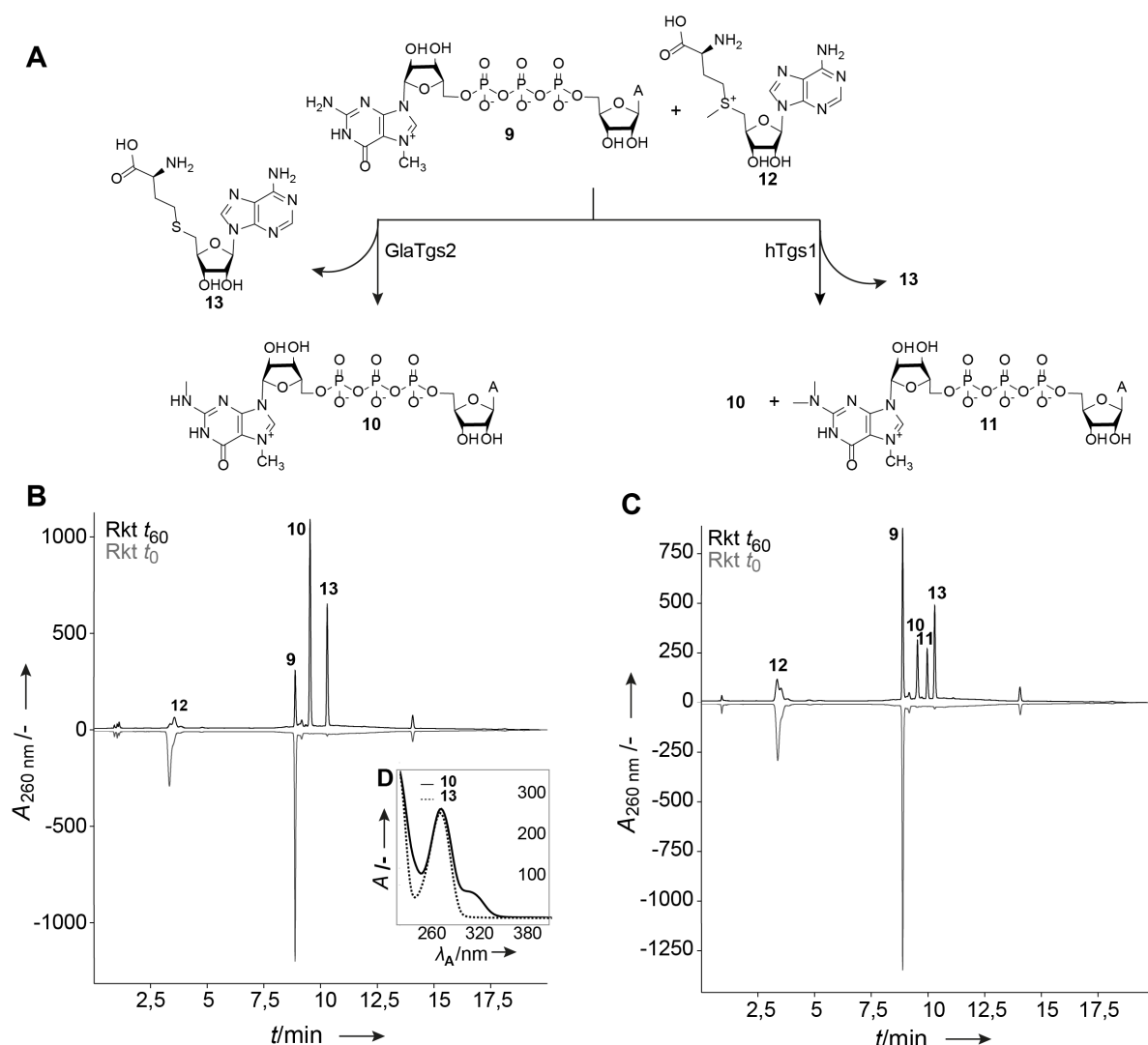


Abbildung 2.13 Nachweis der Enzymaktivität von hTgs1 und GlaTgs2 mittels RP-HPLC. A) Reaktionsschema der Tgs-katalysierten Reaktionen. GlaTgs2 katalysiert den Transfer eines Methylrests von AdoMet **12** auf die Position N^2 des Kappen-Analogons m^7 GpppA **9**. Dabei werden AdoHcy **13** und $m^{2,7}$ GpppA **10** gebildet. hTgs1 kann zwei Methylreste auf **9** transferieren, so dass neben **10** und **13** auch $m^{2,2,7}$ GpppA **11** gebildet wird. B) RP-HPLC-Analyse der GlaTgs2-katalysierten Reaktion. Die Biokonversion wurde vor der Inkubation (Rkt t_0 , hellgrau) sowie nach 1 h (Rkt t_{60} , dunkelgrau) bei 37 °C mittels RP-HPLC (Absorption 260 nm) analysiert. Vor der Umsetzung konnten die Edukte **12** und **9** nachgewiesen werden. Nach der Biokonversion konnten zwei neu gebildete Moleküle nachgewiesen werden, die den erwarteten Produkten **10** und **13** zugeordnet wurden. C) RP-HPLC-Analyse der hTgs1-katalysierten Reaktion. Die Biokonversion wurde vor der Inkubation (Rkt t_0 , hellgrau) sowie nach 1 h (Rkt t_{60} , dunkelgrau) bei 37 °C mittels RP-HPLC (Absorption 260 nm) analysiert. Vor der Umsetzung konnten die Edukte **12** und **9** nachgewiesen werden. Nach der Biokonversion konnten drei neu gebildete Moleküle nachgewiesen werden, die den erwarteten Produkten **10**, **11** und **13** zugeordnet wurden. D) Absorptionsspektren der Produkte **10** (durchgezogene Linie) und **13** (gestrichelte Linie). **10** absorbiert auch bei 300 nm, was ein Charakteristikum der Kappenstruktur ist.^[251] Hingegen weist **13** nur ein Absorptionsmaximum bei 260 nm auf.

Die Bildung der hypermethylierten Kappe **10** in GlaTgs2-katalysierten Biokonversionen konnte massenspektrometrisch bestätigt werden (Daten im Anhang, Kapitel 8.5).

Es konnte gezeigt werden, dass beide Trimethylguanosinsynthasen erfolgreich gereinigt wurden und die Enzymaktivität gegenüber den natürlichen Substraten mittels RP-HPLC- sowie massenspektrometrischer Analyse nachweisbar war.

2.4 Untersuchung promiskuitiver Enzymaktivität gegenüber AdoPropen

Die Trimethylguanosinsynthasen hTgs1 und GlaTgs2 konnten produziert, gereinigt und für die Hypermethylierung der Kappenstruktur m^7G eingesetzt werden (Kapitel 2.3). Für die Etablierung einer chemo-enzymatischen Modifizierung der mRNA-Kappe war es notwendig, dass enzymatisch auch der Transfer einer reaktiven Gruppe anstelle der Methylgruppe katalysiert werden konnte. Beide Trimethylguanosinsynthasen sollten daher hinsichtlich promiskuitiver Aktivität gegenüber dem AdoMet-Analogon AdoPropen **1** charakterisiert werden. Die Auswahl von AdoPropen **1** für diesen Schritt erfolgte auf Basis verschiedener Kriterien. So konnte dieses Cosubstrat bereits erfolgreich für die enzymatische Modifizierung von DNA eingesetzt werden und ist daher bei 37 °C ausreichend stabil.^[234] Des Weiteren wird angenommen, dass durch die Doppelbindung in β -Position zum Schwefelatom das p-Orbital des terminalen Kohlenstoffatoms während des Übergangszustands stabilisiert und so der Transfer im Vergleich zu den entsprechenden ungesättigten Verbindungen bevorzugt abläuft.^[201] AdoPropen **1** als Cosubstrat würde es weiterhin ermöglichen, eine Allylgruppe auf die Kappe zu übertragen und diese somit zugänglich für verschiedene Click-Reaktionen, wie die Photoclick- oder die Thiol-En-Click-Reaktion, zu machen. Die Allylfunktionalität stellt somit die kleinste Gruppe dar, welche sowohl eine Stabilisierung des Übergangszustandes als auch die Funktionalisierung des Substrats ermöglicht.

Für die Charakterisierung hinsichtlich promiskuitiver Aktivität wurden 0,5-1 mM des synthetisierten AdoPropens **1** (Kapitel 2.1) mit m^7GpppA **9** (275 μM) sowie der jeweiligen Trimethylguanosinsynthase für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Enzyme wurden für diese Biokonversionen in Konzentrationen von bis zu 30 μM eingesetzt. Die Reaktionen wurden vor und nach der Inkubation mittels RP-HPLC hinsichtlich der Generierung neuer Kappen-haltiger Produkte analysiert. In diesen Versuchen konnten jedoch keine Unterschiede in den Chromatogrammen festgestellt und somit keine Enzymaktivität gegenüber AdoPropen **1** nachgewiesen werden. Im Folgenden wurde die Reaktion in Gegenwart der Enzyme MTAN (4 μM) und LuxS (3 μM) durchgeführt. Ziel war es hierbei, in der Reaktion vorliegendes AdoHcy **13**, welches sowohl durch Degradation als auch durch enzymkatalysierten Transfer der Allylgruppe entstehen könnte, abzubauen, da AdoHcy **13** als Inhibitor von Methyltransferasen beschrieben wurde^[252]. Es bestand somit die Möglichkeit, dass bei hohen

Konzentrationen AdoPropen **1** zu viel AdoHcy **13** gebildet würde und eine mögliche promiskuitive Aktivität durch Inhibierung der Trimethylguanosinsynthese nicht beobachtet werden könnte. Durch MTAN und LuxS sollte der Abbau von AdoHcy **13** katalysiert und eine mögliche Inhibierung der Trimethylguanosinsynthese vermieden werden. Unter diesen Reaktionsbedingungen konnte chromatographisch die Bildung eines neuen Produkts mit einer Retentionszeit von 10,6 Minuten in der GlaTgs2-katalysierten Biokonversion beobachtet werden. Dieses Produkt war in keiner der Negativkontrollen, welche die Charakterisierung zum Zeitpunkt $t=0$ min sowie in Abwesenheit des Enzyms beinhaltete, zu beobachten und konnte auch nicht in der hTgs1-katalysierten Reaktion nachgewiesen werden (Abbildung 2.14). Im Vergleich zum hypermethylierten Kappen-Analogon $m^{2,7}$ GpppA **10** wurde dieses Produkt erst in Gegenwart eines höheren Acetonitril-Anteils eluiert. Dies deutete darauf hin, dass das detektierte Produkt eine höhere Hydrophobizität und damit einen höheren Alkylgehalt als $m^{2,7}$ GpppA **10** aufwies. Weiterhin zeigte dieses Produkt ein Kappen-typisches Absorptionsspektrum und wurde somit dem erwarteten allylierten Produkt N^2 -Allyl- m^7 GpppA (P^1 -Adenosin(5')- P^3 -[N^2 -prop-2-enyl,7-methylguanosin(5')]triphosphat) **14** zugeordnet.

Die Anwesenheit dieses Moleküls in der GlaTgs2-katalysierten Biokonversion konnte massenspektrometrisch verifiziert werden. Hier konnte neben der Masse des Edukts m^7 GpppA **9** (ber. $[M]^+=787,10$ m/z; det. $[M]^+=786,93$ m/z) auch die Masse der alkenylierten Kappe N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** (ber. $[M]^+=827,13$ m/z; det. $[M]^+=826,97$ m/z) detektiert werden (Abbildung 2.14).

Allerdings konnte nur eine geringe Seitenaktivität nachgewiesen werden. In Anwesenheit von 2,5 mol% GlaTgs2 wurden 4 % (11 μ M) des Produkts N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** erhalten. Dies entspricht einer katalytischen Produktivität (engl. *total turnover number*, TTN) von ~ 1 . Unter optimierten Bedingungen (effizientere Reinigung, kürzere Standzeiten) wurde für GlaTgs2 ein TTN von 3 ± 2 mit AdoPropen **1** als Cosubstrat bestimmt.

In der Masterarbeit von Josephin Holstein wurde unter gleichen Bedingungen die Promiskuität von GlaTgs2 gegenüber dem sterisch anspruchsvolleren Cosubstrats AdoEnYn **4** untersucht.^[235] Hierbei wurde die Bildung eines sehr schwachen *Peaks* beobachtet, der allerdings zunächst nicht massenspektrometrisch zugeordnet werden konnte.

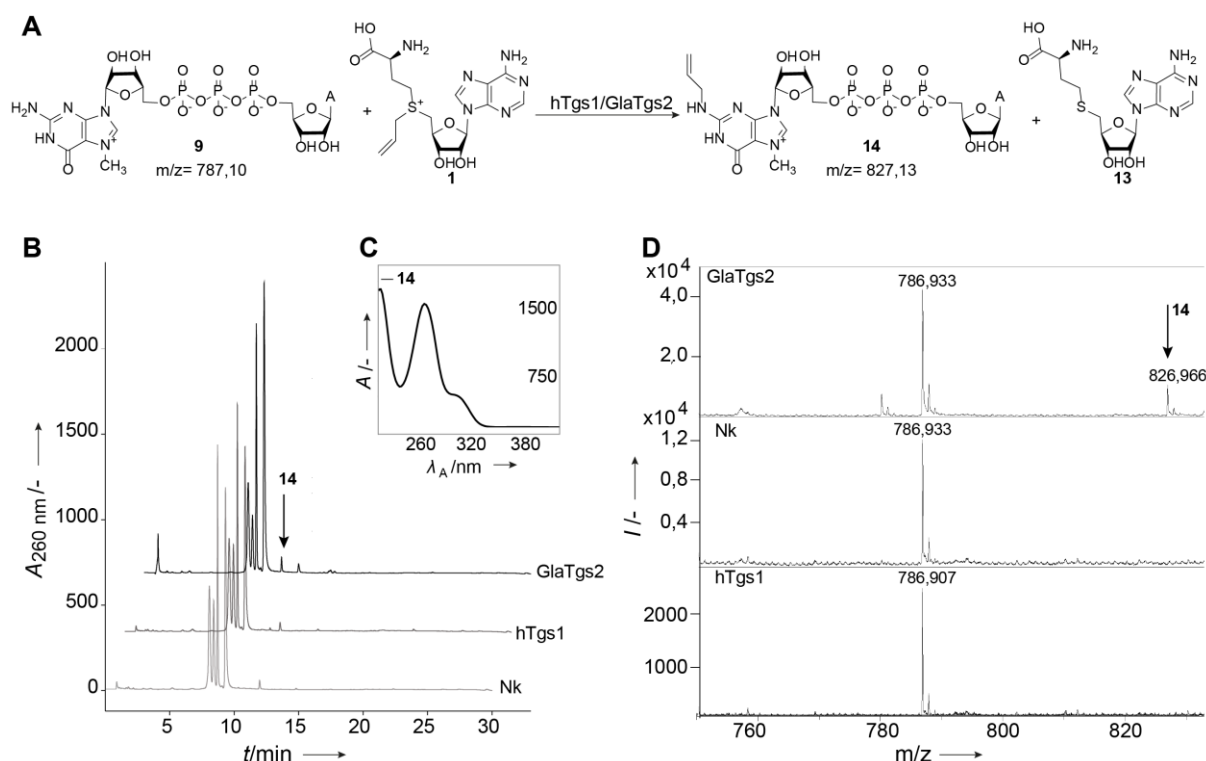


Abbildung 2.14 **Charakterisierung promiskuitiver Aktivität der Trimethylguanosinsynthasen hTgs1 und GlaTgs2 gegenüber AdoPropen.** **A)** Reaktionsschema der Biokonversion von $m^7\text{GpppA}$ **9** zu N^2 -Allyl- $m^7\text{GpppA}$ **14** unter Verwendung von AdoPropen **1** als Cosubstrat. **B)** RP-HPLC-Analysen (Absorption bei 260 nm) der WT-katalysierten Biokonversionen mit AdoPropen **1** als Cosubstrat. Nach einer Inkubation von 4 h bei 37 °C konnten in der Negativkontrolle (Nk, hellgrau; ohne Enzym) und der hTgs1-katalysierten Reaktion (hTgs1, mittelgrau) die Signale der Edukte AdoPropen **1** und $m^7\text{GpppA}$ **9** nachgewiesen werden. In der GlaTgs2-katalysierten Reaktion (GlaTgs2, dunkelgrau) wurde eine zusätzliche Verbindung (Pfeil) detektiert. Diese wies eine Retentionszeit von 10,6 min auf. **C)** Das Absorptionsspektrum des entsprechenden Signals ($t_R = 10,6 \text{ min}$) mit einem zweiten Absorptionsmaximum bei 300 nm deutete auf ein Kappen-haltiges Molekül hin. **D)** MALDI-TOF-MS-Analyse der in B) gezeigten Reaktionen. In allen Reaktionen wurde die Masse des Edukts **9** nachgewiesen (ber. $[M]^+ = 787,10 \text{ m/z}$; det. $[M]^+ = 786,93 \text{ m/z}$). Die Masse des Produkts **14** konnte lediglich in der GlaTgs2-katalysierten Reaktion (GlaTgs2) nachgewiesen werden (Pfeil, ber. $[M]^+ = 827,13 \text{ m/z}$; det. $[M]^+ = 826,97 \text{ m/z}$).

2.5 Verbesserung promiskuitiver Aktivität von GlaTgs2

2.5.1 Homologie-Modell von hTgs1 und GlaTgs2

Für die Markierung der mRNA-Kappe auf Basis einer chemo-enzymatischen Strategie ist eine effiziente, enzymatische Funktionalisierung dieser Struktur Voraussetzung. Die Trimethylguanosinsynthasen hTgs1 und GlaTgs2 wurden daher hinsichtlich ihres Potentials charakterisiert, AdoPropen **1** als Cosubstrat zu nutzen und so die Übertragung eines Allylrests auf die Position N^2 der Kappe zu katalysieren. Für GlaTgs2 konnte dabei eine promiskuitive Aktivität nachgewiesen werden, was einen ersten Schritt zur Etablierung der chemo-enzymatischen Modifizierung eukaryotischer mRNAs darstellte (Kapitel 2.4). Allerdings wurden durch 2,5 mol% (30 μM) des WT-Enzyms lediglich 4 % des alkenylierten Kappen-Analogons N^2 -Allyl- $m^7\text{GpppA}$ **14** (11 μM) erhalten. Mit Hinblick auf potentielle

Anwendungs-möglichkeiten dieser Strategie, wie die Isolierung eukaryotischer mRNA oder deren Visualisierung in lebenden Zellen, ist ein Umsatz von 0,37 pro Mol Katalysator ungenügend. Es war somit notwendig die Promiskuität von GlaTgs2 zu nutzen und diese geringe Seitenaktivität gegenüber AdoPropen **1** zu verbessern. Generell können hierfür unterschiedliche Strategien verfolgt werden. So kann beispielsweise mittels *error-prone* PCR (ep-PCR) eine Zufallsmutagenese durchgeführt werden, in der statistisch jedes Nukleotid eines Gens für Mutationen zugänglich wird. Daraus entsteht eine Vielzahl an Enzym-Varianten. Schlüsselschritt einer solchen Strategie ist die Möglichkeit zur Selektion oder aber zur Charakterisierung einer Vielzahl von Varianten in einem Hochdurchsatzverfahren. In dieser Arbeit sollte mit Hinblick auf diese Anforderungen ein colorimetrischer Assay zum Nachweis von Trimethylguanosinsynthaseaktivität aus Lysat etabliert werden (Abschnitt 2.3.2.1.3). Allerdings konnte dieser final nicht zur Untersuchung des Substratspektrums eingesetzt werden, da eine Möglichkeit zum AdoMet-Abbau aus Lysat zu diesem Zeitpunkt fehlte. Bei Durchführung einer gerichteten Evolution zur Verbesserung der Aktivität gegenüber AdoPropen **1** hätte somit keine Möglichkeit bestanden, die erforderliche Anzahl Varianten zu charakterisieren. Eine alternative Strategie verbesserte Enzymaktivität ohne die Notwendigkeit extensiven *Screenings* zu erhalten, stellt rationales Design dar. Hierbei werden gezielt Aminosäuren gewählt, deren Variation potentiell Einfluss auf die jeweils angestrebte Aktivität haben könnte. Für eine solche Methode ist die Kenntnis der Proteinstruktur, der Interaktionen mit den jeweiligen Substraten sowie des katalytischen Mechanismus notwendig. Einige dieser Informationen können aus Sequenzvergleichen mit anderen, promiskuitiven Enzymen abgeleitet werden. Eine solche Strategie war allerdings für GlaTgs2 nicht anwendbar, da in der Literatur keine Trimethylguanosinsynthase beschrieben ist, die einen effizienten Umsatz von AdoMet-Analoga ermöglicht. Es standen somit keine vergleichenden Sequenzdaten für eine potentielle Optimierung zur Verfügung. Darüber hinaus wurde es als sinnvoll erachtet, Aminosäuren zu identifizieren, welche den Zugang voluminöser AdoMet-Analoga in das aktive Zentrum verhindern könnten. Eine solche Einteilung musste auf Grundlage der räumlichen Struktur und nicht durch Sequenzvergleiche unterschiedlicher Enzyme erfolgen. Ein Problem stellte hierbei dar, dass von GlaTgs2 keine Kristallstruktur bekannt ist. Um dennoch eine Aussage über den sterischen Einfluss bestimmter Aminosäuren treffen zu können, wurde mittels SWISS-MODEL^[253–255] ein Homologie-Modell auf Basis der humanen Trimethylguanosinsynthase (PDB: 3GDH) erstellt (Abbildung 2.15). Dieses Enzym wurde im Jahr 2009 durch Monecke *et al.* in Anwesenheit des Methylakzeptors m⁷GTP sowie des Coprodukts AdoHcy **13** kristallisiert^[227] und weist eine Sequenzidentität von 31 % mit

GlaTgs2 auf. Auf Grundlage dieser Struktur konnte ein Modell von GlaTgs2 generiert werden, welches lediglich in den *Loop*-Regionen der äußeren Bereiche Abweichungen vom Templat zeigt. Im Bereich des katalytischen Zentrums liegt hingegen eine hohe Übereinstimmung der Strukturen beider Enzyme vor. Es wurde daher angenommen, dass auf Basis des Modells verlässliche Aussagen bezüglich interessanter Aminosäuresubstitutionen getroffen werden könnten. Um eine Minimierung sterischer Wechselwirkungen der AdoMet-Analoga im aktiven Zentrum von GlaTgs2 zu erreichen, wurden auf Basis des GlaTgs2-Modells Aminosäureseitenketten identifiziert, welche sich in einem Radius von weniger als 8 Å bezogen auf das Schwefelatom des kokristallisierten AdoHcy **13** befinden. Diese sollten durch Alanin substituiert werden, um die Substratbindetasche zu vergrößern und das katalytische Zentrum für sterisch anspruchsvolle Gruppen zugänglich zu machen. Eine solche Strategie wurde bereits erfolgreich genutzt, um eine Verbesserung der Aktivität von DNA- und Proteinmethyltransferasen gegenüber verschiedenen AdoMet-Analoga zu erreichen.^[196,197,256]

Für GlaTgs2 konnten durch diese Vorgehensweise V34, S38, T70, C72, E91 und D140 als potentielle *Target*-Positionen identifiziert werden. Einige der ermittelten Reste sind Teil des konservierten AdoMet-Bindemotivs, welches die Bereiche ⁶⁶VIDGTACVGG⁷⁵ und ⁸⁸VAIE⁹¹ umfasst, oder des m⁷G-Bindemotivs ¹⁴⁰DPPWGGV¹⁴⁶, beziehungsweise wurden schon als wichtig für die Aktivität beschrieben.^[229,257] Letztere sollten daher im Folgenden nicht substituiert werden. Die Identifizierung dieser essentieller Aminosäuren in der Nähe des Coprodukts AdoHcy **13** verdeutlicht aber die potentielle Richtigkeit des Modells und somit die Möglichkeit hieraus auch verlässliche Aussagen bezüglich sterischer Interaktionen im aktiven Zentrum herleiten zu können. Auf Basis der modellierten GlaTgs2-Struktur sowie durch Auswertung Literatur-bekannter Daten, wurden daher die Positionen V34, T70, und C72 für einen Alaninscan gewählt.

Diese Aminosäuren zeichnen sich nicht nur durch ihre Nähe zum Coprodukt aus, sondern darüber hinaus wurden sie bisher nicht als essentiell für die enzymatische Aktivität beschrieben und zählen, wie Sequenzvergleiche verschiedener Trimethylguanosinsynthasen zeigten, nicht zu hochkonservierten Positionen.^[229,257] Der Austausch dieser Aminosäuren könnte somit potentiell unter Erhalt der enzymatischen Aktivität durchgeführt werden, aber dennoch das Volumen der Substrattasche vergrößern.

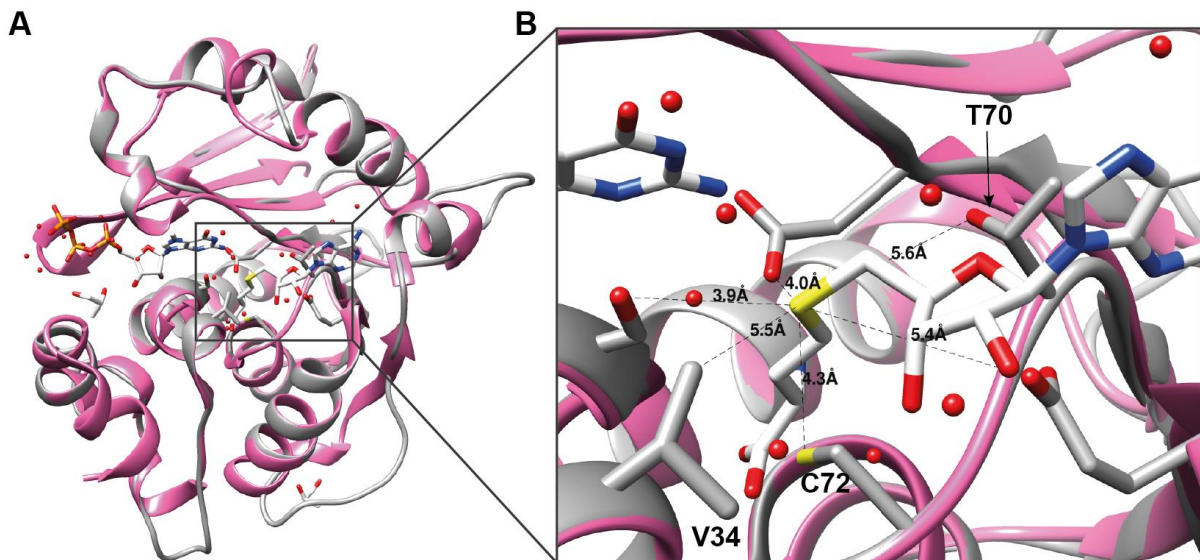


Abbildung 2.15 **Modell von GlaTgs2, generiert mittels SWISS-MODEL auf Basis der Kristallstruktur von hTgs1.** A) Homologie-Modell von GlaTgs2 (grau) auf Grundlage der Kristallstruktur von hTgs1 (rosa, PDB: 3GDH) erstellt mittels SWISS-MODEL. Die kokristallisierten Verbindungen m⁷GTP und AdoHcy 13 sind als Stäbchenmodell dargestellt. B) Ausschnitt des GlaTgs2-Modells, welches das aktive Zentrum mit kokristallisiertem AdoHcy 13 im Detail darstellt. Aminosäuren der GlaTgs2-Sequenz, welche sich in einem Abstand von weniger als 8 Å zum Schwefelatom des AdoHcy 13 befinden, sind als Stäbchenmodell dargestellt. Die Abstände zwischen AdoHcy 13 und der jeweiligen Aminosäure sind angegeben. Positionen, welche für Mutagenesestudien gewählt wurden, sind mit Einbuchstabencode und Nummer der jeweiligen Aminosäure beschriftet.

2.5.2 Generierung von GlaTgs2-Varianten durch SOE-PCR

Ausgehend von dem Homologie-Modell konnten verschiedene Aminosäuren identifiziert werden, die eine Aufnahme der voluminösen Aminosäuren möglicherweise behindern könnten. Hierzu zählten V34, T70, und C72, die gewählt wurden, da sie bisher nicht als essentiell für die Katalyse beschrieben sind. Um die Aufnahme voluminöser AdoMet-Analoga in das aktive Zentrum zu erleichtern, sollten diese jeweils durch Alanin substituiert werden. Hierfür wurde über ortsgerichtete Mutagenese des GlaTgs2-WT-Gens und anschließende SOE-PCR (*splicing by overlap extension-PCR*) an den entsprechenden Positionen ein Codon für Alanin eingeführt (V34A: ¹⁰⁰gtg¹⁰² zu ¹⁰⁰gcc²⁰⁰; T70A: ²⁰⁸acc²¹⁰ zu ²⁰⁸gcc²¹⁰; C72A: ²¹⁴tgt²¹⁶ zu ²¹⁴gcc²¹⁶). Die erhaltenen Gene wurden mithilfe eingebrachter Schnittstellen durch BamHI und XhoI restringiert und in den Vektor pRSET-A kloniert. Die Ligationsansätze wurden zur Transformation von *E. coli* Top10-Zellen eingesetzt und erhaltene Klone durch Kolonie-PCR überprüft. Geeignete Konstrukte wurden isoliert und sequenziert. Es konnte gezeigt werden, dass die generierten und isolierten Plasmide jeweils die gewünschte Mutation enthielten und darüber hinaus keine Abweichungen vom WT-Gen zeigten (Sequenzdaten im Anhang, Kapitel 8.3). Es lagen somit Vektoren zur Produktion der Varianten GlaTgs2-V34A, GlaTgs2-T70A sowie GlaTgs2-C72A vor und es konnte eine Charakterisierung der codierten

Enzyme folgen. Hierfür wurden zunächst *E. coli* TunerTM(DE3)pLacI-Zellen mit den Plasmiden transformiert und diese für die Produktion der Varianten, entsprechend des Protokolls zur Produktion des WT-Enzyms, eingesetzt.

Die rekombinante Produktion der Varianten wurde zunächst mittels dSDS-PAGE überprüft. Hierzu wurden Zellbestandteile sowohl vor als auch nach Induktion mit IPTG sowie Zellysate auf ein 10 %iges Tris-Tricin-Gel aufgetragen und die enthaltenen Proteine entsprechend des Molekulargewichts gelelektrophoretisch getrennt. Die Analyse erfolgte sowohl mittels *Coomassie Brilliant Blau*-Färbung als auch durch einen Immunblot unter Verwendung des *penta* His-Antikörpers. Hierbei wurden sowohl in den Zellbestandteilen als auch im Lysat Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 33 kDa nachgewiesen. Der Immunblot zeigte darüber hinaus, dass die entsprechenden Proteine nicht nur das erwartete Molekulargewicht besaßen, sondern darüber hinaus über einen *His*-Tag verfügten. Die Ergebnisse dieser ersten Analyse deuteten darauf hin, dass alle drei Varianten in den Zellen als lösliche Proteine produziert wurden, wobei für GluTgs2-V34A ein auffallend deutliches Signal erhalten wurde. Um diese im Folgenden hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität zu charakterisieren, folgte die Reinigung der Varianten mittels IMAC (Metallaffinitätschromatographie, *immobilized-metal ion affinity chromatography*) unter Verwendung einer Ni(II)-NTA-Säule. Die einzelnen Schritte der Reinigung wurden mittels dSDS-PAGE und *Coomassie Brilliant Blau*-Färbung überprüft und Fraktionen, welche das gereinigte Enzym enthielten, dialysiert.

Die gereinigten Enzyme wurden nach gelelektrophoretischer Trennung mittels *Coomassie Brilliant Blau*-Färbung sowie durch Anfertigung eines Immunblots charakterisiert, dies ist beispielhaft in Abbildung 2.16 dargestellt.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei der Charakterisierung aller Varianten ein Protein bei einem erwarteten Molekulargewicht von etwa 33 kDa nach Färbung des Tris-Tricin-Gels mit *Coomassie Brilliant Blau* detektiert wurde. Es war auffällig, dass in Übereinstimmung mit den Proben des gereinigten Wildtyp-Enzyms eine weitere Bande mit geringerem Molekulargewicht auftrat, die nicht zugeordnet werden konnte. Der Immunblot unter Verwendung des *penta* His-Antikörpers zeigte, dass die Proteine des entsprechenden Molekulargewichts über einen *His*-Tag verfügten, so dass angenommen werden konnte, dass alle Varianten erfolgreich hergestellt wurden.

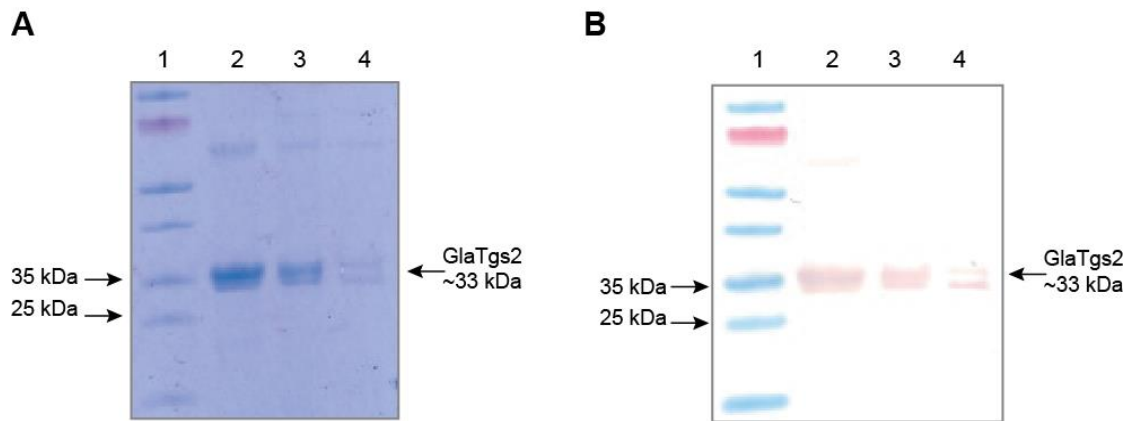


Abbildung 2.16 **Analyse der gereinigten GlaTgs2-Alanin-Varianten.** **A)** Analyse gereinigter GlaTgs2-Varianten nach dSDS-PAGE (10 %iges Tris-Tricin-Gel, nicht-reduzierende Bedingungen) durch *Coomassie Brilliant Blau*-Färbung. **B)** Immunblot gereinigter GlaTgs2-Varianten nach gelelektrophoretischer Trennung (10 %iges Tris-Tricin-Gel, nicht-reduzierende Bedingungen). Für die Detektion wurde *penta His*-IgG (1: 2 000 in 2 % (w/v) BSA-PBS) als Primär- sowie anti-mouse-IgG-AP (1: 30 000 in 2 % (w/v) BSA-PBS) als Sekundärantikörper eingesetzt. Bahn 1: *PAGERuler Prestained Protein Ladder*, Bahn 2: GlaTgs2-V34A, Bahn 3: GlaTgs2-T70A, Bahn 4: GlaTgs2-C72A.

Die anschließende Konzentrationsbestimmung zeigte, dass die Varianten GlaTgs2-T70A und GlaTgs2-C72A in einer Konzentration von 25 ng/ μ L (33 μ g/L Kultur) und damit in noch geringeren Mengen als das WT-Enzym (Kapitel 2.3.1) erhalten wurden. Für GlaTgs2-V34A war schon in den ersten Immunblotanalysen der Proteinproduktion ein deutlich stärkeres Signal bei 33 kDa und somit eine deutlich höhere Produktionsrate im Vergleich zum WT-Enzym beobachtet worden. Dies konnte nach der Reinigung und Konzentrationsbestimmung bestätigt werden. Die Variante V34A konnte in diesem ersten Versuch in einer Konzentration von 3 μ g/ μ L erhalten werden, was einer Ausbeute von 5 mg/L Kultur entspricht. Die mehrfach durchgeführte rekombinante Produktion und Reinigung dieser Enzym-Variante zeigte, dass GlaTgs2-V34A reproduzierbar in Konzentrationen von 50-340 μ M (2-14 mg/L Kultur) erhalten werden konnte.

Die gereinigten Varianten wurden zur Charakterisierung der enzymatischen Aktivität unter Verwendung von AdoMet **12** sowie AdoPropen **1** als Cosubstrat eingesetzt (Kapitel 2.5.3).

2.5.3 Bestimmung der Enzymaktivitäten mit AdoMet und AdoPropen

Die GlaTgs2-Varianten V34A, T70A sowie C72A konnten in *E. coli*-Zellen rekombinant produziert und aus den entsprechenden Lysaten gereinigt werden (Kapitel 2.5.2).

Für die ersten Aktivitätsstudien wurden die erhaltenen Enzym-Varianten in gleichen Volumina für die Umsetzung von m^7 GTP (200 μ M) mit AdoMet (**12**, 300 μ M) sowie m^7 GpppA (**9**, 275 μ M) mit AdoPropen (**1**, 1,1 mM) eingesetzt. Die Reaktionen wurden jeweils vor und nach der Inkubation bei 37 °C mittels RP-HPLC analysiert und Edukte sowie

gegebenenfalls Produkte durch Messung der Absorption bei 260 nm und 300 nm detektiert. Für die Varianten C70A und T72A (0,08 μM in AdoMet-Reaktion bzw. 0,5 μM mit AdoPropen **1**) konnte hierbei weder Aktivität gegenüber dem natürlichen Cosubstrat **12** noch gegenüber dem Analogon **1** beobachtet werden.

Die hohe Produktionsrate der Variante GlaTgs2-V34A ermöglichte es, diese in höheren Konzentrationen für die Biokonversionen einzusetzen. Die Katalyse des Methyltransfers konnte so in Gegenwart von 9 μM des Enzyms (2 mol%) durchgeführt werden, wobei ein quantitativer Umsatz vom m^7GTP zu $\text{m}^{2,7}\text{GTP}$ innerhalb von 60 Minuten beobachtet wurde. Somit konnte nachgewiesen werden, dass das katalytische Zentrum dieser Variante intakt war. Im Folgenden wurde die Aktivität dieser Variante gegenüber AdoPropen **1** getestet. Zunächst wurde die Variante hierzu in gleichen Konzentrationen wie das Wildtyp-Enzym (6 μM , 1 mol%) für die Umsetzung von m^7GpppA (**9**, 275 μM) mit AdoPropen (**1**, 560 μM) eingesetzt. Unter diesen Bedingungen konnte mittels RP-HPLC-Analyse eine Ausbeute von 30 % N^2 -Allyl- m^7GpppA **14** (81 μM) in der Biokonversion der Variante V34A bestimmt werden. Für das Wildtyp-Enzym konnte unter identischen Bedingungen hingegen eine Ausbeute von nur 5 % (14 μM) bezogen auf das Zielmolekül erhalten werden. Dies deutete darauf hin, dass durch Austausch des Valins an Position 34 des Enzyms eine Variante mit deutlich höherem Potential zum Transfer sterisch anspruchsvoller Reste erhalten worden war. Es kann vermutet werden, dass V34 nicht für den Mechanismus der Katalyse essentiell ist bzw. dass durch dessen Substitution die räumliche Struktur des aktiven Zentrums nicht verändert wurde, aber dass diese Aminosäure das Volumen der Substratbindetasche limitierte. Zur Etablierung der chemo-enzymatischen Strategie war ein möglichst quantitativer enzymatischer Umsatz der Kappe m^7GpppA **9** zur aktivierten Struktur N^2 -Allyl- m^7GpppA **14** essentiell. Dies konnte durch Einsatz der Variante V34A in höheren Konzentrationen im Folgenden erreicht werden. Aufgrund der höheren Produktionsrate konnte die Variante in dieser ersten Charakterisierung in einer Konzentration von 63 μM (7,0 mol%) eingesetzt werden. Das Produkt N^2 -Allyl- m^7GpppA **14** konnte hierdurch in einer Ausbeute von 80 % erhalten werden (Abbildung 2.17). Weitere Biokonversionen zeigten, dass das erwartete Produkt N^2 -Allyl- m^7GpppA **14** reproduzierbar in Ausbeuten von bis zu 92 % (253 μM) durch die Variante GlaTgs2-V34A generiert werden konnte. Dies entsprach einer 23-fach höheren Konzentration des Zielmoleküls **14** im Vergleich zu der Biokonversion des WT-Enzyms. Die Identität von N^2 -Allyl- m^7GpppA **14** wurde massenspektrometrisch durch MALDI-TOF-MS-Messungen verifiziert. Es konnte hier, anders als in den Biokonversionen des WT-Enzyms, ein deutliches Signal bei der erwarteten Masse von $[\text{M}]^+ = 827,12 \text{ m/z}$ detektiert werden.

Hingegen war das Signal des Edukts m^7 GpppA **9** ($[M]^+ = 787,10$ m/z) deutlich geringer als in massenspektrometrischen Charakterisierungen WT-katalysierter Reaktionen. Die Signalintensität bei MALDI-TOF-MS-Analysen hängt unter anderem von Ionisierbarkeit und Flüchtigkeit der Verbindungen ab und ist daher prinzipiell nicht zur Quantifizierung einzelner Verbindungen geeignet. Allerdings kann hier aus dem Vergleich der einzelnen Spektren geschlossen werden, dass eine deutlich höhere Konzentration N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** in der Biokonversion von GlaTgs2-V34A vorlag.

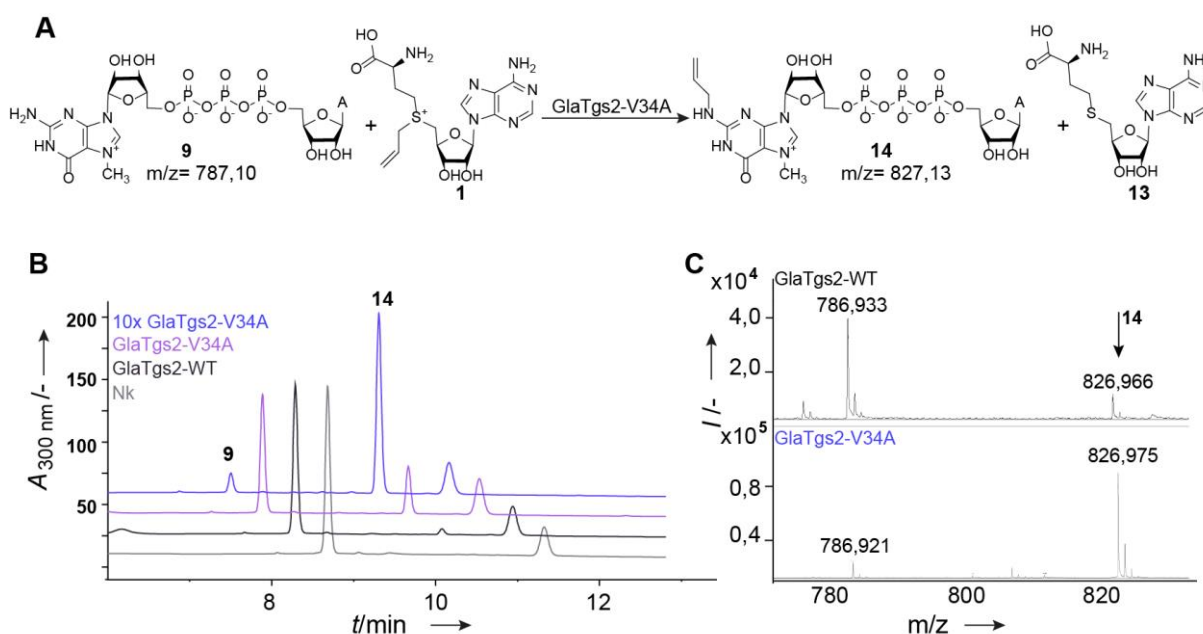


Abbildung 2.17 **Charakterisierung der Biokonversion von m^7 GpppA zu N^2 -Allyl- m^7 GpppA durch GlaTgs2-V34A.** Die Variante GlaTgs2-V34A und das Wildtyp-Enzym wurden zur Generierung von N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** eingesetzt und die Reaktionen mittels RP-HPLC und MALDI-TOF-MS analysiert. **A)** Reaktionsschema der Biokonversion. **B)** RP-HPLC-Analyse der Biokonversion von m^7 GpppA **9** zu N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14**. Die Variante (GlaTgs2-V34A, lila) wurde in äquimolarer Konzentration bezogen auf das Wildtyp-Enzym (GlaTgs2-WT, schwarz) und in zehnfach höherer Konzentration (63 μM , 10xGlaTgs2-V34A, blau) eingesetzt. Die Reaktionen sowie die Kontrolle ohne Enzym (Nk, hellgrau) wurden nach 4 h bei 37 °C mittels RP-HPLC (Absorption bei 300 nm) analysiert. In der Negativkontrolle war das Signal des Edukts m^7 GpppA **9** und ein nicht zugeordnetes Signal nachweisbar. In der GlaTgs2-WT-katalysierten Reaktion konnte ein weiteres Signal detektiert werden, welches aufgrund der Retentionszeit ($t_R = 10,6$ min) und des UV-Spektrums (nicht gezeigt) N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** (14 μM) zugeordnet wurde. In der GlaTgs2-V34A-katalysierten Reaktion konnten 81 μM **14** erhalten werden. In Gegenwart von 63 μM GlaTgs2-V34A wurden 253 μM N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** gebildet. **C)** MALDI-TOF-MS-Analysen der in B) gezeigten Biokonversionen GlaTgs2-WT und 10xGlaTgs2-V34A. In beiden Reaktionen wurden die Massen des Edukts **9** (ber. $[M]^+ = 787,10$ m/z; det. $[M]^+ = 786,9$ m/z) und des erwarteten Produkts **14** (Pfeil; ber. $[M]^+ = 827,13$ m/z; det. $[M]^+ = 826,9$ m/z) nachgewiesen. Bezogen auf die WT-katalysierte Reaktion konnte die Masse des Produkts als deutlich stärkeres Signal in der GlaTgs2-V34A-katalysierten Reaktion detektiert werden.

Darüber hinaus konnte bestätigt werden, dass AdoHcy **13** inhibitorisch auf die Trimethylguanosinsynthase wirkt, da in Abwesenheit der Enzyme MTAN und LuxS eine Ausbeute von lediglich 65 % N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** erreicht werden konnte. Ein

vergleichendes Experiment in Anwesenheit dieser Enzyme ermöglichte den Umsatz von 92 % m^7GpppA **9**.

Durch GlaTgs2-V34A konnte die alkenylierte Kappe N^2 -Allyl- m^7GpppA **14** somit erstmals in Konzentrationen generiert werden, die es ermöglichten, eine effiziente Methode zur Markierung eukaryotischer mRNA zu etablieren. Für eine solche Strategie ist neben einer effizienten Transfers der reaktiver Gruppen auch die Substratspezifität der Variante wichtig, um das Zielmolekül in komplexen Umgebungen modifizieren zu können.

Es wurde daher untersucht, ob Substratspezifität sowie Regiospezifität des Enzyms trotz Substitution von Valin an Position 34 erhalten worden waren. Um zunächst die Substratspezifität zu untersuchen, wurde die Variante GlaTgs2-V34A (6 μM) in Gegenwart von AdoMet (**12**, 673 μM) und GTP (400 μM) inkubiert. Das Nukleotid GTP verfügt nicht über die Methylierung an Position $N7$ und stellt nachweislich (Benarroch *et al.*,^[211] Hausmann und Shuman,^[229] eigene Daten) kein Substrat für GlaTgs2-WT dar. Auch in Gegenwart der Variante konnte unter Verwendung von GTP kein Methyltransfer beobachtet werden. Die Substratspezifität wurde durch die eingeführte Variation nicht beeinflusst und eine spezifische Markierung der mRNA-Kappe unter Verwendung von GlaTgs2-V34A war grundsätzlich möglich.

Es wurde weiterhin die Regiospezifität der Variante überprüft. Hierzu wurde zunächst m^7GpppA (**9**, 275 μM) in Anwesenheit von AdoMet (**12**, 300 μM) durch V34A (130 μM) zu $m^{2,7}GpppA$ **11** umgesetzt. Anschließend wurde AdoPropen **1** (540 μM) hinzugefügt und alle Reaktionen nach Inkubation bei 37 °C mittels RP-HPLC analysiert. Im Falle der Blockierung von N^2 durch die Methylgruppe konnte kein Transfer der Allylgruppe beobachtet werden (Daten im Anhang, Kapitel 8.5). Wenn zuvor keine $N7$ -Methylierung stattgefunden hatte, erfolgte ein Umsatz von 80 % m^7GpppA **9** zu N^2 -Allyl- m^7GpppA **14**. Dies deutet darauf hin, dass auch die Allylgruppe auf die Position N^2 übertragen und keine Änderung der Regiospezifität durch die Substitution von V34 entstanden ist. Diese enzymatische Konkurrenzreaktion schließt allerdings nicht aus, dass bereits die Methylgruppe durch die Variante V34A auf eine andere Position als erwartet übertragen und so eine andere Position blockiert wird. Auch wäre es möglich, dass die Allylgruppe enzymatisch auf ein anderes Atom als N^2 übertragen wird, diese Position aber, beispielsweise aufgrund sterischer Wechselwirkungen, nach der Premethylierung nicht zugänglich ist und daher kein Allyltransfer beobachtet werden kann. Als endgültiger Nachweis für die enzymatische Allylierung des exocyclischen Stickstoffatoms durch die Variante müssten daher weitere Analysen, wie NMR-spektroskopische Untersuchungen oder Kristallisation der gereinigten

Verbindung, durchgeführt werden. Dennoch lässt sich anhand der erhaltenen Daten und Angaben bezüglich des WT-Enzyms vermuten, dass die Allyl- und Methylgruppe enzymatisch auf die gleiche Position transferiert werden und, dass dies vermutlich das exocyclische Stickstoffatom der Kappe ist.

Nachdem somit der erste Schritt einer chemo-enzymatischen Strategie erfolgreich durchgeführt werden konnte, sollte in einem nächsten Schritt die chemische Markierung der modifizierten mRNA-Kappe etabliert werden, wodurch diese kovalent mit verschiedenen Reportermolekülen verknüpft werden könnte (Kapitel 2.6-2.8).

Zunächst allerdings erfolgte eine detaillierte Charakterisierung der Variante V34A. Zum einen sollte hierbei das Substratspektrum der Variante und damit das Potential auch andere Gruppen transferieren zu können, untersucht werden. Zum anderen sollte bestimmt werden, welche Enzym-spezifischen Parameter, wie Substrataffinität K_M , Thermostabilität T_{50} oder Wechselzahl k_{cat} , durch die Alaninsubstitution beeinflusst wurden und damit die deutlich verbesserte Allylierung der Kappe ermöglichten. Denn auch wenn Variante und Wildtyp in gleichen Konzentrationen für die Biokonversion eingesetzt wurden, konnte mit der Variante eine sechsfach höhere Ausbeute N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** erhalten werden, so dass neben der Möglichkeit höhere Konzentrationen des Enzyms einsetzen zu können, weitere Faktoren für die Verbesserung der Ausbeute an N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** anzunehmen waren.

2.5.4 Vergleich der Variante GlaTgs2-V34A mit GlaTgs2-WT

Auf Grundlage des Homologie-Modells von GlaTgs2 war die Position V34 als potentiell limitierend für die Umsetzung voluminöser AdoMet-Analoga eingestuft worden (Kapitel 2.5.1). Es konnte gezeigt werden, dass durch Austausch der Aminosäure Valin an dieser Position durch Alanin ein nahezu quantitativer Umsatz von 275 μ M m^7 GpppA **9** zu N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** in Gegenwart von 560 μ M AdoPropen **1** erfolgte. Dies konnte teilweise darauf zurückgeführt werden, dass die Variante in deutlich höheren Konzentrationen für die Biokonversionen eingesetzt werden konnte als GlaTgs2-WT. Allerdings war auffällig, dass eine etwa sechsfach verbesserte Ausbeute N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** im Vergleich zur WT-katalysierten Reaktion auch erhalten werden konnte, wenn beide Enzyme in gleicher Konzentration (6 μ M) eingesetzt wurden (Kapitel 2.5.3). Dies deutete darauf hin, dass durch die Substitution auch charakteristische Enzymparameter wie beispielsweise die Substrataffinität K_M , die Wechselzahl k_{cat} oder die Thermostabilität T_{50} , verbessert wurden. Es sollte daher untersucht werden, welche dieser Parameter durch die Aminosäuresubstitution an Position 34 beeinflusst wurden und damit die Grundlage der erhöhten Effektivität darstellten.

Zunächst wurde die Substrataffinität K_M der Variante GlaTgs2-V34A gegenüber AdoPropen **1** im Vergleich zum Wildtyp-Enzym bestimmt. Dieser Wert beschreibt die Substratkonzentration bei der das Enzym seine halbmaximale Geschwindigkeit erreicht und ist unabhängig von der Enzymkonzentration. Für die Bestimmung dieses Parameters wurden unterschiedliche Konzentrationen (ca. 90 bis 700 μM) diastereomerenreines AdoPropen **1** in Anwesenheit von $m^7\text{GpppA}$ (**9**, 275 μM) und GlaTgs2-V34A beziehungsweise GlaTgs2-WT inkubiert. Die Reaktionen wurden jeweils vor sowie nach einer Inkubation von 15 und 25 Minuten bei 37 °C mittels RP-HPLC charakterisiert. Produkt- und Eduktsignal wurden integriert und aus diesen Werten die lineare Zunahme des Produkts N^2 -Allyl- $m^7\text{GpppA}$ **14** in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Die Steigung der erhaltenen Geraden entsprach der Anfangsgeschwindigkeit des Enzyms in Gegenwart der jeweiligen Substratkonzentration. Durch die Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit als Funktion der Substratkonzentration konnte gemäß der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 6.1) die Substrataffinität bestimmt werden.

Für GlaTgs2-V34A konnte eine Substrataffinität K_M von $57 \pm 29 \mu\text{M}$ gegenüber AdoPropen **1** ermittelt werden, was einer nahezu dreifach höheren Substrataffinität im Vergleich zum Wildtyp-Enzym entspricht (K_M von $151 \pm 19 \mu\text{M}$ für GlaTgs2-WT).

Des Weiteren wurde die Wechselzahl k_{cat} der Variante bestimmt. Diese beschreibt die Anzahl an Reaktionen, die ein Enzym bei maximaler Geschwindigkeit pro definierter Zeiteinheit katalysiert. Hierfür wurden 275 μM $m^7\text{GpppA}$ **9** und 560 μM AdoPropen **1** für die Biokonversion mit GlaTgs2-V34A sowie GlaTgs2-WT (je 6 μM) eingesetzt. Die Reaktionen wurden nach Inkubationszeiten von 15, 30, 60 und 180 Minuten bei 37 °C gestoppt und mittels RP-HPLC analysiert. Aus der Änderung der Produktkonzentration pro Zeiteinheit und Enzymkonzentration konnte gemäß Gleichung 6.2 die Wechselzahl berechnet werden.

Für die Variante V34A ergab sich ein k_{cat} -Wert von $0,18 \pm 0,08 \text{ min}^{-1}$. Für das Wildtyp-Enzym lag der k_{cat} -Wert bei $0,09 \pm 0,08 \text{ min}^{-1}$ und dieses wies somit geringeren Umsatz von AdoPropen **1** auf.

Darüber hinaus wurde die katalytische Produktivität (TTN, *total turnover number*) beider Enzyme bestimmt. Diese beschreibt die maximale Zyklenzahl, die ein Enzym durchlaufen kann und berechnet sich als Quotient gebildeter Mole Produkt pro Mol Enzym. Hierfür wurden sowohl die Variante als auch das Wildtyp-Enzym (6-20 μM) in Gegenwart ausreichend hoher Substratkonzentrationen (275-1000 μM $m^7\text{GpppA}$ **9** und 560-1000 μM AdoPropen **1**) für drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Hierdurch sollte über den gesamten Zeitraum der Messung Substratsättigung der Enzyme gewährleistet sein. Die Produktivität

wird dann nur durch Effizienz und Lebensdauer des Enzyms bestimmt. Die zur Bestimmung des TTN-Werts durchgeführten Reaktionen wurden mittels RP-HPLC analysiert und die Konzentration von N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** zum angegebenen Zeitpunkt (60 bzw. 180 Minuten) bestimmt. Die Variante GlaTgs2-V34A zeigte bei identischen Reaktionsbedingungen eine mehr als dreifach höhere katalytische Produktivität mit AdoPropen **1** als das Wildtyp-Enzym (TTN 10 ± 2 vs. 3 ± 2 für WT). In Reaktionen mit dem natürlichen Substrat AdoMet **12** war der TTN der Variante im Vergleich zum WT reduziert (108 ± 6 vs. 296 ± 38). Der k_{cat} -Wert bezogen auf das natürliche Substrat **12** war durch die Mutation nicht beeinflusst worden ($7,6 \pm 4,7 \text{ min}^{-1}$ vs. $8,5 \pm 5,7 \text{ min}^{-1}$).

Diese Analysen zeigten, dass sowohl TTN- als auch k_{cat} - und K_M -Wert der Variante V34A für AdoPropen **1** im Vergleich zum Wildtyp-Enzym verbessert sind. Die beobachtete nahezu quantitative Umsetzung von m^7 GpppA **9** zu N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** in Biokonversionen der Variante beruht neben der hohen Produktionsrate in *E. coli*-Zellen auf einer Vielzahl weiterer, verbesserter Eigenschaften.

Beispielsweise konnte ein signifikant höherer TTN-Wert für GlaTgs2-V34A bestimmt werden. Eine Verbesserung dieses Parameters könnte auf der höheren Wechselzahl k_{cat} aber auch auf einer erhöhten Stabilität der Variante im Vergleich zum Wildtyp beruhen.

Um hierüber eine Aussage treffen zu können, wurde die Thermostabilität der Enzyme auf Basis sogenannter T_{50} -Werte bestimmt. Als T_{50} bezeichnet man die Temperatur, die nach einer 15-minütigen Inkubation zu einer 50 %igen Reduzierung der enzymatischen Aktivität führt.^[258] Das jeweilige Enzym wurde dafür bei unterschiedlichen Temperaturen zwischen 37 °C und 45 °C für 15 Minuten inkubiert und für die Biokonversion von m^7 GTP (200 µM) mit AdoMet (**12**, 300 µM) eingesetzt. Die Reaktionen wurden für einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und die Produktbildung anschließend mittels RP-HPLC analysiert. Die jeweils generierte Menge der hypermethylierten Kappe $m^{2,7}$ GTP in Abhängigkeit der Präinkubationstemperatur des Enzyms wurde mittels eines Boltzmann-Plots (*Origin*) dargestellt. Der T_{50} -Wert des Wildtyp-Enzyms war mit einem Wert von $39,9 \pm 0,2$ °C niedrig, was darauf hindeutet, dass die Evolvierbarkeit gering ist^[259]. Für die Variante GlaTgs2-V34A wurde ein T_{50} -Wert von $40,4 \pm 0,2$ °C ermittelt. Die Thermostabilität wurde durch die eingeführte Substitution beeinflusst und der verbesserte TTN-Wert kann sowohl auf eine höhere Wechselzahl als auch auf die verbesserte Thermostabilität der Variante zurückgeführt werden. Die beobachtete quantitative Umsetzung von m^7 GpppA **9** zu N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** war somit das Resultat verschiedenster Faktoren, die in Tabelle 2.1 zusammengefasst sind.

Tabelle 2.1 **Zusammenfassung Enzym-charakterisierender Parameter der Variante GlaTgs2-V34A im Vergleich zum Wildtyp.** Die Parameter Substrataffinität K_M , Wechselzahl k_{cat} und TTN-Wert wurden in Bezug auf das natürliche Cosubstrat AdoMet (**12**) sowie das Analogon AdoPropen (**1**) für die Variante GlaTgs2-V34A (V34A) und das Wildtyp-Enzym (WT) bestimmt. Darüber hinaus wurde die Thermostabilität T_{50} beider Enzyme bestimmt.

	$k_{cat}(\mathbf{12})/\text{min}^{-1}$	TTN(12)	$k_{cat}(\mathbf{1})/\text{min}^{-1}$	TTN(1)	$K_M(\mathbf{1})/\mu\text{M}$	$T_{50}/^\circ\text{C}$
WT	8,5±5,7	296±38	0,09±0,08	3,2±2,3	151±19	39,9±0.2
V34A	7,6±4,7	108±6	0,18±0,08	9,7±1,7	57±29	40,4±0.2

Es wurde gezeigt, dass durch eine einzige Aminosäuresubstitution eine Vielzahl von Parametern des Enzyms GlaTgs2 optimiert wurde. Zum einen konnte eine bis zu 30-fach höhere Produktionsrate der Variante im Vergleich zum Wildtyp-Enzym beobachtet werden, des Weiteren besaß die Variante eine dreifach höhere Substrataffinität, eine zweifach höhere Wechselzahl und einen dreifach höheren TTN-Wert für das AdoMet-Analogon AdoPropen **1** als das Wildtyp-Enzym.

2.5.5 Charakterisierung des Substratspektrums der Variante GlaTgs2-V34A

Die Charakterisierung der Variante GlaTgs2-V34A hatte gezeigt, dass sowohl ihre kinetischen Parameter als auch Thermostabilität, TTN und Produktionsrate im Vergleich zum Wildtyp verbessert sind und in den entsprechenden durchgeführten Biokonversionen bis zu 900 μM der alkenylierten Kappe N^2 -Allyl- $m^7\text{GpppA}$ **14** unter Verwendung von AdoPropen **1** als Cosubstrat erhalten werden. Der enzymatische Transfer der Allylgruppe durch GlaTgs2-V34A stellte somit eine effiziente enzymatische Modifizierung der eukaryotischen Kappe dar und machte diese zugänglich für die Photoclick- (Kapitel 2.7) sowie die Thiol-En-Click-Reaktion (Kapitel 2.6).

Um gegebenenfalls auch weitere Click-Reaktionen für die chemische Markierung der mRNA-Kappe nutzen zu können, sollte zunächst das Substratspektrum der Variante untersucht werden. Dabei würde der enzymatische Transfer einer Alkynylgruppe beispielsweise durch Nutzung des Cosubstrats AdoEnYn **4** die Möglichkeit zur Markierung mittels CuAAC eröffnen. Darüber hinaus sollte die Aktivität der Variante gegenüber den AdoMet-Analoga 2-Me-AdoPropen **2** und AdoBenzyl **3** getestet werden. Diese konnten das Spektrum möglicher Click-Reaktionen zwar nicht erweitern, aber genutzt werden, um das Substratspektrum der

Variante zu charakterisieren. Hierdurch könnte die Wahl potentieller Analoga zur Etablierung weiterer Click-Reaktionen, wie beispielsweise der inversen Diels-Alder-Reaktion, in folgenden Projekten vereinfacht werden. Zunächst wurde die Variante V34A für Biokonversionen mit AdoEnYn **4** als Cosubstrat eingesetzt, da der Transfer dieser Gruppe die Möglichkeit eröffnete, die bereits gut charakterisierte CuAAC zur Modifizierung von mRNA einsetzen zu können.

Josephin Holstein konnte im Rahmen ihrer Masterarbeit zeigen, dass die Variante einen zweifach höheren Umsatz als das Wildtyp-Enzym mit AdoEnYn **4** aufweist und die Generierung von 25 % der penteninylierten Kappe N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA (P^1 -Adenosin(5')- P^3 -[N^2 -pent-2-en-4-ynyl,7-methylguanosin(5')]triphosphat) **15** ermöglicht (Abbildung 2.18).^[235]

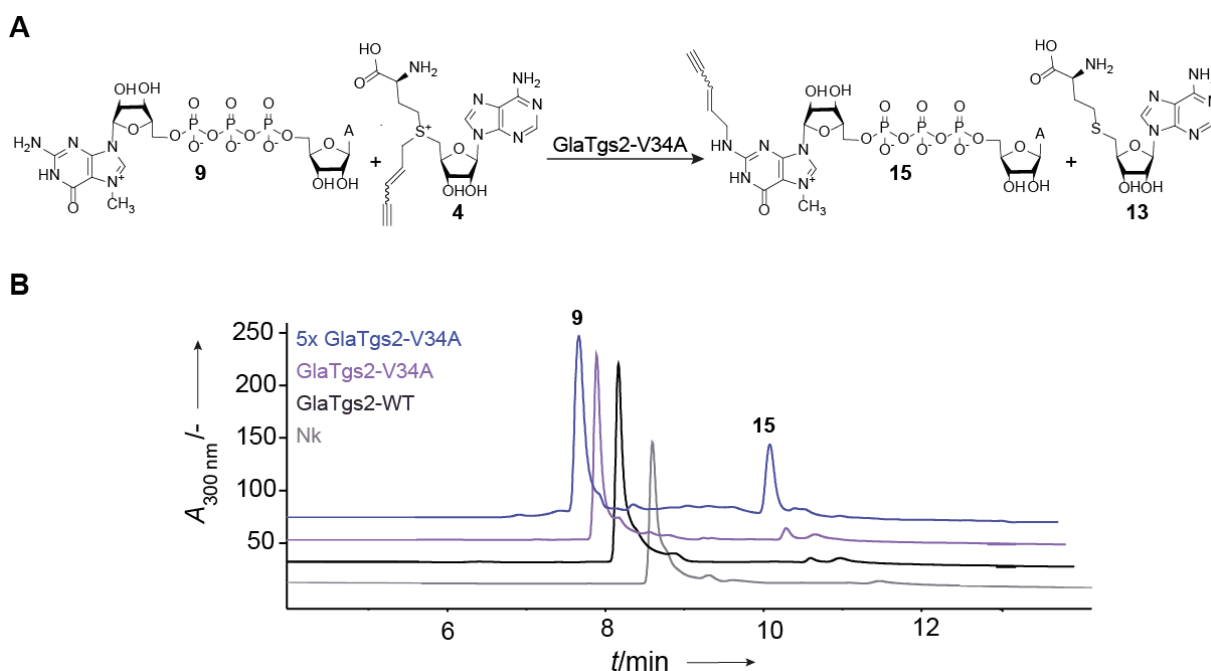


Abbildung 2.18 **Charakterisierung der Biokonversion von m^7 GpppA zu N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA durch die Variante GlaTgs2-V34A.** Die Variante GlaTgs2-V34A sowie das Wildtyp-Enzym wurden zur Generierung von N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA **15** eingesetzt und die Biokonversionen mittels RP-HPLC analysiert. **A)** Reaktionsschema der Biokonversion. **B)** RP-HPLC-Analyse der Biokonversionen. Die Variante wurde in äquimolarer Konzentration (GlaTgs2-V34A, lila) und in fünffach höherer Konzentration (130 μM , 5xGlaTgs2-V34A, blau) bezogen auf das Wildtyp-Enzym (GlaTgs2-WT, schwarz) für die Biokonversion von m^7 GpppA **9** zu N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA **15** eingesetzt. Die Reaktionen sowie eine Kontrolle ohne Enzym (Nk, grau) wurden nach 3 h bei 37 °C mittels RP-HPLC (Absorption 300 nm) charakterisiert. In der Kontrolle (Nk, hellgrau) ist das Signal des Edukts m^7 GpppA **9** nachweisbar. In der GlaTgs2-WT-katalysierten Reaktion wurde ein zusätzliches Signal detektiert, das aufgrund der Retentionszeit ($t_R=11,3$ min) und des UV-Spektrums (nicht gezeigt) **15** zugeordnet wurde. Unter identischen Bedingungen weist **15** in der GlaTgs2-V34A-katalysierten Reaktion ein deutlicheres Signal auf und in Gegenwart höherer GlaTgs2-V34A-Konzentrationen konnte **15** in einer Ausbeute von 25 % erhalten werden.

Allerdings zeigte sich, dass AdoEnYn **4** deutlich schlechter als AdoPropen **1** umgesetzt wird. Dies lässt darauf schließen, dass die zu transferierende Gruppe nicht aus dem Enzym hinaus, sondern in das Innere des aktiven Zentrums hinein ragt. Die längere Penteninygruppe wird dabei mehr Interaktionen mit den umgebenden Aminosäuren ausbilden und daher schlechter umgesetzt werden. Mit AdoEnYn **4** als Cosubstrat konnten durch GlATgs2-V34A daher nur 25 % des Kappen-Analogons m^7 GpppA **9** modifiziert werden. Diese Ausbeute war aber ausreichend, um eine chemo-enzymatische Strategie auf Basis der CuAAC zu etablieren (Kapitel 2.8).

Um das Substratspektrums der Variante weiter definieren zu können, wurde diese in Biokonversionen mit 2-Me-AdoPropen **2** bzw. AdoBenzyl **3** eingesetzt. Zunächst wurden hierfür 400 μ M des Cosubstrats AdoBenzyl **3** mit 275 μ M m^7 GpppA **9** in Gegenwart der Variante (63 μ M) für drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde jeweils vor sowie nach der Inkubation mittels RP-HPLC analysiert. Die Detektion enthaltener Komponenten in Abhängigkeit der Retentionszeit erfolgte durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 300 nm. Hierbei konnte die Bildung eines neuen Produkts mit einer Retentionszeit von 12,6 Minuten in einer Ausbeute von 40 % bezogen auf die eingesetzte Menge m^7 GpppA **9** beobachtet werden (Abbildung 2.19).

Eine erste Charakterisierung zeigte, dass dieses Produkt ein UV-Spektrum mit dem Kappentypischen zweiten Maximum bei 300 nm aufwies. Darüber hinaus zeigte dieses Molekül eine längere Retentionszeit bezogen auf N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** (t_R =10,6 min) sowie N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA **15** (t_R =11,3 min) und wies somit höhere Hydrophobizität auf. Dies stand im Einklang mit der Möglichkeit, dass es sich hierbei um die modifizierte Kappe N^2 -Benzyl- m^7 GpppA (P^1 -Adenosin(5')- P^3 -[N^2 -benzyl,7-methylguanosin(5')]triphosphat) **19** handelte. Die massenspektrometrische Analyse bestätigte dies. Die Masse des erwarteten Produkts N^2 -Benzyl- m^7 GpppA **19** (ber. $[M]^+$ =877,15 m/z) konnte durch MALDI-TOF-MS-Analyse der Reaktion nachgewiesen werden (Abbildung 2.19). Allerdings war dieses Signal in geringer Intensität auch in einer der Negativkontrollen (Probe+HClO₄), jedoch nicht in den Kontrollen ohne Enzym sowie mit Wildtyp-Enzym nachweisbar.

Es kann somit angenommen werden, dass eine Benzylgruppe auf die mRNA-Kappe übertragen werden konnte und die hierbei erzielten Ausbeuten der modifizierten Kappe **19** deutlich über den Werten des Penteninyltransfers liegen. Für die Varianten GlATgs2-V34A konnte mit AdoBenzyl **3** als Cosubstrat ein vierfach höherer TTN-Wert als mit AdoEnYn **4** ermittelt werden (2 vs. 0,5).

Unter identischen Bedingungen konnte keine Aktivität gegenüber 2-Me-AdoPropen **2** als Cosubstrat nachgewiesen werden. Aus den – in Gegenwart der verschiedenen AdoMet-Analoga – durchgeführten Biokonversionen konnten mehrere Rückschlüsse gezogen werden. Die Biokonversionen mit AdoPropen **1** und AdoEnYn **4** zeigten, dass durch die Variante V34A die mRNA-Kappe effizient enzymatisch modifiziert und für die Markierung mittels verschiedener Click-Reaktionen zugänglich gemacht werden kann.

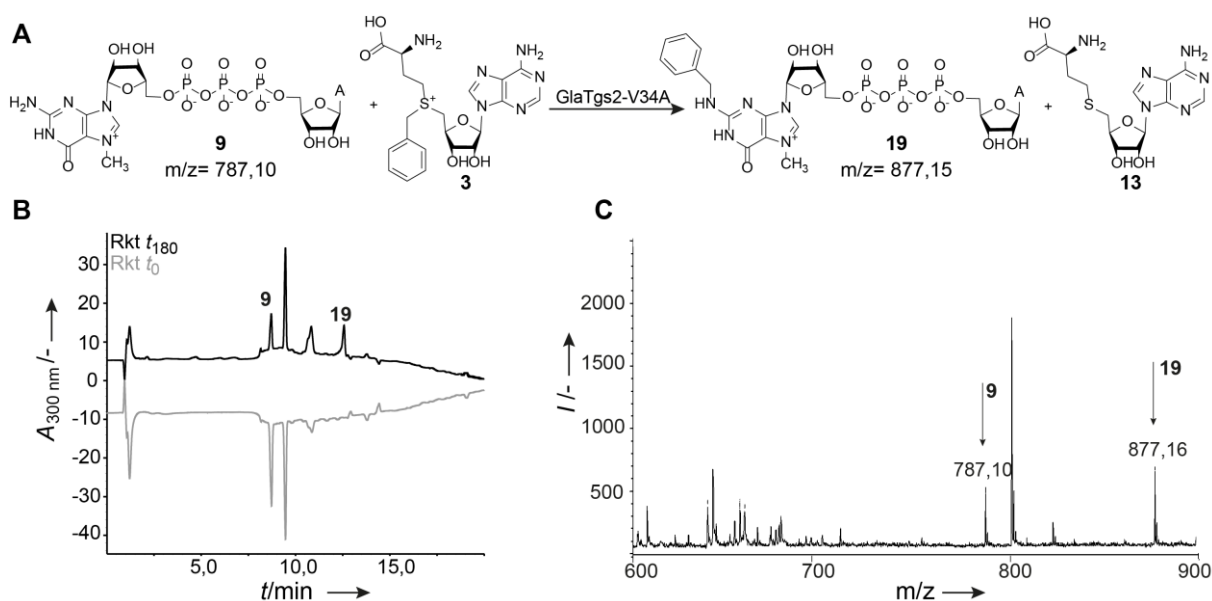


Abbildung 2.19 **Charakterisierung der Biokonversion von m^7GpppA zu N^2 -Benzyl- m^7GpppA durch GlaTgs2-V34A.** **A)** Reaktionsschema der zu katalysierenden Reaktion. **B)** RP-HPLC-Analyse der Biokonversion von m^7GpppA **9** zu N^2 -Benzyl- m^7GpppA **19** durch GlaTgs2-V34A. Die Biokonversion wurde vor (Rkt t_0 , hellgrau) sowie nach einer Inkubation von 3 h bei 37 °C (Rkt t_{180} , schwarz) mittels RP-HPLC (Absorption bei 300 nm) analysiert. Vor der Inkubation konnte das Signal des Edukts m^7GpppA **9** sowie zwei nicht zugeordnete Signale nachgewiesen werden. Nach der erfolgten Biokonversion war ein weiteres Produkt detektierbar, welches aufgrund des UV-Spektrums (nicht gezeigt) sowie der Retentionszeit dem erwarteten Produkt N^2 -Benzyl- m^7GpppA **19** zugeordnet wurde. **C)** MALDI-TOF-MS-Analyse der in B) gezeigten Reaktion. Die Massen des Edukts **9** (ber. $[M]^+ = 787,10\text{ m/z}$; det. $[M]^+ = 787,10\text{ m/z}$) und des erwarteten Produkts **19** (ber. $[M]^+ = 877,15\text{ m/z}$; det. $[M]^+ = 877,16\text{ m/z}$) wurden nachgewiesen.

Auch katalysierte die Variante den Transfer der Benzylgruppe auf die mRNA-Kappe. Neben der Möglichkeit zur Etablierung von CuAAC, Thiol-En-Click- und Photoclick-Reaktion, die mit Alkyl-modifizierten Kappen durchgeführt werden können, besteht daher eventuell auch die Möglichkeit andere planare Moleküle, wie beispielsweise Tetrazine enzymatisch zu übertragen. Eine entsprechend modifizierte Kappe könnte dann in einer inversen Diels-Alder-Reaktion mit einem Norbornen-Derivat umgesetzt werden. Dieser Reaktionstypus wurde bereits als kompatibel mit RNA beschrieben.^[205]

2.6 Thiol-En-Click-Reaktion zur Markierung der allylierten mRNA-Kappe

Die Thiol-En-Click-Reaktion wird vor allem in der Polymerchemie genutzt und ermöglicht die Bildung eines Thioethers. Als Edukte werden hierfür ein Alken sowie eine Thiol-haltige Verbindung eingesetzt. Die Reaktion kann radikalisch initiiert werden, wobei ein entsprechender Katalysator durch Wärme oder Licht aktiviert wird. In dieser Arbeit sollte die allylierte Kappe in Gegenwart des Katalysators VA-044 (2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]dihydrochlorid) mit Biotinthiol **5** umgesetzt werden. Hierdurch sollte eine kovalente Verknüpfung der mRNA-Kappe mit Biotin erreicht werden. Aufgrund von Wechselwirkungen mit zellulären Thiolen könnte eine chemo-enzymatische Strategie basierend auf der Thiol-En-Click-Reaktion nicht in lebenden Zellen genutzt werden. Die Methode könnte aber beispielsweise *in vitro* eingesetzt werden, um mRNA aus Total-RNA zu isolieren.

2.6.1 Biotinylierung allylierter Kappenstrukturen mittels einer Thiol-En-Click-Reaktion

Um eine chemo-enzymatische Strategie zur Markierung von mRNA auf Grundlage der Thiol-En-Click-Reaktion zu etablieren, wurde das zunächst allylierte Kappen-Analogon *N*²-Allyl-m⁷GpppA **14** als Substrat eingesetzt.

Hierzu wurde m⁷GpppA (**9**, 1 mM) in Gegenwart von AdoPropen (**1**, 0,5-1 mM) mit V34A umgesetzt. Die enthaltenen Proteine wurden anschließend durch Zugabe von Perchlorsäure denaturiert. In diesen Biokonversionen wurden 50-90 % (500 µM-900 µM) des allylierten Kappen-Analogons *N*²-Allyl-m⁷GpppA **14** erhalten, welches ohne weitere Reinigung für die chemische Markierung mittels Thiol-En-Click-Reaktion eingesetzt wurde. Zunächst wurden die Proben hierfür mit Argon entgast und unter Luftausschluss mit Biotinthiol (**5**, 40 mM) sowie dem Katalysator VA-044 (800 µM) versetzt. Die Durchführung der Reaktion unter Ausschluss von Sauerstoff war notwendig, um die Oxidation des Thiols zu vermeiden. Entsprechende Kontrollen hatten gezeigt, dass keine Produktbildung in Gegenwart von Sauerstoff zu beobachten war (Daten im Anhang, Kapitel 8.5). Um den Katalysator zu aktivieren und somit die Reaktion zu initiieren, wurden die Reaktionen bei 44 °C inkubiert. Die Produktbildung wurde nach vier sowie acht Stunden mittels RP-HPLC analysiert. In der Reaktion konnte durch Messung der Absorption bei 300 nm während der chromatographischen Trennung der Komponenten ein neues Produkt mit einer Retentionszeit von 13,6 Minuten und dem Kappen-typischen UV-Spektrum nachgewiesen werden

(Abbildung 2.20). Ein entsprechendes Produkt konnte in den Kontrollen, welche die Reaktion zum Zeitpunkt $t=0$ min sowie die Reaktion in Abwesenheit des Katalysator umfasste, nicht beobachtet werden. Ein weiterer Hinweis, dass dieses Signal N^2 -Biotin- m^7 GpppA **16** repräsentierte, konnte aus der Analyse der Chromatogramme gewonnen werden, welche die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten zeigten. Hierzu wurden die Signale des Edukts m^7 GpppA **9** sowie der allylierten Kappe **14** und des Produkts **16** integriert. Es zeigte sich, dass die Menge m^7 GpppA **9** in den Reaktionen zu jedem analysierten Zeitpunkt identisch war. Hingegen nahm der Anteil der allylierten Kappe N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** von 78 % zum Zeitpunkt $t=0$ min über 69 % ($t=4$ h) auf einen Wert von 41 % nach einer Inkubation von acht Stunden ab. In gleichem Maße nahm der Anteil des neuen Produkts zu, was darauf hindeutete, dass das korrespondierende Molekül aus einer Reaktion der allylierten Kappe **14** hervorging. Die massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-TOF-MS bestätigte die Präsenz der N^2 -biotinylierten Kappe **16** in der Reaktion (ber. $[M]^+=1130,24$ m/z; det. $[M]^+=1130,14$ m/z; Abbildung 2.20).

Allerdings zeigte die Auswertung der HPLC-Analyse, dass nur etwa 30 % der allylierten Kappe **14** chemisch modifiziert worden waren. Eine solche Ausbeute wäre nicht ausreichend, um quantitativ mRNA aus zellulärer Total-RNA zu isolieren. Es wurden daher verschiedene Ansätze getestet, um die Umsetzung zu verbessern. Die Biotinthiolkonzentration wurde auf einen 150-fachen Überschuss, bezogen auf die Konzentration N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14**, erhöht, um das chemische Gleichgewicht weiter auf die Produktseite zu verschieben. Allerdings zeigte die Analyse mittels RP-HPLC, dass hierdurch eher der gegenteilige Einfluss auf die Ausbeute an biotinylierter Kappe **16** erzielt wurde. Unter diesen Bedingungen wurden lediglich 18 % des enzymatisch gebildeten N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** biotinyliert. Tatsächlich konnte die Ausbeute verbessert werden, wenn Biotinthiol **5** in geringerem Überschuss eingesetzt wurde. In Gegenwart eines 20-fachen Überschusses dieses Reagenzes wurde N^2 -Biotin- m^7 GpppA **16** in einer Ausbeute von 39 % bezogen auf N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** erhalten. Dennoch war es auch so nicht möglich, eine quantitative Umsetzung zu erreichen.

Des Weiteren wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Biotinylierung der allylierten Kappe **14** untersucht. Hierzu wurde die enzymatische Transferreaktion entweder durch Zugabe von Perchlorsäure oder durch Hitzedenaturierung der enthaltenen Proteine gestoppt, so dass die Reaktion unter sauren sowie basischen Bedingungen für die chemische Modifizierung eingesetzt werden konnte. Die Ansätze wurden in Gegenwart von Biotinthiol (**5**, 33 mM, ca. 60-facher Überschuss) und Katalysator VA-044 (1,3 mM) inkubiert und nach vier sowie acht Stunden bei 44 °C mittels RP-HPLC analysiert. Es zeigte sich, dass auch unter basischen

Bedingungen das erwartete Produkt in einer Ausbeute von 17 % bezogen auf N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** erhalten wurde. Allerdings war der Umsatz hier geringer als in der Reaktion, die unter sauren pH-Bedingungen durchgeführt wurde, da in dieser zum gleichen Zeitpunkt ein Umsatz von 23 % beobachtet wurde.

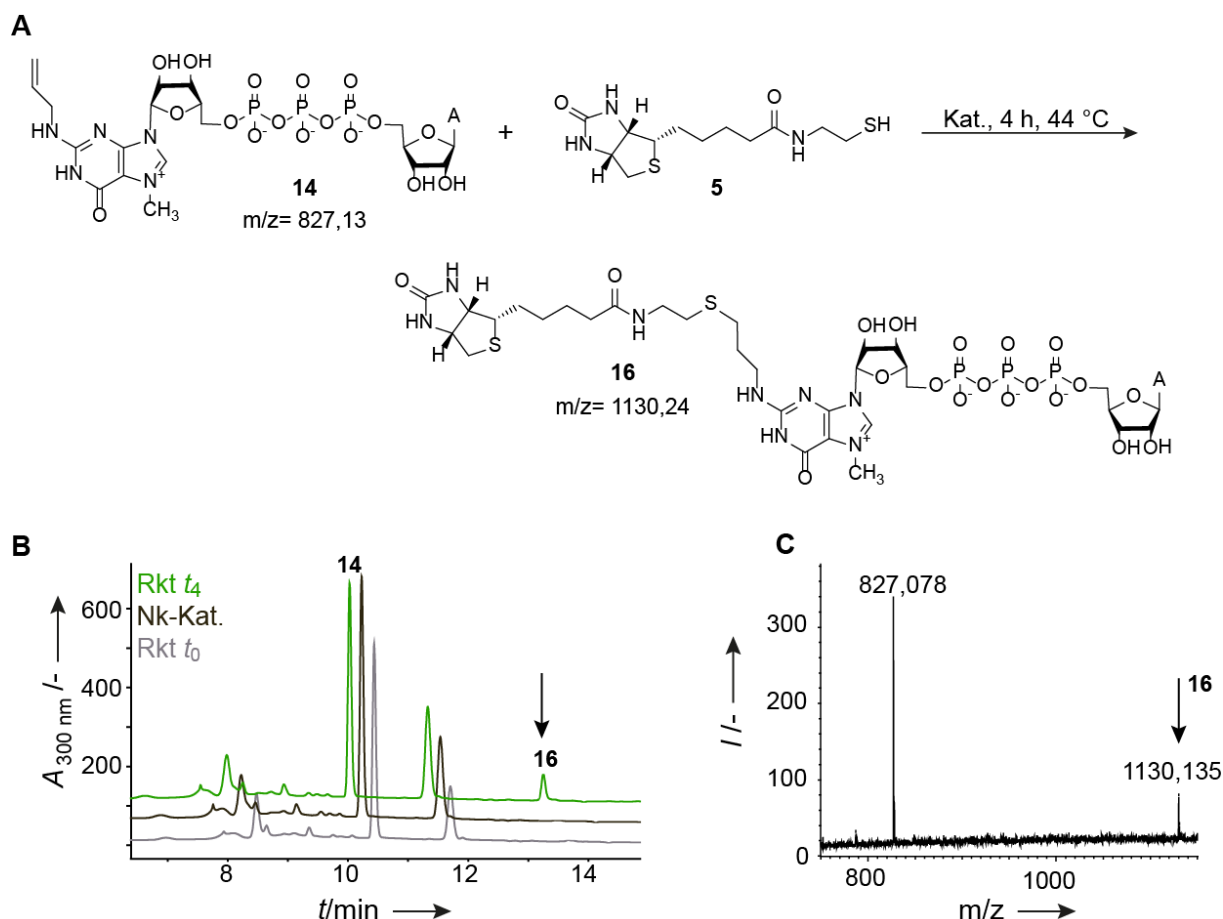


Abbildung 2.20 **Chemische Modifizierung des allylierten Kappen-Analogons N^2 -Allyl- m^7 GpppA mittels Thiol-En-Click-Reaktion.** **A)** Reaktionsschema zur Markierung von N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** in einer Thiol-En-Click-Reaktion mit Biotinthiol **5**. **B)** HPLC-Analyse der Thiol-En-Click-Reaktion. Die Bildung eines neuen Peaks ($t_R = 13,6 \text{ min}$) konnte nach einer Inkubation von 4 h beobachtet (Rkt t_4 , grün) und N^2 -Biotin- m^7 GpppA **16** zugeordnet werden. In den Negativkontrollen (Thiol-En-Click-Reaktion zum Zeitpunkt $t=0$, Rkt t_0 , grau; bzw. Reaktion ohne Katalysator; Nk-Kat., schwarz) wurde kein entsprechendes Signal detektiert. **C)** MALDI-TOF-MS-Analyse der in **B)** gezeigten Reaktion (t_4). Die Massen des Edukts **14** (ber. $[M]^+ = 827,13 \text{ m/z}$; det. $[M]^+ = 827,08 \text{ m/z}$) als auch des erwarteten Produkts **16** (Pfeil; ber. $[M]^+ = 1130,24 \text{ m/z}$; det. $[M]^+ = 1130,14 \text{ m/z}$) wurden detektiert.

Darüber hinaus war auffällig, dass lediglich bei einem pH-Wert von 8,0 in geringem Maße (7 % bezogen auf N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14**) die Bildung von **16** auch in Abwesenheit des Katalysators beobachtet werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass unter diesen Bedingungen die Reaktion nach einem anderen Mechanismus, beispielsweise einer nukleophilen Addition, ablaufen könnte.

Wenn das Kappen-Analogon $m^7\text{GTP}$ enzymatisch allyliert und als Substrat für die Thiol-En-Click-Reaktion eingesetzt wurde, konnte ebenfalls die Bildung eines neuen Produkts in der HPLC-Analyse (t_R ca. 13 min) beobachtet werden, welches aus Reaktion des alkenylierten Edukts N^2 -Allyl- $m^7\text{GTP}$ hervorging. Auch die Masse des erwarteten Produkts N^2 -Biotin- $m^7\text{GTP}$ (ber. $[M]^+ = 881,51$ m/z; det. $[M]^+ = 881,15$ m/z) konnte mittels HPLC-ESI-TOF-MS nachgewiesen werden.

Auch die Biotinylierung von N^2 -Allyl- $m^7\text{GTP}$ konnte erfolgreich durchgeführt werden. Dies war nach den Ergebnissen der Thiol-En-Click-Reaktion mit N^2 -Allyl- $m^7\text{GpppA}$ **14** zu erwarten gewesen, da $m^7\text{GTP}$ ein weniger komplexes Substrat darstellt. Allerdings war die Charakterisierung der Biotinylierung von N^2 -Allyl- $m^7\text{GTP}$ dennoch interessant, da die HPLC-Analyse bei genauerer Auswertung die Entstehung zweier neuer Signale mit Retentionszeiten von 13 Minuten und 13,2 Minuten zeigte. Dies deutete darauf hin, dass zwei Produkte in der Thiol-En-Click-Reaktion gebildet worden waren, beispielsweise durch terminalen und internen Angriff des Thiols an die Doppelbindung. Dies wird bekräftigt durch die Beobachtung, dass der Anteil des später eluierten Produkts bei Durchführung der Reaktion unter sauren Bedingungen höher ist, als unter basischen Bedingungen. Unter basischen Bedingungen wird hingegen das Produkt mit kürzerer Retentionszeit in höherer Ausbeute gebildet. Man könnte somit beispielsweise vermuten, dass bei niedrigem pH-Wert der radikalische Mechanismus bevorzugt abläuft und zur Bildung des anti-Markovnikov-Additionsprodukts führt. Bei basischen Bedingungen könnte hingegen eine nukleophile Addition ablaufen und zur Bildung des Markovnikov-Produkts führen. Allerdings scheint dies eher unwahrscheinlich, da die Doppelbindung ein terminales Alken darstellt und eher unreaktiv gegenüber einem nukleophilen Angriff ist. Es konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig nachgewiesen werden, ob die Detektion zweier neuer Signale in der HPLC-Analyse auf die Entstehung von Regioisomeren des erwarteten Produkts N^2 -Biotin- $m^7\text{GTP}$ zurückzuführen ist oder ob andere Reaktionen bzw. Nebenreaktion auftreten. Hierzu müssten weitere Charakterisierungen wie NMR- oder Kristallstrukturanalysen durchgeführt werden, wobei die benötigten Mengen der entsprechenden Verbindungen aufgrund einer fehlenden Reinigungsstrategie und der Notwendigkeit des zunächst durchzuführenden enzymatischen Schritts bisher nicht erreicht werden konnten. Alternativ wäre es möglich, Referenzverbindungen chemisch zu synthetisieren, um so Aussagen über die Identität der Substrate durch Vergleich der Retentionszeiten zu bekommen. Weiterhin konnte nicht geklärt werden, warum ein entsprechendes doppeltes Signal in der HPLC-Analyse nicht erhalten wurde, wenn N^2 -Allyl- $m^7\text{GpppA}$ **14** als Substrat in der Thiol-En-Click-Reaktion eingesetzt

wurde. Es besteht aber die Möglichkeit, dass auch bei der Biotinylierung von **14** verschiedene Produkte gebildet werden, deren Retentionszeiten aber einen zu geringen Unterschied zeigen, als dass sie in der RP-HPLC-Analyse getrennt beobachtet werden können. Trotz der geringen Ausbeuten N^2 -Biotin- m^7 GTP von 11-29 % bezogen auf das Edukt N^2 -Allyl- m^7 GTP und fehlender detaillierter Charakterisierung der entstehenden Produkte sollte untersucht werden, ob es prinzipiell möglich wäre, das biotinylierte Kappen-Analogon N^2 -Biotin- m^7 GTP über Interaktionen mit Streptavidin aus der Reaktion zu isolieren. Eine solche Strategie könnte potentiell genutzt werden, um enzymatisch allylierte mRNA aus Total-RNA eukaryotischer Zellen zu isolieren. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde die Thiol-En-Click-Reaktion unter Verwendung von N^2 -Allyl- m^7 GTP als Substrat zunächst neutralisiert, mit Streptavidin-*Beads* versetzt und nach Entfernung der Matrix mittels RP-HPLC analysiert. Allerdings konnte keine Verringerung des Signals korrespondierend zum biotinylierten Kappen-Analogon beobachtet werden, was darauf hindeutete, dass keine Immobilisierung dieses Moleküls auf der Matrix erfolgt war. Dies lässt sich erklären, da mithilfe der eingesetzten Menge Streptavidin-*Beads* (*bioclone*) lediglich 40 pmol Biotin gebunden werden konnten. In 5 μ L der Thiol-En-Click-Reaktion lagen hingegen 200 nmol Biotinthiol **5** vor, so dass wahrscheinlich eine Sättigung der *Beads* mit freiem Reagenz stattgefunden hatte und daher keine Bindung von N^2 -Biotin- m^7 GTP beobachtet werden konnte.

2.6.2 Versuche zur Biotinylierung Kappen-tragender RNA mittels Thiol-En-Click-Reaktion

Eine Immobilisierung von N^2 -Biotin- m^7 GTP auf Streptavidin-*Beads* konnte nicht erfolgreich etabliert werden (Kapitel 2.6.1). Als Grund dafür wurde eine Sättigung der Streptavidin-*Beads* mit nicht umgesetztem Biotinthiol **5** angenommen. Im Folgenden wurde die Möglichkeit untersucht, ob eukaryotische mRNA aus Total-RNA mittels der chemo-enzymatischen Strategie kovalent mit Biotin verknüpft und auf Streptavidin-*Beads* immobilisiert werden könnte. Hierbei würde durch Fällung eine Trennung von biotinyliertem Produkt und freiem Biotinthiol **5** erreicht. Die Versuche wurden allerdings zunächst ohne Fällungsschritt durchgeführt. Schon hierbei zeigte sich, dass eine Biotinylierung von mRNA mittels Thiol-En-Click-Chemie nicht erfolgreich war, da unabhängig von der enzymatischen Modifizierung eine Verminderung des RNA-Gehaltes nach der Click-Reaktion und Zugabe der *Beads* auftrat. Dabei war vor allem eine Minimierung des Anteils von 28S- und 18S-RNA zu beobachten. Dies zeigte, dass eine unspezifische Markierung zellulärer RNA durch Biotinthiol **5** erfolgte. Es lag somit kein freies Biotinthiol mehr in der Reaktion vor, welches

Bindungsstellen der Streptavidin-*Beads* blockieren könnte, wodurch die Immobilisierung unspezifisch markierter RNA auftrat. Eine Variierung des Protokolls, beispielsweise eine Durchführung der Reaktion ohne Katalysator oder Erwärmen der *Beads*, um unspezifische Interaktionen zu minimieren, brachte keinen Erfolg. Einen generellen Nachteil in der Durchführung dieses Versuches stellte außerdem die geringe mRNA-Konzentration von ca. 0,05 μM in den Reaktionen dar, die aufgrund folgender Annahmen geschätzt werden konnte: Total-RNA wurde aus 1×10^8 PC3-Zellen isoliert und in Konzentrationen von bis zu 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ erhalten. In den durchgeführten Reaktionen lag somit eine RNA-Konzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ vor. Der durchschnittliche Anteil von mRNA in Total-RNA liegt bei 5 %.^[260] Wenn ein durchschnittliches Molekulargewicht der mRNAs von 510 kDa (1 500 Nukleotide mit Molekulargewicht von je 0,34 kDa) angenommen wird, ergibt sich eine Konzentration von 0,05 μM mRNA in der Biokonversion. Das Enzym GlaTgs2-WT besitzt eine Substrataffinität K_M von 7 μM für das Substrat m^7GpppA .^[229] Aus eigenen Daten konnte für die Variante GlaTgs2-V34A ein K_M -Wert von $150 \pm 57 \mu\text{M}$ für m^7GpppA **9** bestimmt werden. Es muss somit angenommen werden, dass in Gegenwart von nur 0,05 μM Substrat der enzymatische Transfer gering ist und zu wenig allyliertes Produkt **14** gebildet wird, um erfolgreich eine Thiol-En-Click-Reaktion durchführen zu können. Ein weiterer Nachteil, der sich aus der Durchführung der chemo-enzymatischen Markierung mit mRNA aus Total-RNA ergab, war, dass selbst bei erfolgreicher Markierung nur eine minimale Menge biotinylierter mRNA gebildet würde, deren Immobilisierung auf *Beads* in Gegenwart der Überschusses anderer zellulärer RNAs vermutlich nicht nachweisbar wäre. Um eine definierte Ausgangssituation zu erhalten, wurde daher RNA (16-3 RNA, 106 nt) durch *in vitro*-Transkription hergestellt und in einer Konzentration von 56 μM für eine *Capping*-Reaktion mittels des *Vaccinia Capping* Enzyms eingesetzt. Anschließend erfolgte die Allylierung der RNA (140 μM) durch GlaTgs2-V34A. Allerdings muss erwähnt werden, dass die Effizienz der *Capping*-Reaktion nicht bestimmt werden konnte, so dass lediglich die Konzentration der RNA aber nicht explizit die Konzentration Kappen-tragender RNA angegeben werden konnte. Anschließend wurden die Proben für die Thiol-En-Click-Reaktion in Gegenwart von 17 mM Biotinthiol **5** und 850 μM VA-044 eingesetzt. Unter gleichen Bedingungen wurde eine Reaktion unter Verwendung von m^7GpppA **9** als Substrat durchgeführt. Dabei zeigte sich in der Analyse mittels RP-HPLC, dass sowohl Allylierung als auch Biotinylierung des minimalen RNA-Substrats m^7GpppA **9** erfolgreich durchgeführt werden konnten. Eine mögliche Biotinylierung der RNA wurde mittels eines *Dot Blots* unter Verwendung von Extravidin-AP (1: 10 000) überprüft. Es konnte keine chemo-enzymatische Markierung der RNA nachgewiesen werden. Da bereits bei

Verwendung von Total-RNA eine unspezifische Markierung durch Biotinthiol **5** beobachtet wurde, deutete dieses Ergebnis darauf hin, dass die Detektion nicht erfolgreich war. Diese Reaktion müsste daher erneut durchgeführt und mittels eines *Gelshifts* beziehungsweise nach Fällung der RNA durch Immobilisierung auf Streptavidin-*Beads* analysiert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein chemo-enzymatischer Ansatz auf Grundlage der Thiol-En-Click-Reaktion erfolgreich für die Modifizierung der Kappen-Analoga m⁷GTP und m⁷GpppA **9** etabliert werden konnte. Eine Erweiterung dieses Ansatzes zur Isolierung von RNA konnte hingegen nicht erreicht werden. Neben den geringen Konzentrationen Kappen-tragender RNA und der geringen Substrataffinität der Variante gegenüber m⁷GpppA **9**, bestand das größte Problem in einer unspezifischen Markierung des Biomoleküls RNA.

In folgenden Schritten müsste daher zunächst Substrataffinität der Variante GlaTgs2-V34A gegenüber der Kappe verbessert werden, um eine ausreichende Modifizierung eukaryotischer mRNA zu erreichen.

Auch müsste sichergestellt werden, dass eine unspezifische Markierung des Biomoleküls RNA vermieden wird. Hierzu könnte es unter Umständen sinnvoll sein, das Verhältnis von Alken und Thiol weiter zu optimieren, um die Reaktion auch in Gegenwart eines geringeren molaren Überschusses Biotinthiol **5** durchführen zu können.

Darüber hinaus müsste anhand der Kappen-Analoga untersucht werden, ob die Thiol-En-Click-Reaktion generell in Gegenwart niedriger Alkenkonzentrationen durchgeführt werden kann. Denn bei Verwendung von Total-RNA wird, auch wenn die enzymatische Allylierung der mRNA erfolgreich ist, das Substrat für die Thiol-En-Click-Reaktion in nanomolaren Konzentrationen und nicht wie in Vorversuchen mit m⁷GpppA **9** in Konzentrationen von bis zu 1000 µM vorliegen. Dies wird sich vermutlich nachteilig auf die Ausbeuten der Thiol-En-Click-Reaktion auswirken.

2.7 Photoclick-Reaktion zur Markierung modifizierter mRNA-Kappen

Die Photoclick-Reaktion sollte zur Fluoreszenzmarkierung enzymatisch modifizierter Kappenstrukturen etabliert werden, um mit dieser bioorthogonalen Click-Reaktion einen Ausgangspunkt zur Adaption einer solchen chemo-enzymatischen Strategie für *in vivo*-Anwendungen zu haben.

2.7.1 Photoclick-Reaktion – DFT-Kalkulationen der Energien beteiligter Grenzorbitale

Der Term „Photoclick-Reaktion“ beschreibt die 1,3-dipolare Cycloaddition eines Alkens mit einem Nitril-Imin, die zur Bildung eines Pyrazolins führt. Eine grundlegende Voraussetzung für die Bildung des Cycloaddukts ist eine ähnliche Grenzorbitalenergie der eingesetzten Edukte. Für die Photoclick-Reaktion konnte eine Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Energie des höchsten besetzten Orbitals im Nitril-Imin nachgewiesen werden.^[183] In dieser Studie wurden auch die HOMO-Energien der Nitril-Imine **6a** (-6,65 eV) sowie **7a** (-7,02 eV, Strukturen in Abbildung 2.21) berechnet und deren Reaktivität mit 4-Penten-1-ol als Dipolarophil untersucht.^[183] Die enzymatisch modifizierte mRNA-Kappe stellt hingegen ein N^2 -allyliertes Dipolarophil dar, so dass die beschriebenen Zusammenhänge von Reaktionsgeschwindigkeit und HOMO-Energie nicht direkt für die Markierung dieses Moleküls übertragbar waren. Auch in anderen erfolgreich durchgeführten Photoclick-Reaktionen wurden keine N -allylierten Dipolarophile, sondern O - beziehungsweise C -allylierte Edukte eingesetzt.^[154,176]

Um eine erste Aussage über die Möglichkeit einer Photoclick-basierten Markierung der mRNA-Kappe zu erhalten, wurden durch Prof. Herrmann (Institut für Anorganische Chemie, Universität Hamburg) Kohn-Sham-Dichtefunktionaltheorie-Kalkulationen (KS-DFT-Kalkulationen) durchgeführt. Hierüber konnten die Grenzorbitalenergien der Nitril-Imine korrespondierend zu den Tetrazolen **6** und **7** (**6a** und **7a**) sowie der Dipolarophile N^2 -Allyl- m^7 GTP- H^+ **23** und N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GTP- H^+ **24** berechnet werden. Die Strukturformeln dieser Verbindungen sind in Abbildung 2.21 dargestellt.

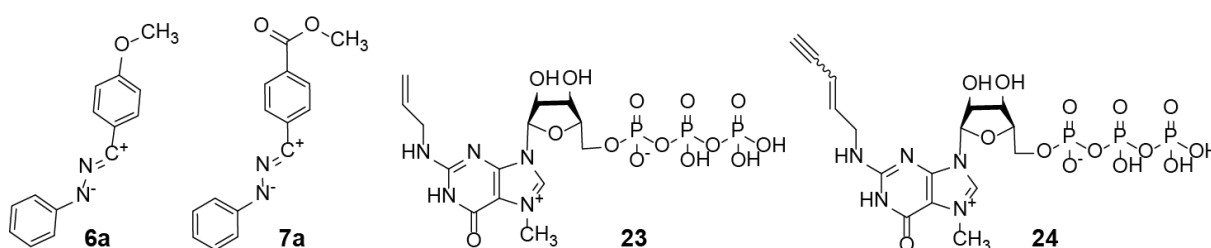


Abbildung 2.21 Strukturformeln der Moleküle, deren Grenzorbitalenergien mittels KS-DFT-Kalkulationen berechnet wurden. Nitril-Imine der Tetrazole **6** und **7** (**6a** und **7a**) sowie Dipolarophile N^2 -Allyl- m^7 GTP- H^+ **23** und N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GTP- H^+ **24**.

Die Dipole **6a** und **7a** wurden gewählt, da sich ihre HOMO-Energien um 0,48 eV unterscheiden,^[183] was die Reaktivität gegenüber der allylierten Kappe beeinflussen könnte. So unterscheiden sich die Geschwindigkeitskonstanten der Tetrazole **6** und **7** mit 4-Penten-1-ol als Dipolarophil um den Faktor 40, was den Einfluss der Grenzorbitalenergien auf die

Reaktionsgeschwindigkeit der Cycloaddition zeigt. Die Tetrazole **6** und **7** wurden auch gewählt, da sie bereits erfolgreich für die Visualisierung alkenylierter Proteine *in vivo* eingesetzt, was belegt, dass die gebildeten Pyrazoline eine höhere Quantenausbeute als die Edukte aufweisen.^[154,176]

Ziel der durchgeführten Rechnungen war es, aus den berechneten Energien und Formen der Grenzorbitale in grober Näherung Aussagen über Kinetik und Thermodynamik der charakterisierten Reaktionen treffen zu können. Die FMO-Theorie (*frontier molecular orbital theory*, Grenzorbitaltheorie) besagt, dass der Energiegewinn einer Reaktion umso größer ist, je ähnlicher die Energien beteiligter Orbitale sind.^[261–263] Das Klopmann-Salem-Theorem hingegen betrachtet den Einfluss der Grenzorbitalenergien unter kinetischen Aspekten und besagt unter anderem, dass die Aktivierungsenergie einer Reaktion umso geringer ist, je ähnlicher die Energien beteiligter Orbitale sind.^[264] Die gleichen Rückschlüsse können auch dem Hammond-Postulat entnommen werden, welches in erster Näherung einen Zusammenhang zwischen Kinetik und Thermodynamik einer Elementarreaktion beschreibt.^[265] Dieses besagt, dass Orbitale, die eine ähnliche Energie aufweisen auch strukturell ähnlich sind. Der Übergangszustand wird unter diesen Umständen den jeweiligen Edukten ähneln und es wird wenig Energie für eine Verzerrung der Orbitale benötigt. Solche Reaktionen weisen eine geringe Aktivierungsenergie auf und verlaufen exergonisch. In endergonischen Reaktionen wird Übergangszustand dem jeweiligen Produkt ähneln und die Aktivierungsenergie wird dementsprechend hoch sein.

Auf Grundlage dieser Theorien sollten in ersten Näherungen die Reaktivitäten der Nitril-Imine gegenüber der modifizierten Kappe N^2 -Allyl- m^7 GTP- H^+ **23** vorhergesagt werden. Darüber hinaus sollte auch eine Aussage erhalten werden, ob eine entsprechende Cycloaddition mit der alkenylierten Kappe N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 G ablaufen würde, da alle beschriebenen bioorthogonalen Photoclick-Reaktionen lediglich zur Modifizierung von Alkenen eingesetzt wurden.^[154,176] Da konjugierte Alkine/Alkene, wie es für die Penteninygruppe der Fall wäre, eine niedrigere LUMO-Energie als vergleichbare nichtkonjugierte Alkine/Alkene aufweisen sollten,^[263] könnte durch Verwendung der alkenylierten Kappe als Edukt möglicherweise eine bessere Übereinstimmung der Grenzorbitalenergien und somit erhöhte Reaktivität erreicht werden.

Für die hier beschriebenen Rechnungen wurde eine gewinkelte Geometrie der Nitril-Imine^[179] sowie der α -deprotonierte Zustand der Dipolarophile angenommen. Als Ergebnisse der KS-DFT-Kalkulationen wurden die Energien und Formen der Grenzorbitale der einzelnen Edukte erhalten (Tabelle 2.2).

Als Grenzorbitale der Dipolarophile wurden die Molekülorbitale betrachtet, die ein positives Überlappungsintegral mit den Grenzorbitalen HOMO und LUMO der Dipole zeigen. Für N^2 -Allyl- m^7 GTP- H^+ **23** sind dies HOMO-15 und LUMO+2, für **24** hingegen HOMO-9 und LUMO. Die entsprechenden Molekülorbitale sowie korrespondierenden Energien sind im Vergleich mit den Daten für Nitril-Imin **6a** in Abbildung 2.22 dargestellt.

Tabelle 2.2 **Grenzorbitalenergien, berechnet mittels KS-DFT-Kalkulationen.** Die Energien der Grenzorbitale der Dipole **6a** und **7a** sowie der Dipolarophile **23** und **24** sind angegeben.

	<i>E</i> (HOMO)/eV	<i>E</i> (LUMO)/eV
6a	-4,58	-2,18
7a	-5,06	-3,05
23	-7,95 (HOMO-15)	2,48 (LUMO+2)
24	-7,13 (HOMO-9)	-3,70

Für das Reaktandenpaar **6a/23** konnte eine Energiedifferenz ΔE von 5,77 eV zwischen $HOMO_{Dipolarophil}$ und $LUMO_{Dipol}$ bestimmt werden. Bei Betrachtung der Energien von $HOMO_{Dipol}$ und $LUMO_{Dipolarophil}$ konnte hingegen $\Delta E=2,1$ eV bestimmt werden. Da die Energiedifferenz dieser Grenzorbitale geringer ist, wird diese Wechselwirkung im Vergleich zu $HOMO_{Dipolarophil}/LUMO_{Dipol}$ begünstigt sein und diese Cycloaddition nach dem Typ I-Mechanismus ablaufen. Die entsprechende Auswertung für **23/7a** führte zu der gleichen Aussage, wobei die Energiedifferenz $HOMO_{Dipol}/LUMO_{Dipolarophil}$ mit $\Delta E=2,58$ eV etwas höher und damit ungünstiger als mit Nitril-Imin **6a** ist. Für das konjugierte System des Dipolarophils N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GTP- H^+ **24** wurde auf Basis der Hückel-Theorie erwartet, dass die LUMO-Energie geringer wäre, als die des korrespondierenden Alkens.^[263] Für eine Cycloaddition des Typs I sollte dies mit einer Verbesserung der Reaktivität korrelieren, da die Energien beteiligter Grenzorbitale angenähert würden. Dies wurde durch hier durchgeführten KS-DFT-Kalkulationen bestätigt. Für das System **24/6a** konnte eine Energiedifferenz von 0,88 eV, für **24/7a** von 1,36 eV bezogen auf $HOMO_{Dipol}/LUMO_{Dipolarophil}$ berechnet werden.

Diese Werte zeigen, dass die Energielücken zwischen $HOMO_{Dipol}$ und $LUMO_{Dipolarophil}$ für alle hier betrachteten Systeme relativ gering im Vergleich zu Literatur-beschriebenen Systemen ist, die bereits erfolgreich durchgeführt werden konnten. Durch Ponti und Molteni wurde beispielsweise der Umsatz eines Nitril-Imins mit Ethylacrylat beschrieben.^[266] Hierbei

konnte in 10 Minuten eine Ausbeute von 95 % erreicht werden. Die Energiedifferenz der entsprechenden Grenzorbitale (Methacrylat als Edukt) wurde mit mehr als 10 eV angegeben. Dennoch konnte eine solche Cycloaddition erfolgreich durchgeführt werden.

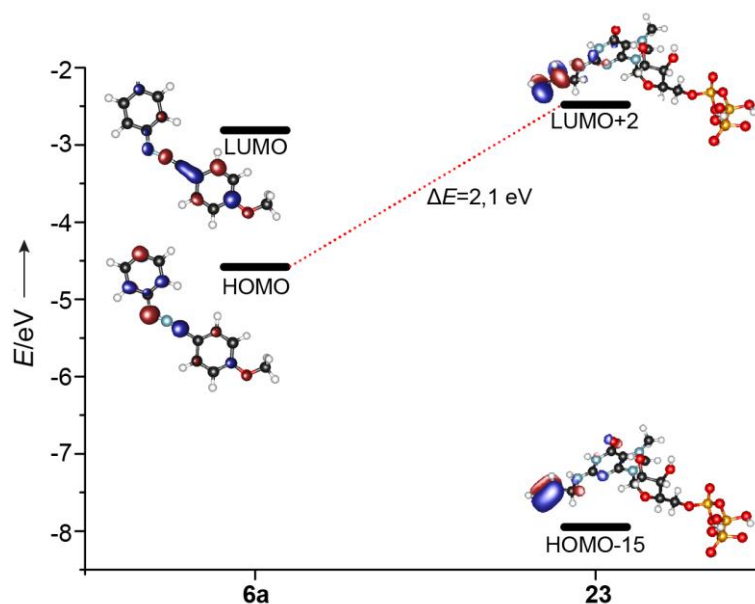


Abbildung 2.22 **Energien und Formen der Grenzorbitale von 6a und 23.** Die Grenzorbitalenergien des Dipols **6a** sowie des Dipolarophils **23** sind angegeben. Die Energielücke $\text{HOMO}_{\text{Dipol}}/\text{LUMO}_{\text{Dipolarophil}}$ (rote Linie) beträgt 2,1 eV. Die jeweiligen Molekülorbitale sind graphisch dargestellt, wobei anstelle der Orbitale von N^2 -Allyl- $m^7\text{GTP-H}^+$ **23** die Orbitale HOMO-2 und LUMO+3 von N^2 -Allyl- $m^7\text{GTP}$ dargestellt sind.

Die von Prof. Herrmann durchgeführten Kalkulationen deuteten darauf hin, dass eine Photoclick-Reaktion der Nitril-Imine **6a** und **7a** mit N^2 -modifizierten Kappen grundsätzlich möglich und eine Erhöhung der Reaktivität bei Verwendung von N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- $m^7\text{GTP-H}^+$ **24** als Dipolarophil zu erwarten wäre. Darüber hinaus konnten aus den Rechnungen weitere Vorhersagen hinsichtlich der Reaktivitäten der einzelnen Nitril-Imin/ N^2 -Allyl- $m^7\text{G}$ -Reaktandenpaare abgeleitet werden. Mit N^2 -Allyl- $m^7\text{GTP-H}^+$ **23** als Dipolarophil ist die Energielücke $\text{LUMO}_{\text{Dipolarophil}}/\text{HOMO}_{\text{Dipol}}$ kleiner, wenn Nitril-Imin **6a** anstelle von **7a** als Dipol eingesetzt wird. Da Energiegewinn und Geschwindigkeit einer Reaktion umso höher sind, je größer die Überlappungsintegrale zweier Orbitale und je ähnlicher ihre Energien sind,^[261–264] konnte auf Grundlage berechneter Grenzorbitalenergien nicht nur angenommen werden, dass eine Markierung der modifizierten Kappe mittels Photoclick-Reaktion grundsätzlich möglich sein sollte, sondern auch, dass die Reaktion **23/6a** thermodynamisch und kinetisch präferiert im Vergleich zu **23/7a** ablaufen sollte.

2.7.2 Photoclick-Reaktionen zur Markierung enzymatisch modifizierter Kappenstrukturen

Die KS-DFT-Kalkulationen hatten gezeigt, dass eine Fluoreszenzmarkierung der allylierten sowie auch der penteninylierten mRNA-Kappe mittels einer Photoclick-Reaktion möglich sein sollte (Kapitel 2.7.1). Eine chemo-enzymatische Strategie auf Basis dieser Click-Reaktion würde verschiedene Vorteile bieten. Zum einen muss die mRNA-Kappe zur Etablierung dieser Click-Reaktion enzymatisch nur mit einem Allylrests modifiziert werden. Mit der Variante GluTgs2-V34A konnte der quantitative Umsatz von 1 mM m^7 GpppA **9** zu N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** mit AdoPropen **1** als Cosubstrat erreicht werden (Kapitel 2.5.3). Diese enzymatische Modifizierung birgt somit großes Potential, auch *in vivo* mit diesem AdoMet-Analogon eine ausreichend effiziente Modifizierung zu erreichen und so eukaryotische mRNA der Photoclick-Reaktion zugänglich zu machen. Des Weiteren stellt der Allylrest auch die kürzeste, click-reaktive Alkylkette dar und ermöglicht somit die enzymatische Markierung der mRNA auf Basis einer minimalen Modifizierung des nativen Systems. Außerdem erfolgt die Reaktion von Alken und Tetrazol in einer Photoclick-Reaktion bioorthogonal, so dass diese bereits erfolgreich zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen *in vivo* eingesetzt werden konnte.^[154,176] Dabei zeichnet sich die Photoclick-Reaktion nicht nur durch Bioorthogonalität, sondern auch durch die Bildung fluoreszierender Produkte aus nicht fluoreszierenden Edukten aus, so dass bei Durchführung in lebenden Zellen kein Hintergrundsignal auftreten sollte. Diese genannten Faktoren prädestinieren die Photoclick-Reaktion für die Etablierung einer chemo-enzymatischen Markierung von mRNA in lebenden Zellen.

In einem ersten Schritt sollte in dieser Arbeit die Fluoreszenzmarkierung des Kappen-Analogons m^7 GpppA **9** *in vitro* mittels verschiedener Tetrazole etabliert und charakterisiert werden. Die durchgeführten Berechnungen der Grenzorbitalenergien potentieller Substrate hatten gezeigt, dass auf Basis der Energiedifferenzen $HOMO_{Dipol}/LUMO_{Dipolarophil}$ eine Reaktion der Tetrazole **6** und **7** sowohl mit der allylierten als auch der penteninylierten Kappe zu erwarten wäre. Um dies experimentell zu verifizieren, wurde Tetrazol **6** zur Fluoreszenzmarkierung von N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** in einer Photoclick-Reaktion eingesetzt, wobei zunächst eine Vielzahl verschiedener Bedingungen für die chemische Markierung getestet wurde. Das Dipolarophil N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** wurde hierfür enzymatisch generiert und anschließend die Photoclick-Reaktion in Gegenwart verschiedener Lösungsmittel, Additive, Tetrazolkonzentrationen sowie bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen und -zeiten durchgeführt. Die Bildung eines fluoreszierenden Produkts konnte in keiner der Reaktionen nachgewiesen werden, wie RP-HPLC-Analysen zeigten.

Eine Markierung der eukaryotischen mRNA-Kappe mittels einer Photoclick-Reaktion, konnte erst nach Änderung der Analysemethode sowie der Bestrahlungsart zur Aktivierung des Tetrazols erreicht werden. Hierzu wurden 1 mM m^7 GpppA **9** in Gegenwart von AdoPropen **1** und GlcTgs2-V34A zu N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** umgesetzt. Die Biokonversion wurde anschließend auf 68 °C erhitzt und dialysiert, um nicht umgesetztes AdoPropen **1** zu entfernen. Es wurde angenommen, dass dieses sonst unter Umständen ebenfalls in der folgenden Photoclick-Reaktion mit dem Nitril-Imin reagieren könnte. Nach diesen Schritten wurde die wässrige Lösung von N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** mit Acetonitril sowie Tetrazol **6** (617 μ M) versetzt und in einer schwarzen Mikrotiterplatte fünf Minuten bei 254 nm bestrahlt. Es zeigte sich, dass die Bestrahlung bei minimalem Abstand von Reaktion und Lichtquelle essentiell für die erfolgreiche Durchführung war und die Bildung des reaktiven Nitril-Imins bei Vergrößerung des Abstandes anscheinend ausblieb beziehungsweise minimiert wurde. Die in der Probe enthaltenen Komponenten wurden nach einer Inkubation von bis zu 20 Stunden bei 4 °C gelelektrophoretisch getrennt und hinsichtlich fluoreszierender Produkte analysiert. Hierzu wurde das Gel bei einer Wellenlänge von 365 nm beleuchtet und fotografiert. Für die Reaktion, welche in Anwesenheit der allylierten Kappe **14** durchgeführt wurde, konnte ein türkis-fluoreszierendes Produkt nachgewiesen werden (Abbildung 2.23). Eine parallel durchgeführte Analyse des Gels mittels UV-Shadowing zeigte, dass das detektierte fluoreszierende Produkt eine geringere elektrophoretische Mobilität und damit vermutlich ein höheres Molekulargewicht als die Kappe **9** bzw. die allylierte Kappe **14** aufwies. Dies stand im Einklang mit der Möglichkeit, dass die entsprechende Bande das erwartete Photoclick-Produkt (P^1 -Adenosin(5')- P^3 -[N^2 -ethyl-2-(4-(4-Methoxyphenyl)-2-phenylpyrazolin),7-methylguanosin-(5')]triphosphat; Synonym: N^2 -Methoxypyrazolinethyl- m^7 GpppA) **20** darstellte, da dieses ein höheres Molekulargewicht als das Kappen-Analogon N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** bei gleicher Ladung aufweist. Ein entsprechendes fluoreszierendes Signal konnte in keiner der Kontrollreaktionen nachgewiesen werden. Diese beinhalteten die Durchführung der Biokonversion ohne Enzym, ohne AdoPropen **1**, ohne m^7 GpppA **9** sowie in Gegenwart denaturierten Enzyms. In allen diesen Kontrollen konnte somit nachweislich keine allylierte Kappe, welche das Substrat für die Photoclick-Reaktion darstellen sollte, gebildet werden (Abbildung 2.23). Da nur in Gegenwart von N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** ein fluoreszierendes Produkt nach der Photoclick-Reaktion beobachtet werden konnte, wurde vermutet, dass eine Fluoreszenzmarkierung der allylierten Kappe mittels Tetrazol **6** erfolgreich und spezifisch durchgeführt werden konnte.

Dies wurde durch die massenspektrometrische Analyse der Photoclick-Reaktion mittels HPLC-ESI-TOF-MS verifiziert. Hierbei konnte in der Reaktion die Masse des erwarteten Photoclick-Produkts **20** nachgewiesen werden (ber. $[M]^+ = 1051,23 \text{ m/z}$; det. $[M]^+ = 1051,23 \text{ m/z}$, Abbildung 2.23).

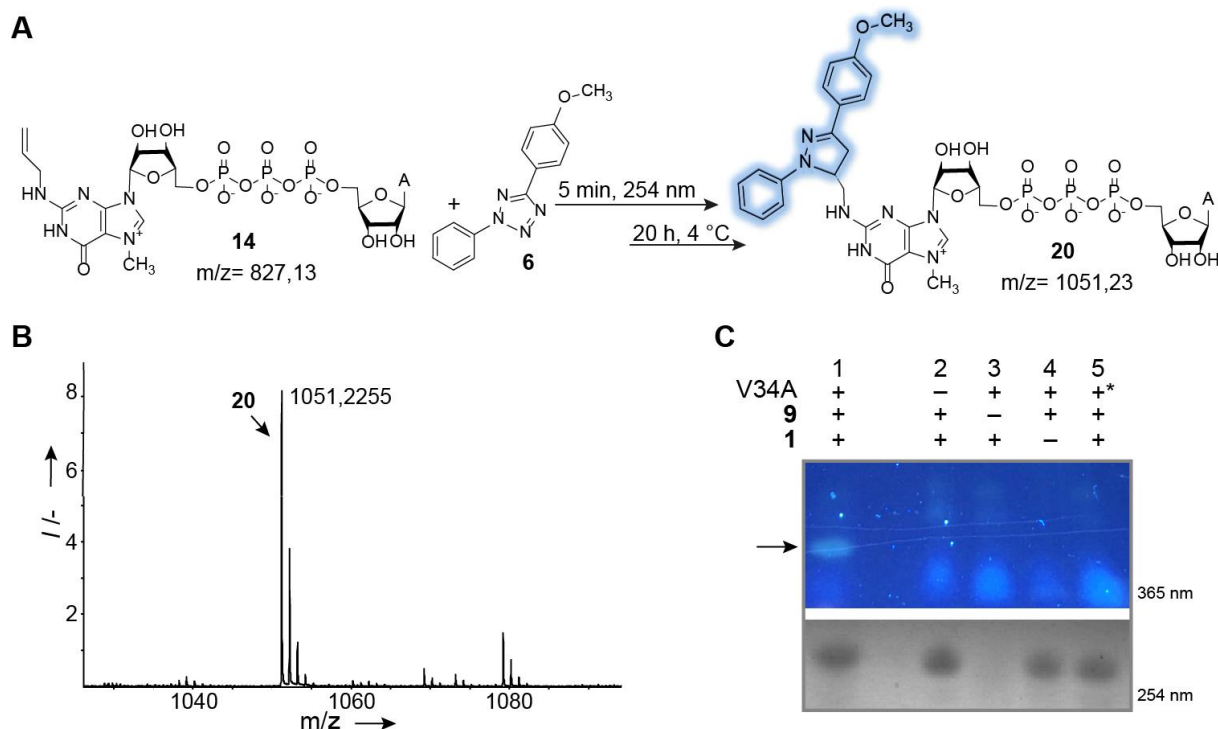


Abbildung 2.23 **Chemische Modifizierung des alkenylierten Kappen-Analogons N^2 -Allyl- m^7 GpppA mittels der Photoclick-Reaktion.** **A)** Reaktionsschema der Fluoreszenzmarkierung von **14** durch eine Photoclick-Reaktion mit **6**. **B)** HPLC-ESI-TOF-MS-Analyse der Photoclick-Reaktion. Die Masse des erwarteten Produkts N^2 -Methoxypyrazolin- m^7 GpppA **20** ($C_{38}H_{46}N_{12}O_{18}P_3^+$) konnte in der Reaktion nachgewiesen werden (ber. $[M]^+ = 1051,23 \text{ m/z}$; det. $[M]^+ = 1051,23 \text{ m/z}$). **C)** Detektion von **20** nach gelelektrophoretischer Trennung der Photoclick-Reaktion von **6** mit **14**. In der Reaktion, welche N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** enthielt (1, Biokonversion in Gegenwart von **9** und **1** mit V34A durchgeführt) konnte ein fluoreszierendes Produkt nach Gelelektrophorese (20 %iges denat. Gel) und Beleuchtung des Gels bei $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ detektiert werden (Pfeil, 365 nm, oben). Dieses trat in keiner der Kontrollen (2-4, (*)) denat. Enzym) auf und wurde **20** zugeordnet. Das Gel wurde mittels UV-Shadowing analysiert, wodurch bestätigt wurde, dass m^7 GpppA **9** bzw. N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** in gleichen Konzentrationen in allen Proben vorlagen (254 nm, unten).

In Abhängigkeit von der Tetrazol-Präparation konnte in einigen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente ein zweites, blau-fluoreszierendes Produkt bei der Analyse der Gele hinsichtlich fluoreszierender Produkte detektiert werden. Dieses war sowohl in der jeweiligen Reaktion, als auch in den Kontrollen nachweisbar und stellte somit kein Photoclick-Produkt dar (Abbildung 2.23, Abbildung 2.25). Weitere Kontrollexperimente zeigten, dass dieses auf eine Reaktion des Tetrazols zurückzuführen war, da eine entsprechende Bande auch beobachtet wurde, wenn Tetrazol in PBS und Acetonitril in Abwesenheit weiterer Komponenten photoaktiviert wurde.

Teilweise waren weitere, sehr schwach fluoreszierende Produkte zu sehen, die ein höheres Molekulargewicht als das Nebenprodukt des Tetrazols aufwiesen (Abbildung 2.23, Abbildung 2.25). Hier zeigten die Kontrollen, dass diese aus einer nicht weiter charakterisierten Reaktion mit dem Cosubstrat AdoPropen **1** beziehungsweise einem Degradationsprodukt hiervon resultierten. Die genaue Identität dieser Produkte wurde nicht abschließend geklärt.

Um die Photoclick-Reaktion des Tetrazols **6** mit N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** auch im Hinblick auf potentielle Anwendungen in Zellen weiter zu charakterisieren, wurde eine erste kinetische Analyse angefertigt. Hierzu wurde die Reaktion wie oben beschrieben durchgeführt und bereits nach einer Inkubation von 5, 30, 120 und 240 Minuten hinsichtlich der Bildung fluoreszierender Produkte analysiert. Hierbei zeigte sich, dass bereits nach fünf Minuten das Photoclick-Produkt **20** nachgewiesen und keine weitere Umsetzung auf Basis der detektierten Fluoreszenzintensität zu späteren Zeitpunkten beobachtet werden konnte (Abbildung 2.24). Die Photoclick-Reaktion wäre aufgrund ihrer Kinetik für die Visualisierung von mRNA in lebenden Zellen somit durchaus geeignet, da das fluoreszierende Pyrazolin bereits fünf Minuten nach der Photoaktivierung des Tetrazols gebildet wird. Hierdurch wäre es unter Umständen möglich, die Fluoreszenzmarkierung von mRNA *in vivo* zeitlich zu steuern. Außerdem wird durch die hohe Reaktionsgeschwindigkeit vermieden, dass Reagenz aus den Zellen diffundiert, bevor es umgesetzt werden kann. Eine weitere Analyse der hier durchgeführten Click-Reaktion hinsichtlich ihrer Zellkompatibilität beinhaltete die Charakterisierung der Zellvitalität von PC3-Zellen nach einer fünf minütigen Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda=254$ nm), die von Frau Stephanie Besztejan durchgeführt wurde. Durch die UV-Bestrahlung wurde die Morphologie der Zellen zwar verändert, ihre Vitalität blieb aber erhalten.

Neben der Bildung eines fluoreszierenden Produkts unter Verwendung von N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** als Edukt und der hohen Reaktionsgeschwindigkeit ist somit auch die Dauer der Bestrahlung zur Aktivierung des Tetrazols potentiell kompatibel mit Anwendungen in lebenden Zellen. Andere Faktoren der Reaktion müssten hingegen optimiert werden, um diese chemo-enzymatische Strategie *in vivo* zur Markierung von mRNA einsetzen zu können. Beispielsweise zeigte die Bildung unspezifischer, fluoreszierender Produkte bei Durchführung der Reaktion *in vitro*, dass in Zellen durchaus ein Hintergrundsignal auftreten könnte, was den Nachweis von mRNA stören würde. Ein weiterer Punkt der kritisch betrachtet werden müsste, ist die Ausbeute der Photoclick-Reaktion.

Diese konnte zwar nicht exakt bestimmt werden, da in der HPLC-Analyse das Produkt nicht beobachtet wurde, aber es konnte eine grobe Einschätzung auf Basis der Charakterisierung

der Reaktionen nach gelelektrophoretischer Trennung getroffen werden. Es wurde gezeigt, dass mittels UV-Shadowing das Nukleotid m⁷GpppA **9** bzw. N²-Allyl-m⁷GpppA **14** bis zu einer Konzentration von 200 µM (bezogen auf die initiale Konzentration in der Biokonversion) detektierbar war. Für das Photoclick-Produkt **20** konnte im UV-Shadowing kein Nukleotidsignal nachgewiesen werden, was die Schlussfolgerung zulässt, dass dieses in einer Konzentration von weniger als 200 µM vorlag. Die Ausbeute der Photoclick-Reaktion zur Markierung von **14** liegt damit bei höchstens 20 %. Ein weiterer Parameter dieser Reaktion, der verbessert werden müsste, ist die Quantenausbeute des erhaltenen Produkts, da eine Detektion des Photoclick-Produkts **20** nur durch Aufnahme fluoreszierender Signale über einen Zeitraum von mindestens 30 Sekunden möglich war.

Für die Anwendung in lebenden Zellen und die Charakterisierung dynamischer Prozesse müsste somit ein Pyrazolin mit besserer Quantenausbeute entwickelt werden.

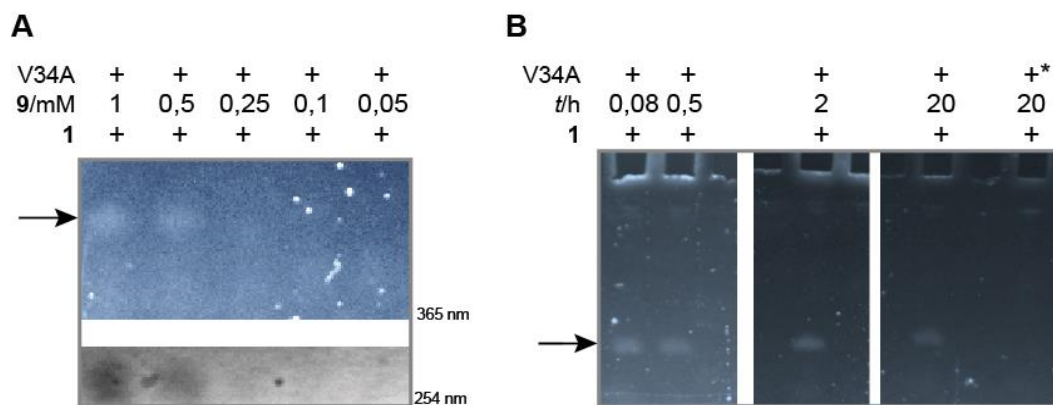


Abbildung 2.24 Charakterisierung der Photoclick-Reaktion hinsichtlich Nachweisgrenze und Kinetik. **A)** Bestimmung der Nachweisgrenze der Photoclick-Reaktion von **6** mit **14**. Die angegebenen Konzentrationen m⁷GpppA **9** wurden in den Biokonversionen mit AdoPropen **1** eingesetzt. Nach der Photoclick-Reaktion erfolgte die gelelektrophoretische Trennung (20 %iges denat. Gel) der Proben und fluoreszierende Produkte wurden durch Beleuchtung mit UV-Licht (λ_{ex} =365 nm) detektiert (Belichtungszeit 60 sec). Das Produkt der Photoclick-Reaktion **20** konnte bis zu einer initialen Konzentration von 250 µM **9** nachgewiesen werden. Das Gel wurde außerdem mittels UV-Shadowing analysiert (unten, 254 nm). **B)** Kinetische Analyse der Photoclick-Reaktion von **6** mit **14**. Nach Aktivierung des Tetrazols wurden die Reaktionen bei 4 °C inkubiert, zu den angegebenen Zeitpunkten gelelektrophoretisch getrennt (20 %iges denat Gel) und **20** durch Beleuchtung (λ_{ex} =365 nm, Belichtungszeit 60 sec) detektiert. Nach 5 min Inkubation war **20** nachweisbar (Pfeil). Dieses trat in der Kontrolle (Biokonversion in Gegenwart denaturierten Enzyms (*)) durchgeführt) nicht auf. Abbildungen A) und B) wurden nachträglich gefärbt.

Grundsätzlich kann aber die Aussage getroffen werden, dass die hier beschriebene chemoenzymatische Modifizierung der Kappe durch Allylierung und folgende Photoclick-Reaktion durchaus einen vielversprechenden Ausgangspunkt für die Etablierung einer Methode zur Visualisierung eukaryotischer mRNA darstellt.

Um für folgende notwendige Optimierungen der Reaktion den Nutzen zuvor durchgeführter DFT-Kalkulationen einschätzen zu können, wurden neben der beschriebenen Photoclick-Reaktion **6a/14** auch die Cycloadditionen Nitril-Imin **7a**/ N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** sowie Nitril-Imin **6a**/ N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA **15** durchgeführt. Die KS-DFT-Kalkulationen hatten für die Reaktion des Nitril-Imins **7a** mit dem allylierten Kappen-Analogon **23** eine höhere Energiedifferenz der Grenzorbitale verglichen mit der Verwendung von **6a** als Dipol hervorgesagt. Es wurde daher eine geringere Reaktivität für die Cycloaddition von **7** mit N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** erwartet, als für **6/14**.

Für die Cycloaddition von **6** mit N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA **15** wurde eine höhere Reaktivität erwartet, als in einer entsprechenden Reaktion mit **14** als Dipolarophil. Die KS-DFT-Kalkulationen hatten eine geringere Energiedifferenz der Grenzorbitale von **6a** und dem penteninylierten Kappen-Analogon **24** ergeben, als für **6a** und dem allylierten Kappen-Analogon **23**. Wenn die experimentell und theoretisch ermittelten Aussagen übereinstimmten, könnten entsprechende KS-DFT-Kalkulationen in weiterführenden Arbeiten unter Umständen genutzt werden, um die Reaktivitäten neuer Systeme in erster Näherung einzuschätzen. Hierdurch könnte die Synthese einer Vielzahl verschiedener Tetrazole und experimenteller Versuchsreihen vermieden werden.

Zunächst wurde die Photoclick-Reaktion des penteninylierten Kappen-Analogons **15** mit **6** charakterisiert und mit der Cycloaddition des allylierten Kappen-Analogons **14** mit **6** verglichen. Die Biokonversion von m^7 GpppA **9** mit AdoEnYn **4** wurde dafür mit GlcTgs2-V34A sowie als Kontrolle in Gegenwart des denaturierten Enzyms durchgeführt. Hierdurch wurde gewährleistet, dass in beiden Ansätzen gleiche Komponenten vorlagen, aber in der Kontrolle die Bildung des Photoclick-Edukts N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA **15** ausblieb. Nach erfolgter Initiation der Photoclick-Reaktion durch Beleuchtung mit einer Wellenlänge von 254 nm wurden Reaktion und Kontrolle für 20 Stunden bei 4 °C inkubiert und nach gelelektrophoretischer Trennung der enthaltenen Bestandteile hinsichtlich der Bildung eines fluoreszierenden Cycloaddukts charakterisiert. Bei der Beleuchtung des Gels mit einer Wellenlänge von 365 nm konnte in der Reaktion eine fluoreszierende Bande detektiert werden, die in der Kontrolle nicht auftrat und so dem entsprechenden Photoclick-Produkt (P^1 -Adenosin(5')- P^3 -[N^2 -but-2-en-4-(4-(4-Methoxyphenyl)-2-phenylpyrazolin)yl,7-methylguanidin(5')]triphosphat; Synonym: N^2 -Methoxypyrazolinbutenyl- m^7 GpppA) **22** zugeordnet wurde (Abbildung 2.25). Die Fluoreszenzintensität des Pyrazolins **22** unterschied sich subjektiv nicht von der des Photoclick-Produkts **20**, obwohl für das System **15/6** aufgrund der KS-DFT-Kalkulationen eine verbesserte Reaktivität und damit höhere Ausbeute als für **14/6**

erwartet worden war. Diesbezüglich muss allerdings beachtet werden, dass in der Biokonversion von m^7 GpppA **9** zu N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA **15** nur 25 % der Ausbeute an modifiziertem Kappen-Analogon erreicht werden können, wie bei der Umsetzung mit AdoPropen **1** zu N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14**. N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA **15** liegt daher in sehr viel geringerer Konzentration als N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** in der entsprechenden Photoclick-Reaktion vor. Dennoch konnte ein ähnlich signifikantes Fluoreszenzsignal wie bei der Verwendung von N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** als Edukt erhalten werden. Wenn man annimmt, dass beide Photoclick-Produkte (**20** und **22**) die gleiche Quantenausbeute aufweisen, spricht eine ähnliche Fluoreszenzintensität dafür, dass in Gegenwart des Dipolarophils N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA **15** die gleiche Menge Produkt gebildet wurde wie in Gegenwart von N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14**, obwohl **15** in geringerer Konzentration für die Cycloaddition mit **6** vorlag als **14**. Dies würde die Vorhersage der KS-DFT-Rechnungen bestätigen. Um hier allerdings eine abschließende Aussage zu erhalten, müsste eine Möglichkeit entwickelt werden, die Ausbeuten beider Reaktionen genau bestimmen und direkt vergleichen zu können.

Als weiteres Testsystem zur Verifizierung der Vorhersagemöglichkeit verschiedener Tetrazol-Reaktivitäten mittels KS-DFT-Kalkulationen, wurde die Umsetzung des Tetrazols **7** mit N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** experimentell charakterisiert. Gemäß der *in silico*-Daten wurde hier eine geringere Reaktivität verglichen mit Tetrazol **6** erwartet, da aufgrund der größeren Energiedifferenz der Grenzorbitale die Reaktion thermodynamisch und kinetisch weniger bevorzugt ablaufen sollte. In der Tat konnte gezeigt werden, dass die Konzentration des Tetrazols **7** verdoppelt werden musste, um bei gleicher Dipolarophilkonzentration das entsprechende Photoclick-Produkt (P^1 -Adenosin(5')- P^3 -[N^2 -ethyl-2-(4-(4-Methylbenzoat)-2-phenylpyrazolin),7-methylguanosin(5')]triphosphat; Synonym: N^2 -Benzoatpyrazolinethyl- m^7 GpppA) **21** zu erhalten (Abbildung 2.25). Dies bestätigte die Vorhersagen, die aus den DFT-Kalkulationen abgeleitet werden konnten, in erster Näherung.

Auch konnten erste Hinweise erhalten werden, dass die Reaktion von Tetrazol **7** mit N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** langsamer ablief als die entsprechende Markierung mit Tetrazol **6**, da das Photoclick-Produkt **21** erst zwei Stunden nach Initiation der Photoclick-Reaktion nachgewiesen werden konnte. Allerdings war eine Detektion des Photoclick-Produkts **21** generell schwierig, so dass diese Daten verifiziert werden mussten. Dennoch spricht schon die Notwendigkeit die Eduktkonzentrationen zu erhöhen dafür, dass die Vorhersage der Reaktivität aus den DFT-Kalkulationen zutreffend war.

Interessant war darüber hinaus, dass sich Photoclick-Produkte der einzelnen Tetrazole mit N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** subjektiv in der Farbe ihrer Fluoreszenz unterschieden (Abbildung 2.23, Abbildung 2.25). Die Photoclick-Reaktionen könnten somit unter Umständen auch eingesetzt werden, um *in vivo* bei einer beliebigen Wellenlänge emittierende Fluorophore zu erzeugen.

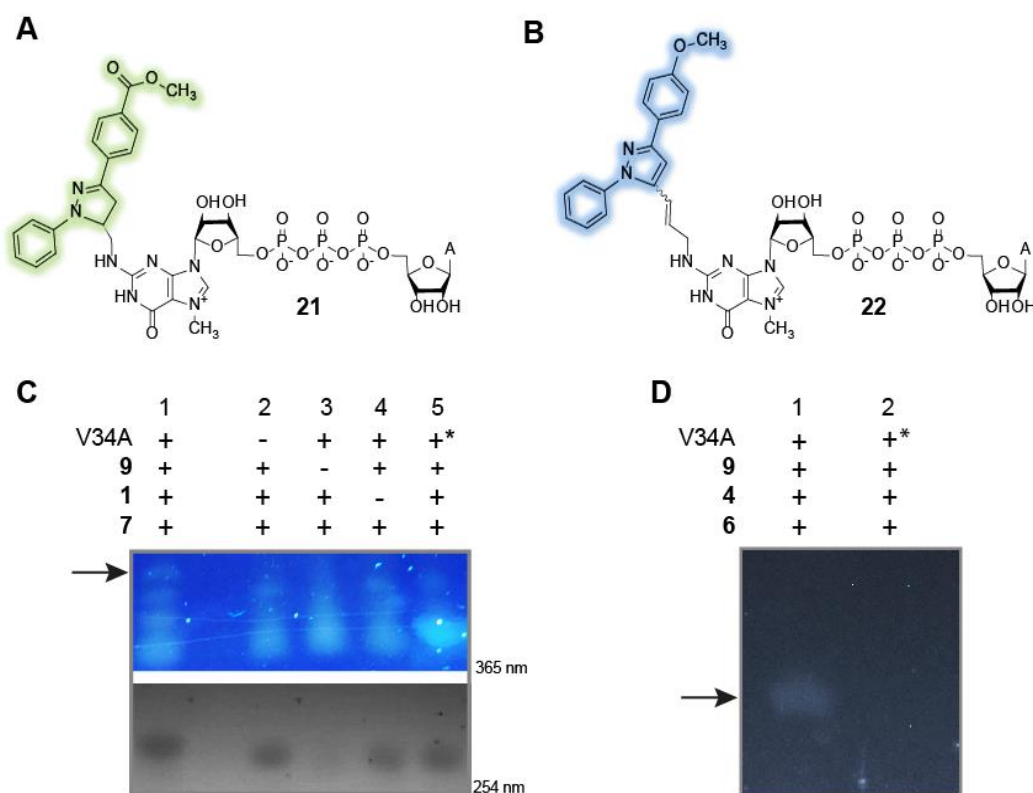


Abbildung 2.25 **Experimentelle Charakterisierungen der Reaktivitäten verschiedener Photoclick-Systeme und Strukturformeln der Photoclick-Produkte.** A) Photoclick-Produkt **21**, aus der Reaktion von **7** mit **14**. B) Photoclick-Produkt **22**, aus der Reaktion von **6** mit **15**. C) Detektion von **21** nach gelelektrophoretischer Trennung der Photoclick-Reaktion von **7** mit **14**. In der Reaktion, welche **14** (1, Biokonversion in Gegenwart von **9** und **1** mit V34A durchgeführt) enthielt, konnte ein fluoreszierendes Produkt nach Gelelektrophorese (20 % denat. Gel) und Beleuchtung des Gels ($\lambda_{\text{ex}}=365$ nm) detektiert werden. Dieses trat in keiner der Kontrollen (2-5, (*) denat. Enzym) auf und wurde **21** zugeordnet. Das Gel wurde mittels UV-Shadowing analysiert (254 nm, unten). D) Detektion von **22** nach gelelektrophoretischer Trennung der Photoclick-Reaktion von **6** mit **15**. In der Reaktion, welche **15** (1, Biokonversion in Gegenwart von **9** und **4** mit V34A durchgeführt) enthielt, konnte ein Fluoreszenzsignal nach Gelelektrophorese (20 %iges denat. Gel) und Beleuchtung bei $\lambda_{\text{ex}}=365$ nm nachgewiesen werden, das in der Kontrollen (2, (*) denat. Enzym) nicht auftrat und **22** zugeordnet wurde. Dieses Bild wurde nachträglich gefärbt.

Die durchgeführten Cycloadditionen von **14/7** sowie **15/6** zeigten, dass durch die KS-DFT-Kalkulationen für zwei Systeme erste Trends der Reaktivitäten vorhergesagt werden konnten. Für die weitere Optimierung der Photoclick-Reaktion, vor allem hinsichtlich der Anwendungen in lebenden Zellen, könnte diese *in silico*-basierte Methode daher eine sinnvolle Ergänzung zu experimentellen Untersuchungen verschiedener Tetrazole darstellen.

Dabei wäre es für die Erweiterung des hier beschriebenen Ansatz zur chemo-enzymatischen Markierung eukaryotischer mRNA auf Basis der Photoclick-Reaktion für *in vivo*-Applikationen besonders vorteilhaft, wenn neben der Vorhersage verschiedener Reaktivitäten eine *in silico*-Methode auch zur Vorhersage der Quantenausbeute verschiedener Photoclick-Produkte genutzt werden könnte. Neben einer quantitativen chemo-enzymatischen Markierung der Ziel-mRNA stellen die Fluoreszenzintensität des gebildeten Pyrazolins und die Bioorthogonalität der Photoclick-Reaktion potentiell kritische Parameter für die Etablierung des Systems in lebenden Zellen dar. Die gebildeten Pyrazoline **20-22** konnten nur durch ausreichend lange Belichtungszeiten (60 sec) nachgewiesen werden, was auf eine geringe Quantenausbeute dieser Fluorophore hindeutet. Dieser Parameter, wie auch die Ausbeute der Cycloaddition, müssten daher weiter verbessert werden.

Auch die Bioorthogonalität des Systems müsste in weiterführenden Arbeiten gezeigt werden. In der Literatur wird die Photoclick-Reaktion zwar als bioorthogonal beschrieben, aber dies konnte in dieser Arbeit nur mit Einschränkungen bestätigt werden. Die Allylierung und anschließende Photoclick-Reaktion wurde dazu in Gegenwart von eukaryotischem Zelllysats durchgeführt. Hierfür wurden $6,6 \times 10^7$ Zellen in 40 μ L PBS sonifiziert und das erhaltene Lysat anstelle des Puffers in der Biokonversion eingesetzt. Nach der Photoclick-Reaktion konnte die Bildung eines spezifischen fluoreszierenden Produkts in der Reaktion beobachtet werden, allerdings nur, wenn weniger als 1×10^8 Zellen sonifiziert und die Biokonversion vor der Zugabe von Tetrazol dialysiert wurde (Daten im Anhang, Kapitel 8.5). Ansonsten konnte, obwohl die Reaktion als bioorthogonal gilt, die Bildung eines unspezifischen fluoreszierenden Produktes beobachtet werden, welches den Nachweis des Ziel-Produkts **20** unmöglich machte (Daten im Anhang, Kapitel 8.5).

Die Bildung unspezifisch fluoreszierender Produkte müsste für *in vivo*-Applikationen vermieden oder die Quantenausbeute der Zielverbindung deutlich verbessert werden. Dennoch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *in vitro* eine spezifische Markierung der eukaryotischen Kappenstruktur durch Allylierung bzw. Penteninylierung und anschließende Umsetzung mit verschiedenen reaktiven Nitril-Iminen grundsätzlich möglich ist.

2.7.3 Versuche zur Markierung zellulärer mRNA mittels Photoclick-Reaktion

Trotz der genannten Einschränkungen der Photoclick-Reaktion, die potentiell auch bei Visualisierung zellulärer mRNAs auftreten würden (Kapitel 2.7.2), sollte die Möglichkeit zum Nachweis von mRNA in Zellen durch enzymatische Allylierung und photoinduzierte

Cycloaddition mit Tetrazol **6** untersucht werden. Hierzu wurden PC3-Zellen mit Formaldehyd/Triton-X beziehungsweise Baculovirus-infizierte Sf9-Zellen mit eiskaltem Methanol fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen in Gegenwart des Enzyms GluTgs2-V34A sowie des Cosubstrats AdoPropen **1** inkubiert, um eine Allylierung der mRNA-Kappen zu erreichen. Es wurden verschiedene Methoden bezüglich des Waschens der Zellen getestet. Hierzu wurde PBS mit verschiedenen Lösungsmitteln (DMSO, Aceton) oder Additiven (SDS) versetzt. Anschließend erfolgte die Photoaktivierung des Tetrazols **6** in einer schwarzen Mikrotiterplatte bevor es mit den Zellen bei 4 °C inkubiert wurde. Danach wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen angefertigt. Es wurde eine stärkere Fluoreszenz in der Reaktion als in der Kontrolle (Biokonversion in Gegenwart des denaturierten Enzyms durchgeführt) nachgewiesen. Es zeigte sich aber, dass in der Reaktion mehr Enzym präzipitierte und sich hierdurch anscheinend fluoreszierende Nebenprodukte schlechter durch Waschen entfernen ließen als in der Kontrolle. Es wurde somit keine spezifische, höhere Fluoreszenzintensität beobachtet.

Auch bei Verwendung von Sf9-Zellen, welche aufgrund der Virusinfektion eine höhere mRNA-Konzentration aufweisen sollten, konnte durch die chemo-enzymatische Strategie keine Fluoreszenzmarkierung von mRNA erreicht werden. Es wurde hier sowohl eine Fluoreszenz der Zellen in der Reaktion als auch der Kontrolle beobachtet. Es konnte lediglich nachgewiesen werden, dass dieses Signal auf die durchgeführte Photoclick-Reaktion und nicht auf eine Autofluoreszenz der Zellen zurückzuführen war. Dieses unspezifische Signal könnte auf die Bildung des fluoreszierenden Tetrazolnebenprodukts zurückzuführen sein, welches auch bei gelelektrophoretischer Analyse der *in vitro*-Reaktionen nachgewiesen wurde.

Für weitere Versuche ist es somit essentiell, die Quantenausbeute des Photoclick-Produkts zu verbessern sowie die entstehenden fluoreszierenden Nebenprodukte genauer zu charakterisieren. Wenn man diese kennt, könnte gegebenenfalls eine Strategie entwickelt werden, um ihre Bildung zu vermeiden. Abgesehen von einer Optimierung der chemischen Modifizierung wird auch eine Verbesserung der Substrataffinität der Enzym-Variante unerlässlich sein, um die Methode für eine *in vivo*-Anwendung zu adaptieren.

2.8 CuAAC zur Markierung der penteninylierten mRNA-Kappe

Die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) stellt das Paradebeispiel einer Click-Reaktion dar. Diese Variante der Huisgen-Cycloaddition zeichnet sich dadurch aus, dass sie in wässrigem Milieu innerhalb von Minuten spezifisch und in nahezu quantitativer

Ausbeute^[188,210] zur Bildung eines Triazols aus Alkin und Azid führt. Darüber hinaus wurde die Kompatibilität dieser Reaktion mit verschiedenen Biomolekülen, wie DNA,^[204] RNA^[155] und Glykanen^[194,267] gezeigt, wobei die Cu(I)-Ionen hierfür durch Liganden stabilisiert wurden. Trotz aller dieser Vorteile konnte die CuAAC bisher nicht für Anwendungen in lebenden Zellen eingesetzt und somit, anders als beispielsweise die Photoclick-Reaktion, nicht zu den bioorthogonalen Reaktionen gezählt werden. Der Grund liegt unter anderem in der Toxizität der verwendeten Cu(I)-Komplexe, die zur Bildung reaktiver Sauerstoff-haltiger Moleküle in Zellen führen.^[194] Allerdings wurde eine erfolgreiche Markierung Azid-modifizierter Glykane auf Zelloberflächen mittels CuAAC gezeigt.^[194,267] Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die Toxizität des Katalysators auch von dem verwendeten Liganden abhängt.^[194] Es ist also denkbar, dass auch die CuAAC in naher Zukunft zur Modifizierung zellulärer Komponenten *in vivo* adaptiert werden kann. Aber auch ohne diese Anwendungsmöglichkeit stellt die CuAAC aufgrund ihrer Effizienz, die es ermöglicht quantitativen Umsatz zu erreichen,^[188] eine interessante Möglichkeit zur Markierung von mRNA *in vitro* dar.

Eine chemo-enzymatische Strategie, die den enzymatischen Transfer einer Alkynylgruppe und die Markierung mittels CuAAC umfasst, könnte beispielsweise genutzt werden, um eukaryotische mRNA aus Total-RNA zu isolieren.

2.8.1 CuAAC zur Markierung von N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA

Für die Etablierung einer chemo-enzymatischen Strategie zur Markierung eukaryotischer mRNA wurden entsprechende Protokolle zunächst unter Verwendung des Kappen-Analogons m^7 GpppA **9** als Substrat etabliert. Dieses wurde in einer Konzentration von 1 mM für die Biokonversion mit AdoEnYn **4** durch GlTgs2-V34A eingesetzt. Entsprechend der Vorgehensweise bei der Photoclick-Reaktion (Kapitel 2.7.2) wurde die Reaktion nach dem enzymatischen Transfer erhitzt und dialysiert, um das Cosubstrat aus der Reaktion zu entfernen. Die Markierung von N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GppA **15** wurde unter Verwendung von CuBr (4 mM) und TBTA (100 mM) durchgeführt. Als Reportermolekül wurde der Azid-markierte Fluorophor EterneonTM480/635 **18** eingesetzt. Die Komponenten der Reaktion wurden nach einer Inkubation bei 37 °C gelelektrophoretisch getrennt und fluoreszierende Produkte detektiert. Hierfür wurde das Gel in einem *Imager VersaDocTM MP 4000* mittels grüner LEDs beleuchtet und emittiertes Licht mit Wellenlängen von mehr als 605 nm beziehungsweise 695 nm detektiert. Es wurde ein deutliches fluoreszierendes Signal in allen Taschen des Gels beobachtet. Dieses war auf den Farbstoff **18** zurückzuführen, da dieser

keine Ladung und somit auch keine elektrophoretische Mobilität aufweist. Darüber hinaus konnte in Anwesenheit der enzymatisch modifizierten Kappenstruktur N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA **15** ein weiteres fluoreszierendes Signal nachgewiesen werden. Dieses konnte in keiner der Negativkontrollen (AdoMet **12** als Cofaktor in der Biokonversion oder Biokonversion ohne Enzym sowie jeweils CuAAC in Abwesenheit von Cu(I)) detektiert werden und wurde dem Cu-Click-Produkt (P^1 -Adenosin(5')- P^3 -[N^2 -but-2-en-4-(4-Eterneontriazol)yl,7-methylguanidin(5')] triphosphat; Synonym: N^2 -Eterneonbutenyl- m^7 GpppA) **17** zugeordnet (Abbildung 2.26). Die erfolgreiche Markierung der penteninylierten Kappe mittels CuAAC konnte darüber hinaus massenspektrometrisch bestätigt werden. Das fluoreszierende Produkt wurde dazu mit Acetonitril aus dem Gel eluiert und das Eluat mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Hierbei konnte die Masse des erwarteten Produkts N^2 -Eterneonbutenyl- m^7 GpppA **17** detektiert werden (Abbildung 2.26; $C_{26}H_{34}N_{10}O_{17}P_3^+$ (851,2 g/mol)+626,1 g/mol; ber. $[M]^+=1477,3$ m/z; det. $[M]^+=1477,3$ m/z).

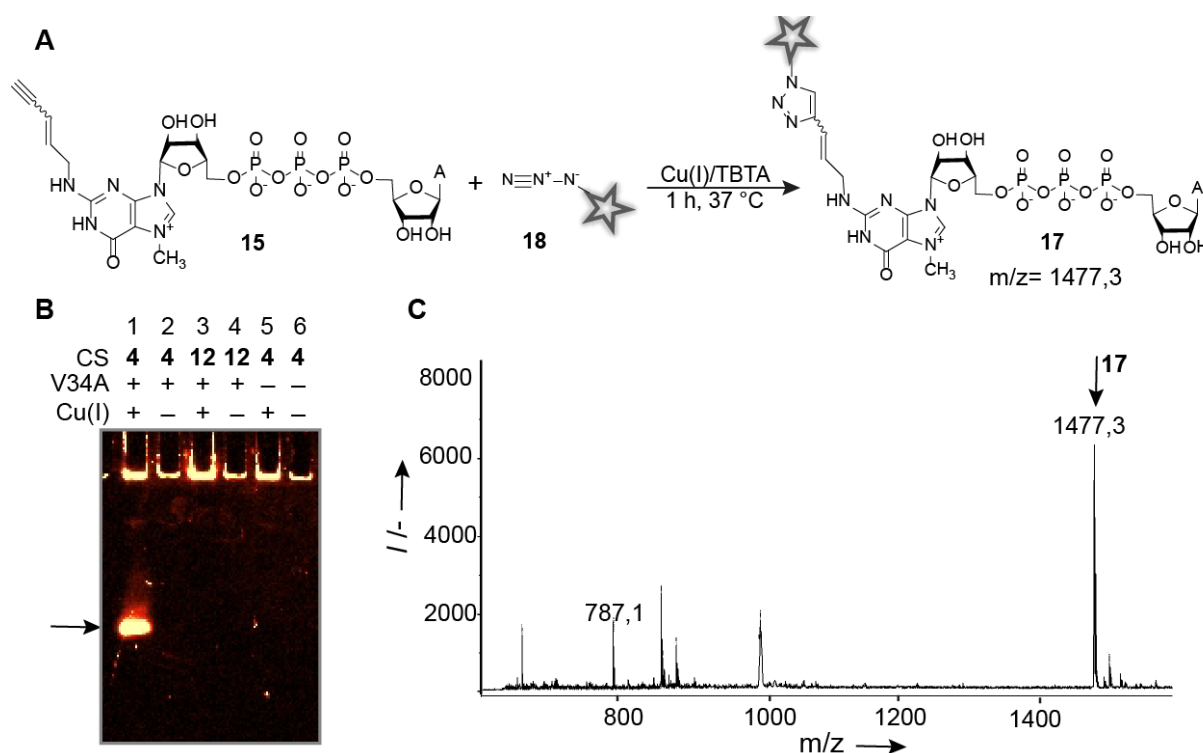


Abbildung 2.26 **Chemische Modifizierung des alkylierten Kappen-Analogons N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA mittels CuAAC.** A) Reaktionsschema zur Markierung der penteninylierten Kappe **15** mit Eterneon-Azid (Stern- N_3) **18** in einer CuAAC. B) Analyse der CuAAC nach gelelektrophoretischer Trennung durch Detektion von Eterneon-Fluoreszenz. In der Reaktion, welche N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA **15** und Cu(I) enthielt (1, Biokonversion in Gegenwart von m^7 GpppA **9** und AdoEnYn **4** mit V34A durchgeführt), konnte ein fluoreszierendes Produkt nach gelelektrophoretischer Trennung (20 %iges denat. Gel) durch Beleuchtung mit grünen LEDs nachgewiesen werden. Dieses trat in keiner der Kontrollen auf (2-6, Biokonversionen mit AdoMet **12** als Cosubstrat, ohne Enzym bzw. CuAAC ohne Cu(I) durchgeführt) und wurde **17** zugeordnet. C) MALDI-TOF-MS-Analyse des Cu-Click-Produkts. Die Masse des erwarteten Produkts N^2 -Eterneonbutenyl- m^7 GpppA **17** konnte nachgewiesen werden (ber. $[M]^+=1477,3$ m/z; det. $[M]^+=1477,3$ m/z).

Eine spezifische Modifizierung der enzymatisch modifizierten Kappe N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA **15** konnte mittels CuAAC unter Verwendung von CuBr und TBTA reproduzierbar durchgeführt werden. Neben einer Anwendung zur Isolierung von mRNA könnte eine solche Methode auch genutzt werden, um mRNAs in fixierten Zellen zu detektieren. Desweiteren deuten die Ergebnisse von Kennedy *et al.*^[194] darauf hin, dass es unter Umständen sogar möglich wäre, durch Wahl geeigneter Cu(I)-stabilisierender Liganden eine bioorthogonale CuAAC zu etablieren. Der beschriebene chemo-enzymatische Ansatz könnte dann unter Umständen auch für den mRNA-Nachweis in lebenden Zellen adaptiert werden.

Neben der Kompatibilität mit lebenden Zellen ist die spezifische Reaktion der Edukte miteinander auch in Gegenwart anderer reaktiver Gruppen ein weiteres Kriterium, welches eine bioorthogonale Click-Reaktion erfüllen muss. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die chemo-enzymatische Markierung daher in Lysaten durchgeführt, um eine spezifische Markierung der mRNA Kappe auch in Anwesenheit zellulärer Komponenten zu überprüfen. Sowohl in pro- als auch in eukaryotischem Lysat konnte die spezifische Fluoreszenzmarkierung des enzymatisch modifizierten Kappen-Analogons **15** nachgewiesen werden (Abbildung 2.27).

Dies zeigt, dass die chemo-enzymatische Modifizierung in Gegenwart zellulärer Komponenten durchgeführt werden kann und eine spezifische Markierung der eukaryotischen mRNA-Kappe ermöglicht. Die CuAAC erfüllt in diesem Punkt die Anforderungen einer bioorthogonalen Click-Reaktion. In einem nächsten Schritt müsste dann eine Optimierung der Cu(I)-Komplexe hinsichtlich ihrer Toxizität erreicht werden, um die Methode potentiell auch *in vivo* anwenden zu können.

Die Durchführung der Biokonversion in Lysat schließt allerdings nicht aus, dass *in vivo* die enzymatische Modifizierung der Kappe beispielsweise durch eine Konkurrenzreaktion mit AdoMet **12** oder durch Kappen-bindende Proteine inhibiert würde. In den Lysaten wurden AdoMet-Konzentrationen von etwa 60 μ M (berechnet aus den Annahmen, dass 400 μ M AdoMet **12** in einer *E. coli*-Zellen^[268], die ein Zellvolumen von 0,7 fL aufweist,^[269] vorliegen und 4×10^9 Zellen in 20 μ L PBS lysiert wurden). bzw. 19 μ M (berechnet aus den Annahmen, dass 60 μ M^[270] AdoMet **12** in einer mammalischen Zelle, die ein Zellvolumen von 20 pL aufweist,^[271] vorliegen und 8×10^8 Zellen in 50 μ L PBS lysiert wurden) erreicht. Das natürliche Cosubstrat AdoMet **12** lag daher in deutlich geringeren Konzentrationen als das Kappen-Analogon m^7 GpppA **9** sowie AdoEnYn **4** in den Biokonversionen vor. Aufgrund der besseren katalytischen Produktivität der Variante gegenüber dem nativen Cosubstrat **12** im Vergleich zum AdoMet-Analogon muss vermutet werden, dass bei äquimolaren

Konzentrationen des Substrats m^7GpppA **9** und der Cosubstrate AdoMet **12** und AdoEnYn **4** der Methyltransfer bevorzugt ablaufen und dadurch den Transfer der Penteninygruppe verhindern würde.

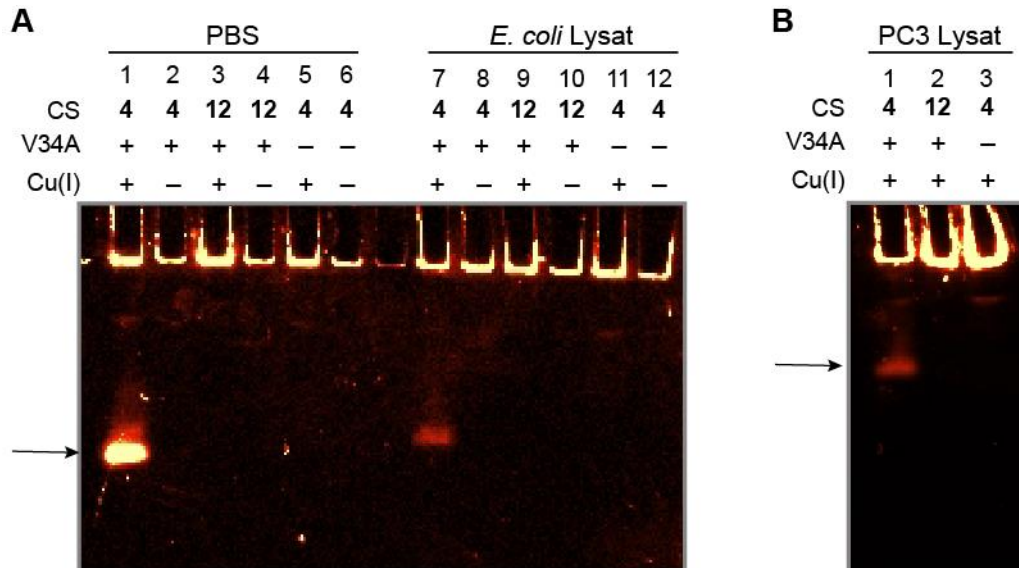


Abbildung 2.27 **Chemo-enzymatische Markierung des Kappen-Analogons m^7GpppA durch Penteninylierung und CuAAC in Lysat.** **A)** Analyse der chemo-enzymatischen Markierung, durchgeführt in *E. coli* Zelllysats, nach gelelektrophoretischer Trennung durch Detektion von Eterneon-Fluoreszenz. In den Reaktionen, welche N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7GpppA **15** und Cu(I) enthielten (1, 7) konnte ein fluoreszierendes Produkt auch in Gegenwart von *E. coli* Lysat (7) nach gelelektrophoretischer Trennung (20 %iges denat. Gel) und Beleuchtung mit grünen LEDs detektiert werden. Dieses trat in keiner der Kontrollen auf (2-6, 8-12; Biokonversionen mit AdoMet **12** als Cosubstrat (CS), ohne Enzym bzw. CuAAC ohne Cu(I) durchgeführt) und wurde **17** zugeordnet. **B)** Analyse der chemo-enzymatischen Markierung, durchgeführt in eukaryotischem Lysat, nach gelelektrophoretischer Trennung durch Detektion von Eterneon-Fluoreszenz. In der Reaktion, welche N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7GpppA **15** und Cu(I) enthielt (1) konnte ein fluoreszierendes Produkt in Gegenwart von PC3 Zelllysats nach gelelektrophoretischer Trennung (20 %iges denat. Gel) und Beleuchtung mit grünen LEDs detektiert werden. Dieses trat in keiner der Kontrollen auf (Biokonversionen mit AdoMet **12** als Cosubstrat (CS) bzw. ohne Enzym durchgeführt) und wurde **17** zugeordnet.

Auch das Kappen-bindende Protein eIF4E lag im eukaryotischen Lysat nicht in äquimolarer bezogen auf m^7GpppA **9**, sondern in einer Konzentration von ca. 14 μM vor,^[271] so dass möglicherweise nur freies m^7GpppA **9** enzymatisch modifiziert wurde. Allerdings deuten weitere Daten, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen werden konnten, darauf hin, dass bei äquimolarer Konzentration eIF4E und m^7GTP ein Methyltransfer durch GlaTgs2 erfolgen konnte (Daten im Anhang, Kapitel 8.5) und daher auch der Transfer der Penteninygruppe in Gegenwart von eIF4E möglich sein könnte.

Eine Markierung zellulärer mRNA in fixierten PC3-Zellen, die eine weitere Möglichkeit darstellte, um die chemo-enzymatische Markierung in Gegenwart Kappen-bindender Proteine durchzuführen, war nicht erfolgreich. Dies war unter anderem darauf zurückzuführen, dass

EterneonTM480/635-Azid **18** und CuBr präzipitierten und auch durch verschiedene Waschprozeduren nicht entfernt werden konnte, so dass ein hohes Hintergrundsignal auftrat. Auch muss außerdem angenommen werden, dass aufgrund der geringen Substrataffinität der Variante gegenüber der Kappe die enzymatische Modifizierung der zellulären mRNA ineffizient oder gar nicht erfolgte.

Für alle weiterführenden Experimente wird es daher essentiell sein, diese Eigenschaft zu verbessern, um einen effizienten enzymatischen Transfer auch in Gegenwart zellulärer mRNA-Konzentrationen zu erreichen. Außerdem muss für *in vivo*-Applikationen die Aktivität gegenüber dem natürlichen Cosubstrat minimiert werden, um die Methylierung der Ziel-mRNA durch GlcTgs2-V34A zu vermeiden.

2.8.2 Fluoreszenzmarkierung Kappen-tragender RNA durch CuAAC

Neben der Bioorthogonalität der chemo-enzymatischen Strategie – basierend auf enzymatischer Penteninylierung der mRNA-Kappe und Fluoreszenzmarkierung mittels CuAAC – sollte im Rahmen dieser Arbeit auch die Kompatibilität dieser Strategie mit dem Biomolekül RNA sowie die Möglichkeit der spezifischen Markierung von mRNA charakterisiert werden. Hierzu sollten der enzymatische Transfer der Penteninygruppe sowie die anschließende Fluoreszenzmarkierung mittels CuAAC unter Verwendung einer längeren RNA als Substrat erfolgen. Aufgrund der Substrataffinität der Variante gegenüber der Kappe, war es nicht möglich mRNA direkt aus Total-RNA eukaryotischer Zellen zu modifizieren, da hier nur Konzentrationen von etwa 4 μ M mRNA erreicht werden konnten, wenn RNA aus 8×10^8 Zellen isoliert und in einem geringen Volumen (ca. 10 μ L) aufgenommen wurde.

Um dennoch eine Aussage treffen zu können, wurde eine 106 nt lange RNA (16-3 RNA) durch *in vitro*-Transkription in Konzentrationen von bis zu 20 μ g/ μ L (ca. 500 μ M) hergestellt. Diese RNA wurde durch das *Vaccinia Capping* Enzym (VCE) anschließend mit der Kappenstruktur versehen. Hierzu wird die RNA durch das Enzym zunächst am 5'-Ende dephosphoryliert und anschließend mit GMP, welches aus GTP durch Abspaltung von Pyrophosphat hervorgeht, unter Bildung der 5'-5'-Triphosphatbrücke verknüpft.^[272] Darüber hinaus erfolgt in Gegenwart des Cosubstrats AdoMet **12** die Methylierung der Position N7 des terminalen Guanosins durch das VCE, wodurch die eukaryotische Kappenstruktur (*Cap* 0) gebildet wird. In dieser Arbeit wurde die *Capping* Reaktion mit VCE sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von AdoMet **12** durchgeführt. Hierdurch war es möglich sowohl eine RNA mit korrekter *Cap* 0-Struktur zu generieren (*Cap* 0-RNA) als auch eine RNA (Guanosin-RNA), die zwar ein terminales 5'-5'-triphosphatverbrücktes Guanosinmolekül

aufwies, sich aber hinsichtlich der Methylierung von der korrekten mRNA-Kappenstruktur unterschied. Diese fungierte als Kontroll-Substrat um die Spezifität der chemo-enzymatischen Modifizierung zu überprüfen.

Nach Durchführung der *Capping* Reaktion wurden beide RNAs (*Cap* 0-RNA und Guanosin-RNA) in einer Konzentration von je 200 μ M für die Biokonversion mit AdoEnYn **4** durch GlaTgs2-V34A eingesetzt. Hierbei sollte spezifisch eine Modifizierung der *Cap* 0-RNA durch Transfer der Penteninygruppe auf die Position N^2 der Kappe erfolgen. Aufgrund der fehlenden Methylierung an Position $N7$ des terminalen Guanosins sollte die Guanosin-RNA nicht von GlaTgs2-V34A erkannt werden und daher nicht als Substrat in der Biokonversion fungieren. Anschließend wurden beide RNAs für die chemische Markierung durch CuAAC eingesetzt. Hierbei sollte die spezifische Markierung der enzymatisch modifizierten *Cap* 0-RNA durch die Reaktion der enzymatisch transferierten Alkinygruppe und Eterneon-Azid **18** zum Triazol erfolgen. Nach der Inkubation beider RNAs mit Cu(I)/TBTA sowie dem Reportermolekül wurden die in den Proben enthaltenen Komponenten gelelektrophoretisch getrennt und hinsichtlich fluoreszierender Produkte analysiert. Hierfür wurde nach der Anregung mit grünen LEDs emittiertes Licht mit Wellenlängen von mehr als 605 nm detektiert. Darüber hinaus wurde RNA durch Färbung mit Ethidiumbromid und anschließender Beleuchtung mit UV-Licht visualisiert (Abbildung 2.28).

Die Visualisierung der Eterneon-Fluoreszenz zeigte, dass mittels der chemo-enzymatischen Strategie eine spezifische Markierung Kappen-tragender RNA erfolgreich durchgeführt werden konnte. Eine Fluoreszenzmarkierung war nur nachweisbar, wenn die RNA eine *Cap* 0-Struktur aufwies. Hingegen konnte für die Guanosin-RNA, die sich nur durch die fehlende Methylierung der Position $N7$ von der *Cap* 0-RNA unterschied, keine Markierung mit EterneonTM480/635-Azid **18** nachgewiesen werden. Durch Färbung des Gels mit Ethidiumbromid wurde nachgewiesen, dass intakte 16-3 RNA markiert worden war und keine Degradation des RNA-Substrats während der chemo-enzymatischen Markierung aufgetreten war.

Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass chemo-enzymatische Strategien durchaus neue Möglichkeiten eröffnen, um mRNAs isolieren oder visualisieren zu können. Die etablierten Methoden zeichnen sich dabei aufgrund der enzymatischen Modifizierung des Zielmoleküls durch eine hohe Spezifität aus und der zweistufige Aufbau ermöglicht die kovalente Verknüpfung von mRNAs mit einer Vielzahl verschiedener Reportermoleküle, so dass die etablierten Methoden leicht für unterschiedliche Anwendungen adaptiert werden können.

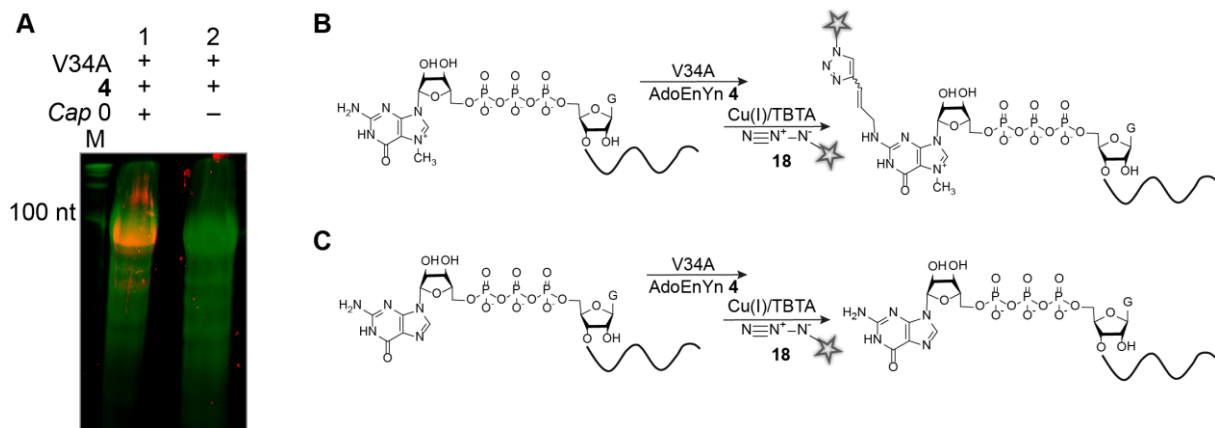


Abbildung 2.28 **Chemo-enzymatische Markierung Kappen-tragender RNA.** Die chemo-enzymatische Modifizierung durch Penteninylierung und CuAAC wurde zur Markierung des komplexen Biomoleküls mRNA eingesetzt, um die Kompatibilität und Spezifität dieser Methode zu demonstrieren. **B)** Analyse der chemo-enzymatischen Markierung Kappen-tragender RNA nach gelelektrophoretischer Trennung durch Detektion von Eterneon-Fluoreszenz und RNA. Nach der Biokonversion mit AdoEnYn **4** als Cosubstrat und anschließender CuAAC wurden die Proben gelelektrophoretisch (10 % denat. Gel) getrennt und Eterneon-Fluoreszenz (rot) durch Beleuchtung mit grünen LEDs sowie RNA durch Färbung mit Ethidiumbromid (grün) detektiert. **B)** Reaktionsschema der chemo-enzymatischen Markierung in Gegenwart von *Cap 0*-Struktur (in A, Spur 1) als Edukt. **C)** Reaktionsschema der chemo-enzymatischen Markierung in Gegenwart einer unmethylierten *capped* RNA (in A, Spur 2).

3. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, neue Strategien und Methoden zur Isolierung und Visualisierung eukaryotischer mRNA zu etablieren, die beispielsweise eine Verbesserung für die Charakterisierung subzellulär lokalisierter RNAs bedeuten könnten. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass mRNAs neben ihrer Rolle als Botenmolekül auch Einfluss auf die Regulation der Genexpression haben können^[46,51] (zusammengefasst durch Martin und Ephrussi^[37]). Diese subzellulär lokalisierten mRNAs akkumulieren in bestimmten Bereichen der Zelle, bevor die Translation der codierten Informationen zeitlich und räumlich reguliert induziert wird. Zunächst wurde vermutet, dass dieser Mechanismus nur eine Ausnahme der Genregulation darstellt. Mittlerweile konnte aber gezeigt werden, dass unterschiedlichste Zellen, wie neuronale Zellen,^[58,68] Oozyten^[46,54,67] und Hefen,^[40] subzellulär lokalisierte mRNAs zur Regulierung der Genexpression nutzen und beispielsweise in *Drosophila* Oozyten 70 % der mRNAs eine spezifische subzelluläre Lokalisation aufweisen^[46]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die asymmetrische Bereitstellung von mRNAs einen weit verbreiteten Mechanismus zur Genregulierung darstellt und dass hierbei auftretende Fehlregulationen die Ursachen verschiedenster Krankheiten sein könnten.

Es wurde bereits gezeigt, dass eine fehlende subzelluläre Lokalisation der *CamKII α* -mRNA in Neuronen einen nachteiligen Einfluss auf das Langzeitgedächtnis von Mäusen hat.^[51] Auch als potentieller Auslöser der multiplen Sklerose (MS) wird eine Fehlregulation der subzellulären mRNA-Lokalisation mittlerweile diskutiert^[86,87] und Vainer *et al.* postulierten, dass eine fehlerhafte subzelluläre Lokalisation von mRNAs die Migration von Krebszellen begünstigen könnte^[88].

Methoden, die es ermöglichen den Transport und die Dynamiken subzellulär lokalisierter mRNAs, zu visualisieren, erlauben es, den Einfluss dieses Mechanismus auf die zelluläre Integrität besser zu verstehen. Hierdurch kann es unter Umständen möglich werden, Fehlregulationen der mRNA-Lokalisation auch als Auslöser verschiedener Erkrankungen zu identifizieren und möglicherweise neue Behandlungsstrategien zu entwickeln. Heutzutage gibt es zahlreiche Methoden bestimmte mRNAs hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation zu untersuchen. Die wahrscheinlich bisher am häufigsten genutzte Strategie, stellt die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) dar. Hierfür werden Zellen fixiert und spezifische mRNAs durch die Zugabe komplementärer, fluoreszierender Oligonukleotide detektiert. Diese Methode wurde unter anderem auch durch Lécuyer eingesetzt, um die subzelluläre Lokalisation verschiedener mRNAs in *Drosophila* Oozyten zu charakterisieren.^[46] Der Vorteil dieser Methode ist ihre relativ einfache Durchführbarkeit und die Möglichkeit

verschiedenste mRNA-Spezies in einer Probe detektieren zu können. Allerdings ist die Charakterisierung der Dynamiken des mRNA-Transports mit dieser Methode eingeschränkt, da nur Momentaufnahmen des Ablaufs erhalten werden und keine Detektion einer bestimmten mRNA über einen längeren Zeitraum erfolgen kann. Darüber hinaus ist strittig, ob die Fixierung der Zellen eine Veränderung des nativen Systems nach sich zieht.^[110] Um diese Fragestellung zu umgehen, wurden Methoden entwickelt, die in lebenden Zellen durchgeführt werden können. Eine Weiterentwicklung der FISH- stellt dabei die sogenannte FIVH-Methode dar. Diese erlaubt ebenfalls die Visualisierung spezifischer mRNAs durch komplementäre Oligonukleotide, kann aber mit lebenden Zellen durchgeführt werden. Dabei werden die Oligonukleotide ohne Behandlung der Zellen^[113] oder bei Verwendung größerer Sonden nach Inkubation mit Streptolysin O passiv aufgenommen^[273]. Die Dynamiken der Ziel-mRNA können dann in Echtzeit visualisiert werden.^[273] Allerdings ist es hier, anders als bei der FISH-Methode, nicht möglich, ungebundene Sonden durch Waschen zu entfernen. Um ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis zu erreichen, muss daher bei der FIVH gewährleistet sein, dass das Fluoreszenzsignal der Ziel-mRNA deutlich vom Hintergrund unterschieden werden kann. Dies wurde beispielsweise durch die Bindung einer Vielzahl von Sonden an das Zielmolekül erreicht.^[273] Allerdings muss hinterfragt werden, ob ein solches Vorgehen, aufgrund der enormen Vergrößerung des Molekulargewichts des Zielmoleküls, die nativen Prozesse beeinflusst. Politz *et al.* nutzten die FRAP-Methode, um das Fluoreszenzsignal in bestimmtem Bereichen der Zelle zu löschen und so die Dynamiken einzelner Moleküle, die in diesen Bereich eintraten, untersuchen zu können.^[113] So konnten mRNAs in bestimmten subzellulären Regionen visualisiert werden. Allerdings ist die Möglichkeit, bestimmte mRNA-Moleküle während des Transports über längere Zeiträume und Strecken zu verfolgen, bei diesem Vorgehen eingeschränkt. Außerdem muss beachtet werden, dass lineare Oligonukleotide leicht im Zellkern akkumulieren^[118] oder durch Nukleasen degradiert werden^[120]. Einige der Probleme, die im Zusammenhang mit diesen Sonden auftreten, wurden durch die Verwendung modifizierte Oligonukleotide gelöst.^[119,120,137] Darüber hinaus wurden Hybridisierungsmethoden auch durch *Molecular Beacons*, *caged Molecular Beacons*^[133] und PNA-FIT-Sonden^[137], welche Verbesserungen des Signal/Rausch-Verhältnisses ermöglichen, optimiert.

Die PNA-FIT-Sonden zeichnen sich sowohl durch eine hohe Stabilität in Zellen als auch die Erzeugung eines Fluoreszenzsignals nur bei Hybridisierung mit der Ziel-RNA aus und wurden erfolgreich eingesetzt, um verschiedene mRNA-Spezies in lebenden Zellen zu detektieren.^[137] Es ist also grundsätzlich möglich, nicht-codierbare Sonden zur Visualisierung

von mRNA *in vivo* einzusetzen. Allerdings muss hierfür meist die aufwendige Synthese einer modifizierten Sonde erfolgen. Unmodifizierte Oligonukleotidsonden scheinen dagegen eher die Methode der Wahl für *in vitro*-Applikationen zu sein. Im Bereich der Visualisierung von mRNA *in vivo* liegt der Fokus derzeit auf der Etablierung von Methoden, welche genetisch-codierbare Reporter nutzen.

Hierfür werden meist fluoreszierende Proteine und RNA-bindenden Proteine, wie MS2^[40] oder λ_{N22} ,^[142] fusioniert. Das Bindemotiv des jeweiligen Proteins muss zunächst in die zu charakterisierende mRNA eingebracht werden. Dies geschieht meist in der 3'-UTR. Dieser Bereich hat bekanntermaßen Einfluss auf die subzelluläre mRNA-Lokalisation^[40,68,143] (zusammengefasst durch Andreassi und Riccio^[274]). Deshalb muss vor der Etablierung eines solchen Systems eine genaue Analyse erfolgen, wo das Bindemotiv in die Ziel-RNA integriert werden kann. Alle Komponenten dieses Systems können dann *in vivo* hergestellt und für die Visualisierung der Ziel-mRNA genutzt werden. Methoden, die auf diesem Prinzip basieren, wurden erfolgreich zur Visualisierung von mRNA in Hefen,^[40,59] Hyphen^[143] sowie Neuronen^[141] eingesetzt. Kürzlich konnte sogar eine transgene Maus generiert werden, die die β -actin-mRNA mit dem MS2-Bindemotiv in allen Geweben exprimiert.^[275] Für die Detektion können einzelne Gewebezellen isoliert, kultiviert und mit einem Plasmid, welches für die entsprechenden Reporterproteine codiert, transfiziert werden. Hierdurch soll ausgeschlossen werden, dass beobachtete Effekte lediglich auf den Eigenschaften der sonst für diese Studien genutzten, immortalisierten Zelllinien beruhen. Bei allen diesen Methoden wird eine Visualisierung der Ziel-mRNA durch die Bindung mehrerer Reporterproteine erreicht. Hierdurch wird ein starkes Fluoreszenzsignal im Bereich der mRNA detektierbar, dass sich vom Hintergrundsignal unterscheidet. Allerdings ist es nötig, das Bindemotiv mehrfach in die Ziel-mRNA einzuführen. Aufgrund der Rekrutierung einer Vielzahl von Reporterproteinen sowie der Überexpression der Ziel-RNA kann nicht ausgeschlossen werden, dass es zu einer Beeinflussung der subzellulären mRNA-Lokalisation und Transporteigenschaft kommt.^[144] Die Möglichkeit nativ auftretende Sequenzen der mRNA als Bindemotiv zu nutzen sowie ein anschaltbares Fluoreszenzsignal zu erzeugen, würde diese Einschränkung teilweise umgehen. Ein System, welches diese beiden Anforderungen erfüllt, wurde im Jahr 2007 durch Ozawa *et al.* etabliert. Diese nutzten Fusionskonstrukte aus GFP-Fragmenten und RNA-bindenden Pumilio-Proteinen, um mitochondriale RNA *in vivo* zu detektieren.^[148] Yoshimura *et al.* konnten im Jahr 2012 diese Methode nutzen, um β -actin-mRNA in Cos7-Zellen zu visualisieren.^[150] Der Vorteil bei der Verwendung von Pumilio als RNA-bindendem Protein ist, dass dieses RNA sequenzspezifisch bindet und die Sequenzspezifität durch ortsgerichtete

Mutagenese verändert werden kann.^[149] Somit kann Pumilio theoretisch zur Detektion jeder beliebigen, endogenen RNA eingesetzt werden. Durch die Verwendung der GFP-Fragmente war es außerdem möglich das Hintergrundsignal zu reduzieren. Jedes dieser Fragmente war mit einem Pumilio-Protein fusioniert und ein Fluoreszenzsignal konnte erst beobachtet werden, wenn beide Proteine an die RNA gebunden hatten und ein funktionelles GFP rekonstituiert wurde. Eine weitere Verbesserung dieser Strategie wäre es, Fusionskonstrukte mit einem geringen Molekulargewicht zu nutzen, um diese einfacher *in vivo* produzieren zu können. Eine solche Strategie wurde *in vitro* durch Kellermann *et al.* etabliert.^[152] Hierbei wurde das *split*-GFP-System von Waldo *et al.* genutzt.^[151] Bei diesem System wird die GFP-Fluoreszenz rekonstituiert, wenn die terminalen β -Faltblätter 10 und 11 sowie das N-terminalen Fragment des GFPs, welches die β -Faltblätter 1-9 umfasst, in räumliche Nähe gebracht werden. In dem Ansatz von Kellermann *et al.* wurden die terminalen Faltblätter mit Pumilio-Varianten fusioniert, die eine bestimmte RNA binden. In Anwesenheit dieser Ziel-RNA sowie der Pumilio-Varianten und dem N-terminalen GFP-Fragment konnte ein funktioneller Fluorophor rekonstituiert werden.^[152] Eine solche Strategie könnte potentiell auch für *in vivo*-Applikationen eingesetzt werden. Die Vorteile eines *split*-GFP/Pumilio-Systems sind neben der Möglichkeit zur Visualisierung endogener mRNA und der anschaltbaren Fluoreszenz die Möglichkeit kleinere Fusionskonstrukte produzieren zu können.

Eine Verbesserung etablierter Strategien könnte unter Umständen durch Erhöhung der Sensitivität bei GFP-Detektion durch eine Mikroskopiertechnik mit Zweifarben-Anregung erreicht werden.^[276,277]

Dennoch muss bei all diesen Methoden auch immer das hohe Molekulargewicht des Reporters beachtet werden. Es kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass dessen Bindung Einfluss auf die Ziel-mRNA hat^[144] oder dass eine Agglomeration der Reporterproteine auftritt^[59].

Paige *et al.* ist es gelungen einen codierbaren, Nukleinsäure-basierten Reporter zu entwickeln, der die Eigenschaften des GFP imitiert.^[153] Hierfür selektierten sie ein RNA-Aptamer (*spinach*-Aptamer), welches verschiedene GFP-ähnliche Fluorophore bindet und dabei deren Quantenausbeute erhöht. Die Ziel-RNA kann dann *in vivo* durch diese induzierte Fluoreszenz detektiert werden, wenn sie als Fusionskonstrukt mit dem *spinach*-Aptamer exprimiert wird, wie am Beispiel der 5S-RNA gezeigt wurde.^[153] Diese Methode erfüllt eine Vielzahl der Kriterien für die Anwendung in lebenden Zellen, wie die Möglichkeit zur Codierbarkeit der Sonde, die induzierbare Fluoreszenz und ein geringes Hintergrundsignal (Experimente mit

Kontroll-RNA). Ein Nachteil ist allerdings, dass, wie auch im Falle der Verwendung des GFP-MS2- bzw. λ_{N22} -Systems, keine endogene RNA detektiert wird.

Die hier beschriebenen Arbeiten haben gezeigt, dass eine Vielzahl von Methoden eingesetzt werden kann, um mRNAs zu detektieren und diese sich in den letzten Jahren immer weiter den Vorstellungen optimaler Detektionsmethoden angenähert haben. Wie aber bereits erwähnt, werden mittels der codierbaren Reporter meist keine endogenen RNAs visualisiert und das native System wird durch Bindung hochmolekularer Reportermoleküle potentiell beeinflusst. Der Nachweis endogener RNA durch minimalen Eingriff in das native System und damit auch minimale Störungen dieses natürlichen Zustands stellt somit immer noch ein Ziel im Bereich der RNA-Detektion dar.

Diese Anforderung könnte unter Umständen durch die Etablierung einer chemo-enzymatischen Strategie zur Visualisierung von mRNA erreicht werden. Diese Strategien beschreiben einen zweistufigen Prozess. In einem ersten Schritt wird enzymatisch und damit spezifisch eine reaktive Gruppe auf das jeweilige Zielmolekül übertragen. In einem zweiten Schritt kann diese Gruppe dann mittels einer passenden Click-Reaktion modifiziert werden, wodurch eine kovalente Verknüpfung von Ziel- und Reportermolekül erreicht wird. Die potentielle Anwendbarkeit einer solchen Methode zur Visualisierung endogener Biomoleküle wurde bereits am Beispiel von Proteinen gezeigt.^[154,176] Hier wurden Alkenyl-haltige Aminosäuren *in vivo* in Proteine eingebaut, die dann mittels Photoclick-Reaktionen fluoreszenzmarkiert wurden. Weitere Beispiele in der Literatur belegen, dass chemo-enzymatische Strategien durchaus eine Alternative zu derzeitigen Detektionsmöglichkeiten darstellen. Die G9a-Methyltransferase wurde *in vivo* genutzt, um spezifisch deren Substrate mit einer reaktive Gruppen unter Verwendung des AdoMet-Analogons Hey-SAM zu modifizieren, so dass diese anschließend in Lysat durch CuAAC mit Fluorophoren markiert werden konnten.^[198] Eine Modifizierung des jeweiligen Zielmoleküls durch Methyltransferasen, welche AdoMet-Analoga als Cosubstrat nutzen, stellt dabei die derzeit am häufigsten genutzte Strategie zur Etablierung einer chemo-enzymatischen Modifizierung dar. Hierbei wird die Substratspezifität des Enzyms genutzt, um eine reaktive Gruppe anstelle des normalerweise transferierten Methylrests auf das jeweilige Zielmolekül zu übertragen. *In vitro* konnten auf diese Weise Proteine,^[195,199] DNA^[203] und RNA^[155,156] erfolgreich markiert werden. Dies unterstreicht die breite Anwendbarkeit und Möglichkeiten dieser Methode. Allerdings wurde eine solche chemo-enzymatische Strategie bisher nicht zur Markierung eukaryotischer mRNAs beschrieben, obwohl eine solche Methode neue Möglichkeiten sowohl im Bereich der Detektion als auch der Isolierung dieses Biomoleküls eröffnen könnte.

Die Vorteile wären, dass endogene eukaryotische mRNA durch den enzymatischen Transfer spezifisch mit einer kleinen, reaktiven Gruppe versehen wird. Durch den modularen Aufbau einer solchen Methode könnte diese enzymatisch modifizierte mRNA dann durch eine passende Click-Reaktion mit unterschiedlichen Reportermolekülen versehen und hierdurch sowohl für Visualisierungs- als auch für Isolierungsstrategien zugänglich gemacht werden. Die grundlegende Idee dieser Arbeit war daher, die Vorteile und Möglichkeiten chemo-enzymatischen Methoden auch zur Markierung eukaryotischer mRNA nutzen zu können. Hierzu wurden verschiedene Strategien entwickelt sowie deren potentielle Anwendbarkeit, Spezifität und Biokompatibilität *in vitro* demonstriert. Für den Schritt der enzymatischen Modifizierung wurden Trimethylguanosinsynthasen gewählt. Diese sind bekannt für die spezifische Hypermethylierung der mRNA-Kappe,^[211] einem Charakteristikum eukaryotischer mRNA. Eine Variante der Trimethylguanosinsynthase aus *Giardia lamblia* wurde unter anderem genutzt, um die mRNA-Kappe zu allylieren und durch eine Photoclick-Reaktion zu markieren.

Auch wurde eine chemische Modifizierung der Allylgruppe mittels einer Thiol-En-Click-Reaktion durchgeführt, die potentiell für eine *in vitro*-Anwendung, wie eine Isolierungsstrategie geeignet wäre. Darüber hinaus wurde die Möglichkeit zur Markierung der enzymatisch alkinylierten mRNA-Kappe mittels CuAAC gezeigt.

Die erhaltenen Ergebnisse und Aussagen sowie potentiellen Möglichkeiten dieser Strategien werden in den folgenden Kapiteln (3.1-3.3) dargestellt.

3.1 Charakterisierung der Trimethylguanosinsynthasen

3.1.1 Colorimetrischer Nachweis der Trimethylguanosinsynthaseaktivität

Für die Etablierung einer chemo-enzymatischen Strategie war es zunächst essentiell die Enzyme, welche potentiell für Modifizierung der mRNA-Kappe genutzt werden sollten, zu reinigen und hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber den natürlichen Substraten m⁷G und AdoMet **12** zu charakterisieren.

In dieser Arbeit wurde zum Nachweis der Enzymaktivität zunächst ein colorimetrischer Nachweis, basierend auf einer Veröffentlichung von Hendricks *et al.*,^[238] etabliert. Dieser sollte final genutzt werden, um Enzymaktivität sowohl in Puffer als auch in prokaryotischem Lysat, was die Möglichkeit zur Etablierung eines HTS ermöglicht hätte, nachzuweisen.

Grundlage dieser Methode ist, dass durch Methyltransferasen als Coprodukt des jeweils katalysierten Methyltransfers AdoHcy **13** gebildet. Dieses wird in dem Assay durch MTAN und LuxS zu Homocystein abgebaut. Die entstehende Thiolgruppe kann mit DTNB umgesetzt

werden, wobei TNB gebildet wird, welches durch Messung der Absorption bei 414 nm quantifiziert werden kann. Prinzipiell hätten für einen colorimetrischen Nachweis der Trimethylguanosinsynthaseaktivität auch andere Strategien genutzt werden können, allerdings weisen diese individuelle Nachteile auf. Beispielsweise etablierten Dorgan *et al.* einen colorimetrischen Assay, der kontinuierlich den Nachweis von AdoHcy **13** ermöglicht. Hierfür nutzten sie neben MTAN das Enzym Adenin-Deaminase, welches Adenin zu Hypoxanthin und Ammoniak hydrolysiert. Die Bildung von Hypoxanthin wird durch Messung der Absorption bei 265 nm nachgewiesen.^[278] Diese Methode bietet zwar den Vorteil, dass der Reaktionsverlauf über die gesamte Inkubationsdauer verfolgt werden kann, allerdings ist die Messung der Absorption bei 265 nm in Lysat nachteilig, da durch hier vorliegende Nukleotide das Hintergrundsignal zu hoch wäre. Eine weitere Möglichkeit zur kontinuierlichen Detektion wurde durch Graves *et al.* beschrieben.^[279] Diese setzten allerdings keine enzymatische Strategie ein, sondern bestimmten die Fluoreszenzpolarisation eines Fluorescein-AdoHcy-Konjugats in Gegenwart eines anti-AdoHcy-Antikörpers. Durch den Methyltransfer wird im Assay AdoHcy **13** gebildet, welches mit dem markierten AdoHcy um Antikörperbindungsstellen konkurriert. Wenn Fluorescein-AdoHcy freigesetzt wird, wird eine Verringerung der Fluoreszenzpolarisation beobachtet. Diese Methode wurde ebenfalls als HTS beschrieben, allerdings müssen hier die Kosten der benötigten Reagenzien beachtet werden, weshalb dieser Ansatz in dieser Arbeit nicht zur Etablierung eines HTS gewählt wurde.

Als weitere Möglichkeit zur Detektion von Trimethylguanosinsynthaseaktivität hätte der Assay von Ibáñez *et al.* genutzt werden können.^[280] Hierbei wird AdoHcy **13** durch MTAN, Adeninphosphoribosyltransferase und Pyruvathosphatdikinase zu ATP abgebaut, welches mittels eines Luciferin/Luciferase-Kits detektiert wird. Diese Strategie zeichnet sich nicht nur durch einen linearen Zusammenhang von detektiertem Signal und AdoHcy-Konzentration aus, sondern auch durch eine hohe Sensitivität von 0,3 pmol AdoHcy **13**.^[280] Hingegen wird das Detektionslimit beispielsweise des Assay von Hendricks *et al.* mit ca. 1,2 nmol angegeben.^[238] Diese Sensitivität hätte den Assay von Ibáñez *et al.* eigentlich prädestiniert, um einen HTS zu etablieren. Da hier aber drei Enzyme rekombinant produziert werden müssten und in Lysat vermutlich auch hohes Hintergrundsignal durch zelluläres ATP auftreten würde, wurde diese Strategie nicht zur Etablierung des colorimetrischen Nachweises gewählt.

Die Etablierung eines colorimetrischen Nachweises der Trimethylguanosinsynthaseaktivität mittels MTAN/LuxS und DTNB bot hingegen die Vorteile, dass die benötigten Chemikalien

und Enzyme leicht zugänglich waren und nur zwei Enzyme rekombinant produziert werden mussten. Darüber hinaus stellte auch bei dieser Methode die Möglichkeit zur Messung der Absorption im 96- bzw. 384-well-Format eine Voraussetzung dar, um einen HTS entwickeln zu können. Dies ist besonders wichtig, wenn eine Bibliothek verschiedener Varianten eines Enzyms oder verschiedene Methyltransferasen hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht werden sollen. In dem Assay wird ebenfalls das Coprodukt AdoHcy **13** detektiert, welches auch unabhängig von der verwendeten Methyltransferase oder des Transfers einer reaktiven Gruppe in Gegenwart von AdoMet-Analoga gebildet wird. Dies bedeutet, dass diese Methode grundsätzlich auch zur Bestimmung promiskuitiver Aktivität auf AdoMet-Analoga geeignet ist. Weiterhin wird AdoHcy **13**, das einen Inhibitor vieler Methyltransferasen darstellt,^[281] in diesem Assay enzymatisch degradiert und beeinträchtigt daher die enzymatische Transferreaktion nicht.

Es zeigte sich in dieser Arbeit, dass der Assay in der Tat genutzt werden kann, um die Aktivität sowohl von gereinigtem hTgs1 als auch hTgs1-Aktivität in Lysat entsprechender Enzym-produzierender Zellen nachzuweisen. Hierbei war entscheidend, dass jeweils geeignete Kontrollen gewählt wurden, da der Assay den Nachteil aufweist, alle in einer Probe enthaltenen Thiole zu detektieren. Es wird somit auch ein Signal durch Thiole der verwendeten Enzyme sowie durch Thiol-haltige Bestandteile des Lysats, wie Glutathion, hervorgerufen. In Gegenwart des gereinigten Enzyms hTgs1 wies die Reaktion eine Nettoabsorption (Subtraktion des Signals der Kontrolle von Signal der Reaktion) von 0,12 a. U. auf. Im Vergleich zu der Kontrolle, welche hier die Reaktion ohne das Cosubstrat AdoMet **12** beschreibt, war damit für die Reaktion ein 1,6-fach höheres Signal detektierbar. Für den Nachweis aus Lysat wurde standardmäßig ebenfalls die Nettoabsorption bestimmt. Diese wurde ermittelt durch Subtraktion der Absorption einer Lysatprobe, welche alle Komponenten außer m⁷GTP enthielt, von der Absorption, welche in Gegenwart desselben Lysats einschließlich m⁷GTP erhalten wurde. In beiden Ansätzen wurde ein hohes Hintergrundsignal beobachtet, welches vermutlich auf Thiol-haltige Verbindungen des Lysats zurückzuführen war. In Anwesenheit von hTgs1 sowie des Substrats m⁷GTP erfolgte aber die Bildung weiterer Thiole durch Degradation des generierten AdoHcy **13**. In diesen Reaktionen konnte daher nach der Biokonversion eine höhere Absorption gemessen werden, als in Abwesenheit des Substrats. Durch die Bestimmung der Nettoabsorption wurde das durch unspezifische Thiole bedingte Hintergrundsignal bestimmt und rechnerisch eliminiert. Für den Nachweis von hTgs1-Aktivität aus prokaryotischem Lysat wurden Werte zwischen 0,02 a. U. und 0,12 a. U. bestimmt. Wie aus einer erstellten Homocystein-Kalibriergerade

abgeleitet werden konnte, entsprachen diese Werte Homocysteinkonzentrationen von 18 bzw. 70 μM . Die maximal detektierte Nettoabsorption von 0,12 a. U. war in guter Übereinstimmung mit den Werten, die unter gleichen Bedingungen auch mit gereinigtem Enzym erhalten wurden. Dies demonstriert die Zuverlässigkeit der etablierten Methode auch in Gegenwart von Lysat. Für das gereinigte Enzym wurde auf Grundlage der Wechselzahl^[211] und der bekannten Enzymkonzentration berechnet, dass in 60 Minuten 87 μM AdoHcy **13** gebildet werden. Der Vergleich mit der Homocystein-Kalibriergerade zeigte aber, dass die detektierte Absorption einer geringeren Homocysteinkonzentration entsprach. Dies könnte bedeuten, dass die hier gereinigte Trimethylguanosinsynthase eine geringere katalytische Umsatzzahl aufweist, als in der Literatur beschrieben ist.^[211] Es könnte aber auch sein, dass für die geringere nachgewiesene Homocysteinkonzentration die Oxidation gebildeten Homocysteins verantwortlich ist, wodurch dieses nach einiger Zeit nicht mehr nachweisbar ist. Es wurde gezeigt, dass innerhalb von 60 Minuten 300 μM Homocystein oxidiert werden. Hieraus lässt sich schließen, dass während der Biokonversionen gebildetes Homocystein teilweise oxidiert wird und die nachgewiesene Konzentration daher geringer ist, als aufgrund der enzymatischen Umsatzzahlen zu erwarten wäre.

Bei Durchführung des Assays über einen längeren Zeitraum muss daher beachtet werden, dass die generierte Menge an AdoHcy **13** höher sein muss, als die Nachweisgrenze von 10 μM (bestimmt für die Biokonversion von AdoHcy **13** zu Homocystein durch MTAN/LuxS), um trotz der Verluste durch Oxidation eine ausreichende Konzentration Homocystein in der Reaktion vorliegen zu haben. Dieses Problem fällt immer weniger ins Gewicht, je schneller der jeweilige Methyltransfer erfolgt, denn je kürzer der Zeitraum ist, um eine ausreichend hohe Konzentration an Homocystein zu erreichen, umso geringer ist der Anteil oxidierten Homocysteins. Für die Aktivitätsbestimmung verschiedener Methyltransferasen muss daher eine Optimierung der Durchführung hinsichtlich der Inkubationsdauer erfolgen. Unter Umständen ist eine Verbesserung dieses colorimetrischen Assay in Bezug auf den Nachweis von hTgs1-Aktivität möglich, wenn erst nach der Reaktion der Trimethylguanosinsynthase und kurz vor der Detektion, MTAN und LuxS zugegeben werden. Auf Basis der katalytischen Wechselzahlen dieser Enzyme^[239,240] kann angenommen werden, dass in einem Zeitraum von drei Minuten der Umsatz von mindestens 18 nmol (60 μM) AdoHcy erfolgen sollte. Die Idee wäre hierbei, dass eine ausreichende Menge AdoHcy **13** innerhalb eines beliebigen Zeitraums gebildet und erst im Anschluss zu Homocystein umgesetzt wird. Hierdurch würde vermieden, dass durch den ständigen Abbau von AdoHcy **13** ein Teil des gebildeten Homocysteins nicht detektiert wird. Diese Strategie wurde in ersten Versuchen auch schon in dieser Arbeit

getestet. Allerdings war dies bis jetzt nicht erfolgreich. Der Hauptgrund bestand darin, dass kleine Volumina MTAN und LuxS jeder einzelnen Probe hinzugefügt werden mussten, wodurch Schwankungen des Thiol-Gehalts auftraten. Eventuell wäre es aber durch die Zugabe größerer Volumina möglich, eine Verbesserung des Assays zu erreichen. Man müsste bei einem solchen Vorgehen allerdings bedenken, dass der Vorteil der Degradation des inhibitorischen AdoHcy **13** verloren gehen würde. Dies würde vor allem einen Nachteil darstellen, wenn die Methode zum Nachweis von enzymatischer Promiskuität gegenüber AdoMet-Analoga eingesetzt würde. Für diesen Fall wäre es sicherlich vorteilhaft, den Assay während der kompletten Inkubationszeit in Gegenwart von MTAN und LuxS durchzuführen und zu berücksichtigen, dass ein Anteil gebildeten AdoHcy **13** nicht detektiert werden kann. Allerdings war es bisher generell nicht möglich, den Assay für den Nachweis promiskuitiver Aktivität zu etablieren, obwohl er bereits im Rahmen dieser Arbeit genutzt werden sollte, um die Promiskuitäten von Enzymen gegenüber dem AdoMet-Analogen AdoPropen **1** in einem HTS zu überprüfen. Dadurch sollte es ermöglicht werden, Varianten zu finden, welche für eine enzymatische Modifizierung der mRNA-Kappe in einem chemo-enzymatischen Ansatz geeignet wären. Der Grund dafür, dass der Assay nicht als HTS zum Nachweis promiskuitiver Aktivität etabliert werden konnte, lag darin, dass hierfür Lysat als Enzymquelle genutzt werden müsste, um aufwendige Reinigungen der Enzyme zu umgehen. In prokaryotischem Lysat, in welchem die rekombinant, produzierten Enzyme vorliegen würden, ist aber auch das natürliche Cosubstrat der Trimethylguanosinsynthasen, AdoMet **12**, enthalten. Ausgehend von den Bedingungen, welche zur Detektion natürlicher Aktivität in Lysat etabliert wurden, kann dabei eine Konzentration von ca. 50 μM AdoMet **12** in der Reaktion angenommen werden (siehe auch Kapitel 2.8.1). Sollte unter diesen Bedingungen Promiskuität untersucht werden, würden das natürliche Cosubstrat AdoMet **12** sowie das AdoMet-Analogen AdoPropen **1** in der Reaktion vorliegen. Es könnte somit sowohl der Transfer der Allyl- als auch der Methylgruppe katalysiert werden. In beiden Fällen würde AdoHcy **13** gebildet und somit Homocystein detektiert werden. Mit dem Assay wäre es unter diesen Bedingungen daher nicht möglich die natürliche von der promiskuitiven Enzymaktivität zu unterscheiden. Eine Möglichkeit, die hier beschriebene Methode möglicherweise dennoch für den Nachweis promiskuitiver Aktivität zu nutzen, wäre das zelluläre AdoMet **12** zunächst abzubauen, bevor die Zugabe des Substrats $m^7\text{GTP}$ sowie des jeweiligen AdoMet-Analogons erfolgt. Zu diesem Zweck könnte beispielsweise die S-Adenosylmethionin-Decarboxylase getestet werden, die eine Decarboxylierung von AdoMet **12** und so die Bildung von S-Adenosyl-5'-3-methylthiopropylamin katalysiert.^[250] Hierdurch würde zunächst im Lysat vorliegendes AdoMet **12**

abgebaut werden, ohne zur Bildung von Homocystein beizutragen. Im Folgenden könnte dann das entsprechende AdoMet-Analogon eingesetzt und die Promiskuität der produzierten Trimethylguanosinsynthase auf Grundlage der Bildung von Homocystein charakterisiert werden.

Um die Sensitivität der Detektion von Trimethylguanosinsynthaseaktivität zu verbessern, was auch einen Vorteil für einen möglichen Nachweis promiskuitiver Aktivität in Lysat darstellen würde, könnten fluoreszierende Reporter genutzt werden. Beispielsweise wurden Fluorescein-Cystamin-Methylrot^[282] und ThioGlo1^[249,283] für den Nachweis von Homocystein in wässriger Lösung eingesetzt. Die Generierung von Homocystein erfolgte in diesen Beispielen sowohl durch MTAN/LuxS als durch S-Adenosylhomocysteinhydrolase.^[249,282,283] Durch Fluorescein-Cystamin-Methylrot als Detektionsreagenz in Puffer konnte eine vierfach bessere Nachweisgrenze als bei Verwendung von DTNB erhalten werden.^[282]

Neben der Verwendung zur Charakterisierung von Varianten hinsichtlich promiskuitiver Aktivität, könnte der Assay ebenfalls zur Beantwortung einer weiteren Fragestellung genutzt werden, die kurz erläutert werden soll. Die in dieser Arbeit, durch ortsgerichtete Mutagenese, erhaltene Variante GlTgs2-V34A weist eine hohe Aktivität gegenüber AdoPropen **1** aber auch gegenüber dem nativen Substrats AdoMet **12** auf. Für eine potentielle Anwendung *in vivo* muss die Aktivität dieses Enzyms gegenüber AdoMet **12** aber gering sein, um die Übertragung der reaktiven Allylgruppe anstelle des Methylrests auf das Biomolekül mRNA zu gewährleisten. Um eine Variante zu erhalten, die dieses Kriterium erfüllt, wäre es möglich eine Bibliothek auf Basis von GaTgs2-V34A zu generieren und Lysate einzelner Klone hinsichtlich der Aktivität auf AdoMet **12** zu untersuchen. Die natürlich vorliegende Konzentrationen von 50 μ M AdoMet **12** sollte dabei bereits ausreichend sein, um in Gegenwart von m^7 GTP ein signifikantes Signal von 0,08 a. U. zu detektieren, wie aus der Homocystein-Kalibriergerade abgeleitet werden kann. Um noch höhere Umsätze durch gleichbleibend hohe Enzymgeschwindigkeit zu gewährleisten, wäre es denkbar, AdoMet **12** zuzufügen und so die Bildung von Homocystein in höheren Konzentrationen zu gewährleisten. Varianten, die keine oder nur geringe Aktivität gegenüber AdoMet **12** zeigen, würden aufgrund einer niedrigen detektierten Nettoabsorption identifiziert. Der Nachweis einer „Nichtaktivität“ stellt zwar nicht die optimale *Screening*-Methode dar, könnte aber eine erste Möglichkeit bieten, eine Variante mit dieser benötigten Eigenschaft zu finden. In einem zweiten Schritt könnten dann Varianten, die in Gegenwart von m^7 GTP und AdoMet **12** keine Homocysteingenerierung aufweisen, weiter charakterisiert werden. Varianten, die diese erste Anforderung der Nichterkennung des natürlichen Substrats erfüllen, müssten hierzu

hinsichtlich promiskuitiver Aktivität getestet werden. Da dies nur eine geringe Anzahl an Varianten wäre, könnte dieser zweite Charakterisierungsschritt mit gereinigten Enzymen durchgeführt werden, wobei die Analyse sowohl mittels RP-HPLC als auch mittels des Assays erfolgen könnte.

In dieser Arbeit wurde der etablierte Assay zum colorimetrischen Nachweis der Aktivität von Trimethylguanosinsynthasen sowohl in Puffer als auch in Lysat genutzt. Mögliche Optimierungen könnten ermöglichen, dass Anwendungsgebiet dieser Methode zu erweitern und sie so eventuell auch als HTS einzusetzen.

Die Möglichkeit verschiedene Fragestellung mit Hilfe des Assays schnell und einfach zu lösen, konnte auch in dieser Arbeit exemplarisch gezeigt werden, indem dieser zur Untersuchung potentieller Methyltransferaseinhibitoren eingesetzt wurde.

Die Suche nach Methyltransferaseinhibitoren ist von besonderem pharmakologischem Interesse, da viele Viren eigene Enzyme nutzen, um beispielsweise ihre mRNA mit einer Kappe zu versehen (zusammengefasst durch Ferron *et al.*^[242]). Durch diese Prozesse kann unter anderem die mRNA der Wirtszelle nachgeahmt oder die Translationsrate erhöht werden.^[243,244] Inhibitoren, die solche Enzyme selektiv blockieren, könnten neue Therapieansätze darstellen. Neben der Möglichkeit durch rationales Design potentiell inhibierende Moleküle zu identifizieren, kann auch die Charakterisierung einer Vielzahl kleiner Moleküle in einem *Screening* zum Auffinden neuer Inhibitoren beitragen

In dieser Arbeit wurde daher die Möglichkeit untersucht, auf Basis des etablierten colorimetrischen Assays, Inhibitoren für hTgs1 zu finden. Die durchgeführten Experimente zeigten, dass der Assay zur Beantwortung dieser Fragestellung durchaus geeignet ist und (-)-Epigallocatechin konnte als hTgs1-Inhibitor identifiziert werden.

Trotz der hier beschriebenen Möglichkeiten den etablierten Assay einzusetzen, war es in dieser Arbeit nicht möglich diese Methode für das eigentliche Ziel, die Detektion promiskuitiver Enzym-Varianten zu nutzen. Eine solche Variante wurde aber dringend benötigt, um den enzymatischen Transfer reaktiver Gruppen auf die mRNA-Kappe effizient durchführen zu können und diese so für die Markierung mittels Click-Reaktionen zugänglich zu machen. Um entsprechende Enzymaktivitäten nachweisen zu können, wurde daher eine alternative Methode benötigt.

3.1.2 Chromatographischer Nachweis der Trimethylguanosinsynthaseaktivität

Als weitere Möglichkeit zur Charakterisierung von Trimethylguanosinsynthasen wurde entsprechend der Vorschrift von Monecke *et al.* eine Analyse der jeweiligen Biokonversionen

mittels RP-HPLC etabliert.^[227] Die einzelnen Bestandteile der Proben wurden mittels einer C₁₈-Säule und eines Acetonitril-Gradienten entsprechend ihrer Hydrophobizität getrennt. Die Detektion erfolgte durch *on-line*-Messung der Absorption bei 260 nm und 300 nm. Diese Wellenlängen wurden gewählt, da bei 260 nm das Absorptionsmaximum von Nukleotiden liegt, so dass neben dem Substrat m⁷GTP/m⁷GpppA auch das jeweilige Cosubstrat aufgrund des enthaltenen Adenosins detektiert werden konnte. Im Gegensatz zu Adenosin weisen Kappenstrukturen, wie m⁷G, m^{2,7}G und m^{2,2,7}G, ein weiteres Absorptionsmaximum bei etwa 300 nm auf.^[284] Bei dieser Wellenlänge wurden somit nur Moleküle detektiert, die eine solche Verbindung enthielten, wodurch die Zuordnung neu entstandener Produkte erleichtert wurde. Mittels RP-HPLC wurde zunächst erfolgreich sowohl die Trimethylierung der Kappe durch hTgs1 als auch die Dimethylierung mit GlaTgs2 in Gegenwart des natürlichen Cosubstrats nachgewiesen. Weiterhin konnte die Methode erfolgreich zum Nachweis promiskuitiver Aktivität der Enzyme gegenüber AdoMet-Analoga sowie zur Charakterisierung des Substratspektrums von Enzym-Varianten adaptiert werden. Hierfür wurden die jeweils zu charakterisierenden Biokonversionen vor und nach der Inkubation bei 37 °C sowie entsprechende Negativkontrollen mittels der etablierten RP-HPLC-Methode analysiert. Die Retentionszeiten und UV-Spektren neu gebildeter Produkte wurden mit den entsprechenden Parametern der hypermethylierten Kappe m^{2,7}GpppA verglichen. Aus dem UV-Spektrum konnte abgeleitet werden, ob das jeweilige Produkt ein methyliertes Guanosin enthielt und somit die entsprechend modifizierte Kappenstruktur darstellen könnte. Durch Vergleich der Retentionszeiten konnten erste Aussagen über die Hydrophobizität erhalten werden. Wie erwartet, wurde festgestellt, dass die Retentionszeiten modifizierter Kappen-Analoga proportional zur Länge der jeweils übertragenen Alkylgruppe waren. So konnte für m^{2,7}GpppA **10** eine Retentionszeit von 9,5 Minuten beobachtet werden, für N²-Allyl-m⁷GpppA **14** lag dieser Wert bereits bei 10,6 Minuten und die penteninylierte Struktur N²-(Pent-2-en-4-ynyl)-m⁷GpppA **15** (t_R=11,3 min) sowie die benzylierte Kappe N²-Benzyl-m⁷GpppA **19** (t_R=12,6 min) eluierten bei noch höheren Acetonitril-Anteilen. Mittels RP-HPLC konnten Aussagen sowohl über die Enzymaktivität gegenüber natürlichen Substraten als auch die Promiskuität der Trimethylguanosinsynthasen erhalten werden. Weiterhin wurden durch Bestimmung der Produktintegrale entsprechend durchgeführter Biokonversionen Aussagen über k_{cat}, K_M, TTN und die Thermostabilität der Enzyme erhalten. Die HPLC-Analyse bildete daher die Grundlage, verschiedene Enzyme charakterisieren zu können und stellte den Ausgangspunkt zur Etablierung einer chemo-enzymatischen Strategie dar. Der einzige Nachteil dieser Methode war, dass aufgrund der Länge der durchgeführten

Läufe (ca. 30 min) sowie der Notwendigkeit die Enzyme zunächst reinigen zu müssen, diese Methode nicht als HTS genutzt werden konnte. Allerdings zeichnete sich die Analyse mittels RP-HPLC auch dadurch aus, dass, anders als im colorimetrischen Assay, direkt das gewünschte Produkt, also die modifizierte Kappe nachgewiesen werden konnte. Um die Anwesenheit der Zielverbindungen in den jeweiligen Biokonversionen zu verifizieren, wurde ein Protokoll zur Analyse mittels MALDI-TOF-MS etabliert. Es zeigte sich, dass bei Verwendung der für Oligonukleotide gebräuchlichen Matrix 3-HPA^[285,286] keine der erwarteten Massen erfolgreich detektiert werden konnte. Die massenspektrometrische Charakterisierung der Kappenstruktur wurde daher optimiert und erfolgreich durchgeführt, wenn die Proben mit HCCA und NH₄F kokristallisiert wurden.

Durch diese Analysenmethoden konnten neben der Übertragung des Allylrests auch die Modifikation der Kappe mit der Penteniny- (Masterarbeit Josephin Holstein^[235]) sowie der Benzylgruppe nachgewiesen werden. Um diese modifizierten Kappenstrukturen abschließend zu charakterisieren, müssten Kristallstruktur- oder ¹H-NMR-Analysen durchgeführt werden, auch um abschließend die Regiospezifität des enzymatischen Transfers zu bestätigen. Allerdings sind die Mengen an Edukt (7,9 µg/10 µL), die in den Biokonversionen eingesetzt werden zu gering, um diese Methoden durchführen zu können. Eine alternative Methode könnten EI-Messungen darstellen.

3.2 Homologie-Modell – Grundlage zur Verbesserung promiskuitiver Enzymaktivität von GlcTgs2

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Wildtyp-Trimethylguanosinsynthase des Darmparasiten *Giardia lamblia* eine geringe Seitenaktivität gegenüber dem AdoMet-Analogon AdoPropen **1** aufweist. In Gegenwart von 2,5 mol% des Enzyms konnten so 4 % des alkenylierten Kappen-Analogons N²-Allyl-m⁷GpppA **14** erhalten werden. Die Enzymaktivität war allerdings nicht ausreichend, um eine quantitative Markierung eukaryotischer mRNA zur Detektion *in vivo* oder zur Isolierung aus Total-RNA zu erreichen. Dennoch stellte diese Promiskuität eine vielversprechende Grundlage dar, um ausreichende Aktivität erreichen zu können (zusammengefasst durch Nobeli *et al.*^[287]). Hierzu sollten Varianten des Enzyms generiert und hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber dem AdoMet-Analogon **1** untersucht werden. Es musste zunächst entschieden werden, ob diese Varianten durch Zufallsmutagenese oder auf Basis von rationalem Design erzeugt werden sollten. Bei Durchführung einer Zufallsmutagenese, z. B. mittels ep-PCR, wäre es theoretisch möglich, jede Position des Enzyms einzeln zu mutieren. Dieses Vorgehen ist besonders sinnvoll, wenn,

wie auch in diesem Fall, keine bestimmte Aminosäure auf der Grundlage einer Kristallstruktur oder durch Sequenzvergleiche als vorteilhaft für eine Substitution identifiziert werden kann. Die Durchführung einer Zufallsmutagenese hat aber zur Folge, dass eine Vielzahl der erhaltenen Klone hinsichtlich der gewünschten Eigenschaften getestet werden muss. Dabei gilt generell, dass die dreifache Anzahl möglicher zu erwartender Varianten *gescreent* werden muss. Hierdurch wird sichergestellt, dass 95 % aller möglichen Varianten charakterisiert werden.^[288] Das Gen von GlaTgs2 codiert für 258 Aminosäuren. Unter der Annahme, dass pro Gen nur ein Nukleotid mutiert wird und an jeder Position des Enzyms im Schnitt fünf unterschiedliche Aminosäuren durch ep-PCR zugänglich sind, würden 1 290 Varianten erwartet werden. Dies würde bedeuten, dass 3 870 Varianten charakterisiert werden müssten. Dies macht es notwendig eine Methode zur Selektion oder zum Hochdurchsatz-*Screening* zu nutzen. Beides war, wie auch in Kapitel 3.1 zusammengefasst wurde, für GlaTgs2 nicht möglich. Mit den etablierten Methoden zum Nachweis promiskuitiver Enzymaktivität (RP-HPLC und MALDI-TOF-MS) konnte nur eine deutlich geringere Anzahl an Varianten charakterisiert werden (ca. 40 Varianten/Tag limitiert durch RP-HPLC).

Um die Möglichkeit zu haben, eine Verbesserung der Promiskuität gezielt durch Erzeugung einer kleineren Anzahl von Varianten zu erreichen, war es nötig bestimmte Positionen auf der Basis rationalen Designs zu wählen und durch ortsgerichteter Mutagenese zu variieren. Die Auswahl geeigneter Positionen kann unter anderem auf Grundlage einer Kristallstruktur des Proteins oder durch Sequenzvergleich mit möglichst ähnlichen, promiskuitiven Enzymen erfolgen. Aufgrund fehlender Kristallstruktur und promiskuitiver Trimethylguanosinsynthasen konnten beide Strategien für GlaTgs2 nicht verfolgt werden. Um dennoch Informationen über die räumliche Struktur des Enzyms zu erhalten und damit eine Aussage, welche Aminosäuren den Zutritt der voluminösen AdoMet-Analoga einschränken könnten, wurde mittels SWISS-MODEL^[253–255] ein Homologie-Modell auf Basis der humanen Trimethylguanosinsynthase (PDB: 3GDH) für GlaTgs2 erstellt.

Auf Grundlage des Homologie-Modells wurden Aminosäuren identifiziert, welche sich in einem Radius von weniger als 8 Å bezogen auf das Schwefelatom des mit hTgs1 cokristallisierten AdoHcy **13** befinden. Diese konnten möglicherweise die Aufnahme sterisch anspruchsvoller AdoMet-Analoga einschränken und ihre Substitution mit der weniger voluminösen Aminosäure Alanin die Möglichkeiten zur Umsetzungen dieser Analoga verbessern. Ähnliche Strategien wurden bereits erfolgreich genutzt, um eine Verbesserung der

Aktivität von DNA- und Proteinmethyltransferasen gegenüber verschiedener AdoMet-Analoga zu erreichen.^[196,197,256]

Auf Basis dieses Vorgehens wurden die Aminosäuren V34, T70, C72 für eine Substitution mit Alanin gewählt, nachdem Positionen, die durch Literatur- oder Sequenzvergleiche als essentiell für die Katalyse einzustufen waren, von der Mutagenese ausgeschlossen worden waren.

Durch Substitution der Aminosäure Valin an Position 34 wurde eine Variante (GlaTgs2-V34A) generiert, die sowohl hinsichtlich des Produktionslevels, der Substrataffinität K_M ($57 \pm 29 \mu\text{M}$ vs. $151 \pm 19 \mu\text{M}$), als auch der Wechselzahl k_{cat} ($0,18 \pm 0,08 \text{ min}^{-1}$ vs. $0,09 \pm 0,08 \text{ min}^{-1}$) und katalytischen Produktivität (10 ± 2 vs. 3 ± 2) verbesserte Eigenschaften gegenüber dem AdoMet-Analogon AdoPropen **1** im Vergleich zum Wildtyp-Enzym aufwies.

Mit dieser Variante V34A war es möglich, einen nahezu quantitativen Umsatz von $1 \text{ mM m}^7\text{GpppA}$ **9** mit AdoPropen **1** zu N^2 -Allyl- m^7GpppA **14** (bis zu 92 %) zu erreichen. Auch gegenüber des AdoMet-Analogons AdoEnYn **4** zeigte diese Variante ausreichende Aktivität (ca. 25 %, Masterarbeit Josephin Holstein^[235]), so dass im Folgenden chemische Markierungen der enzymatisch modifizierten RNA-Kappe etabliert werden konnten (Kapitel 3.3).

Diese effiziente und spezifische enzymatische Modifizierung der mRNA-Kappe war Ziel des rationalen Designs gewesen und die Generierung einer entsprechenden Variante hierfür zeigte, dass auf Basis des Homologie-Modells eine zutreffende Vorhersage gemacht werden konnte. Auch für weitere, potentiell notwendige Verbesserung des Enzyms könnte das Homologie-Modell daher eine Grundlage zur Auswahl geeigneter Positionen darstellen. Hierbei wird vor allem die Verbesserung der Substrataffinität der Variante gegenüber dem Kappen-Analogon **9** im Vordergrund stehen. In dieser Arbeit wurde für die Variante ein K_M -Wert von $150 \pm 57 \mu\text{M}$ für m^7GpppA **9** bestimmt, welcher in der Literatur für das Wildtyp-Enzym mit $7 \mu\text{M}$ angegeben wird.^[229] Dies verdeutlicht, dass die eingeführte Mutation sich nachteilig auf die Affinität gegenüber der Kappe auswirkt. Für die mögliche Etablierung der Methode *in vivo* ist aber eine deutliche Verbesserung dieser Affinität notwendig. Dies ergibt sich daraus, dass auch bei geringen zellulären mRNA-Konzentrationen (fM- μM , je nach Anwendung, berechnet aus der durchschnittlichen Anzahl mRNA-Moleküle/Zelle) eine quantitative enzymatische Modifizierung erfolgen muss. Der Vergleich verschiedener Kappen-bindender Proteine und Enzyme zeigt, dass häufig zwei Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten mit dem Guanin der Kappe einen Basen-Aminosäuren-Stapel bilden, wodurch π -Stacking-Interaktionen ausgebildet werden.^[226,289] Es ist auffällig, dass

Enzyme und Proteine, welche diesen Aufbau zeigen (eIF4E: $K_D=1,2\text{ }\mu\text{M}$,^[103] CBP: $K_A=13\text{ nM}$,^[290] VP39: $K_M=200\text{ nM}$ für $m^7\text{GpppG(A)}_2$ ^[291]), eine höhere Substrataffinität als die Trimethylguanosinsynthasen aufweisen (je nach Substrat, $30\text{--}134\text{ }\mu\text{M}$ für hTgs1,^[211,225] wobei K_M für $m^7\text{GpppA}$ bei $105\text{ }\mu\text{M}$ ^[203] liegt bzw. $7\text{--}65\text{ }\mu\text{M}$ für GlaTgs2-WT^[257]). Sowohl hTgs1 als auch GlaTgs2 besitzen anstelle einer zweiten aromatischen Aminosäure an entsprechender Position einen Serinrest und für hTgs1 wurde dieser bereits als Kappen-interagierend identifiziert.^[227] Aus dem Homologie-Modell wird deutlich, dass diese Position in GlaTgs2 die gleiche Funktion aufweisen könnte, da sie im katalytischen Zentrum und direkt unterhalb des Guanosins liegt. Gegenüber befindet sich die essentielle Aminosäure W143,^[257] so dass eine Substitution des Serins an Position 38 in GlaTgs2-V34A, beispielsweise durch Tyrosin (Abbildung 3.1), ebenfalls zu ausgedehnten π -Stacking-Interaktionen mit der mRNA-Kappe und damit zu einer verbesserten Substrataffinität führen könnte.

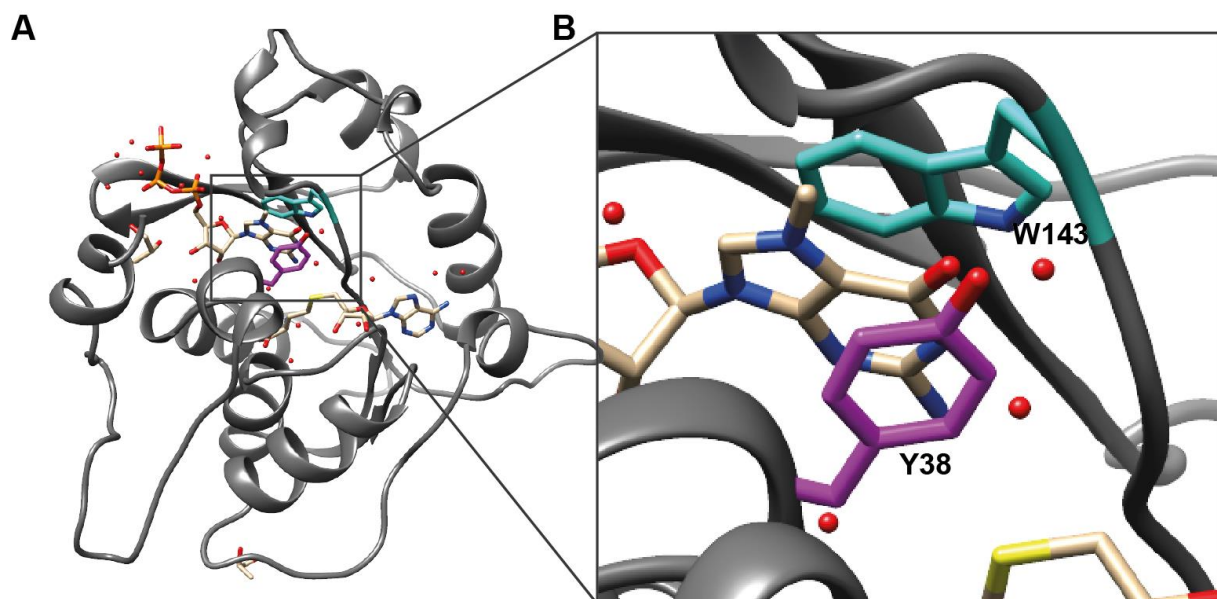


Abbildung 3.1 **Modell der Variante GlaTgs2-V34AS38Y, generiert mittels SWISS-MODEL auf Basis der Kristallstruktur von hTgs1.** Dargestellt ist die mögliche Struktur der Variante GlaTgs2-V34AS38Y, die eine Bindung der Kappe zwischen zwei aromatische Reste ermöglichen würde und so eine verbesserte Substrataffinität gegenüber dieser Struktur aufweisen könnte. **A)** Modell von GlaTgs2-V34AS38Y in Gegenwart der mit hTgs1 kokristallisierten Moleküle $m^7\text{GTP}$ und AdoHcy **13**. **B)** Ausschnitt des Modells, welche das aktive Zentrum mit dem kokristallisiertem $m^7\text{GTP}$ im Detail darstellt. Die nativ vorkommende, potentiell für *Stacking*-Interaktionen mit Guanin benötigte Aminosäure W143,^[257] ist als Stäbchenmodell (türkis) dargestellt. Die Position 38, an welcher im nativen Enzym Serin vorliegt, könnte beispielsweise durch Tyrosin ersetzt werden (lila), um so auch hier *Stacking*-Interaktionen zu ermöglichen.

Ob aber tatsächlich durch diese einzelne Substitution die Affinität der Variante um den mindestens notwendigen Faktor 10^3 gesteigert werden kann, ist zweifelhaft. Darüber hinaus

kann der Einfluss einer solchen Substitution auf die Aktivität der Variante gegenüber AdoPropen **1** nicht vorhergesagt werden. Denn trotz der hier erzielten Erfolge bei der rationalen Auswahl der zu substituierender Position V34, können bei einem solchen Vorgehen auch immer andere nicht- oder nur schwer-kalkulierbare Effekte auftreten. Hierzu zählen unter anderem die Beeinträchtigung der Faltung des Enzyms oder der Form des katalytischen Zentrums.

Es zeigte sich auch in dieser Arbeit, dass nicht alle vorhergesagten Substitutionen die Generierung von Varianten mit der gewünschten, hohen Aktivität gegenüber AdoPropen **1** ermöglicht hatten. Die ebenfalls charakterisierten Varianten GlaTgs2-T70A sowie GlaTgs2-C72A, wiesen weder gegenüber des Analogons **1** noch gegenüber dem nativen Cosubstrat AdoMet **12** Aktivität auf. Es muss somit angenommen werden, dass diese Reste doch entscheidende Funktionen bei der Katalyse haben, wofür auch ihre Position innerhalb des AdoMet-Bindemotivs^[229] sprechen würde. Eine andere Erklärung für die fehlende Aktivität könnte sein, dass durch fehlende Wechselwirkungen eine Veränderung der räumlichen Struktur des aktiven Zentrums auftrat, so dass die, für die Katalyse notwendigen, Reste nicht mehr die richtige räumliche Anordnung aufwiesen. Dies unterstreicht, dass nicht alle Effekte anhand des Homologie-Modells und durch Sequenzvergleiche bzw. durch Vergleich mit Literaturdaten eindeutig vorhersagbar sind. Vielmehr können mittels dieser Methoden immer nur Anhaltspunkte für mögliche, vielversprechende Substitutionen erhalten werden.

Auch Beispiele aus der Literatur zeigen, dass Varianten eine andere Aktivität aufweisen können, als aufgrund der Substitution vielleicht erwartet wurde. So führte die Substitution von W143 in GlaTgs2 durch eine andere aromatische Aminosäure zu einer Reduzierung der Aktivität um 98,6 % im Vergleich zum Wildtyp-Enzym.^[257] Auch hängt die Aktivität der Variante nicht nur von der Position sondern auch von der Art der Substitution ab. Für die Variante GlaTgs2-D76A konnte eine Reduzierung der Aktivität um 97,5 % im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Die Substitution von D76 durch Glutaminsäure führte hingegen nur zu einer Reduzierung der Aktivität um 67 %.^[257] Dies zeigt auch, dass der vorgeschlagene Austausch der Position S38 gegen eine aromatische Aminosäure, durchaus erfolgreich sein könnte, obwohl die Substitution von S38 gegen Alanin bereits zu einer Reduzierung der Aktivität von GlaTgs2-WT mit den natürlichen Substraten um 80 % geführt hatte^[257].

Final kann festgestellt werden, dass jede generierte Variante *in vitro* hinsichtlich der gewünschten Eigenschaften charakterisiert werden muss, da durch Homologie-Modell und Sequenzvergleiche nur Anhaltspunkte erhalten werden können, welche Aminosäuresubstitutionen interessant sein könnten.

Dennoch könnte dieses Vorgehen die Grundlage bilden, um einerseits die Substrataffinität gegenüber der Kappe zu verbessern. Andererseits könnten durch dieses rationale Design aber auch Positionen identifiziert werden, deren Substitutionen die Promiskuität gegenüber anderen AdoMet-Analoga potentiell verbessern könnte. Entsprechende Varianten könnten genutzt werden, um weitere Click-Reaktionen neben Photoclick, Thiol-En-Click-Reaktion und CuAAC für eine Markierung der mRNA einsetzen zu können. Wichtige Hinweise zur Verbesserung solcher promiskuitiven Eigenschaften können dazu auch aus der Charakterisierung des Substratspektrums der Variante GlaTgs2-V34A erhalten werden (Kapitel 2.5.5).

Es konnte festgestellt werden, dass die Transferrate durch GlaTgs2-V34A invers proportional zur Länge der zu übertragenden Alkylgruppe ist. Diese Beobachtung scheint logisch und selbsterklärend, ist aber keinesfalls selbstverständlich. So zeigt ein Beispiel aus der Literatur, dass durchaus auch ein invers linearer Zusammenhang zwischen Länge der Alkylkette und Enzymaktivität beobachtet werden kann.^[196] Die Variante Y1154A der Proteinmethyltransferase G9a zeigt eine Aktivität von 10-20 % mit AdoMet **12** als Cosubstrat. Für das AdoMet-Analogon AdoEnYn **4** konnte bereits eine Aktivität von 40-60 % nachgewiesen werden, die durch Verlängerung der Kohlenstoffkette auf sechs Atome noch gesteigert wurde (Hey-SAM, 80-100 %).^[196] Für das Enzym GlaTgs2-V34A könnte man aus den in dieser Arbeit erhaltenen Daten schließen, dass die Seitenkette des Cosubstrats in das Innere des Enzyms weist und die Anzahl sterischer Wechselwirkungen mit den Aminosäuren von AdoMet **12** über AdoPropen **1** zu AdoEnYn **4** zunimmt. Die Nutzung von AdoMet-Analoga, welche eine lineare Alkylkette von mehr als fünf Kohlenstoffatomen aufweisen scheint daher nicht sinnvoll.

Auffällig war darüber hinaus, dass die Benzyl- aber nicht die 2-Methylpropenylgruppe enzymatisch übertragen wird. Für die Trimethylguanosinsynthase hTgs1 konnte bereits ein ähnliches Phänomen beobachtet werden.^[211] Hierbei wurden *N*7-ethyliertes (Ethyl⁷GpppA) bzw. benzyliertes (Benzyl⁷GpppA) GpppA als Substrat eingesetzt. Dabei wurde für Benzyl⁷GpppA eine höhere Substrataffinität und Wechselzahl beobachtet als für Ethyl⁷GpppA, obwohl sich letzteres nur durch eine Methylengruppe vom natürlichen Substrat unterscheidet. Als Grund wurde hier genannt, dass die Benzylgruppe weniger sterische Hinderung zu den umgebenden Aminosäuren aufweist.^[211] Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass GlaTgs2-V34A oder eine Variante hiervon auch Transfer anderer planarer, aromatischer Systeme katalysieren könnte. Neben der Möglichkeit zur Etablierung von CuAAC, Thiol-En-Click- und Photoclick-Reaktionen, die mit alkylfunktionalisierter Kappe

durchgeführt werden können, besteht daher eventuell auch die Möglichkeit das planare Tetrazin-System enzymatisch zu übertragen. Eine entsprechend modifizierte Kappe könnte dann in einer inversen Diels-Alder-Reaktion mit einem Norbornen-Derivat umgesetzt werden. Dieser Reaktionstypus wurde bereits als kompatibel mit RNA beschrieben.^[205]

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die hier generierte Variante GlaTgs2-V34A eine Vielzahl von Möglichkeiten im Hinblick auf die Etablierung chemo-enzymatischer Strategien zur Markierung eukaryotischer mRNA eröffnet. Auf Basis dieser Variante sowie des Homologie-Modells könnten so in weiterführenden Arbeiten neue Varianten erzeugt werden, um die Substrataffinität und gegebenenfalls auch das Substratspektrum zu erweitern. Darüber hinaus konnte durch die Variante ein nahezu quantitativer Umsatz von 1 mM m⁷GpppA zu N²-Allyl-m⁷GpppA **14** sowie ein ausreichender Umsatz zu N²-(Pent-2-en-4-ynyl)-m⁷GpppA **15** unter Verwendung entsprechender AdoMet-Analoga erreicht werden. Diese Variante bildete somit die Grundlage, eine chemische Markierung der Kappenstruktur zu erreichen (Kapitel 3.3)

3.3 Chemo-enzymatische Strategien zur Markierung der mRNA-Kappe

Mit der Variante GlaTgs2-V34A wurde in dieser Arbeit ein Enzym generiert, das das AdoMet-Analogon AdoPropen **1** effizient umsetzt und das es ermöglicht das modifizierte Kappen-Analogon N²-Allyl-m⁷GpppA **14** in Ausbeuten von bis zu 92 % zu erhalten (Kapitel 2.5.3). Auch gegenüber dem AdoMet-Analogon AdoEnYn **4** zeigt diese Variante eine verbesserte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Enzym (Kapitel 2.5.5). Die enzymatische Modifizierung der mRNA-Kappe konnte so mittels Allyl- oder Penteninygruppe erfolgen, wodurch sie unter anderem für die chemische Markierung durch Thiol-En-Click- und Photoclick-Reaktionen sowie CuAAC zugänglich wurde. Diese entsprechenden Möglichkeiten in Bezug auf die Markierung der eukaryotischen Kappenstruktur wurden daraufhin in dieser Arbeit untersucht.

Die alkenylierte Kappe N²-Allyl-m⁷GpppA **14** konnte erfolgreich in einer Thiol-En-Click-Reaktion mit Biotin verknüpft werden. Eine chemo-enzymatische Strategie auf Grundlage dieser Click-Reaktion wäre zwar nicht für die Anwendung *in vivo* geeignet, könnte aber unter Umständen für die Etablierung einer neuen mRNA-Isolierungsstrategie genutzt werden. Es wäre beispielsweise denkbar, eukaryotische mRNA in Lysat oder in Total-RNA mittels GlaTgs2-V34A und AdoPropen **1** zu allylieren, in einer Thiol-En-Click-Reaktion mit Biotin zu verknüpfen und so anschließend auf Streptavidin-*Beads* immobilisieren zu können. Die hier durchgeführten Versuche zeigten, dass die Thiol-En-Click-Reaktion prinzipiell geeignet

ist, um das Kappen-Analogon zu markieren. Allerdings kann auf Grundlage der Thiol-En-Click-Reaktion wahrscheinlich keine Isolierungsstrategie etabliert werden. Dies hatte verschiedene Gründe. Zum einen zeigten RP-HPLC-Analysen, dass nur etwa 30 % des allylierten Edukts N^2 -Allyl- m^7 GpppA mittels der Thiol-En-Click-Reaktion markiert wurden. Aufgrund dieser geringen Ausbeute wäre eine effiziente Anreicherung aller in einer Probe vorliegenden mRNAs nicht zu gewährleisten. Durch Variation verschiedener Parameter, wie Inkubationsdauer, Biotinthiol-Überschuss und pH-Wert der Reaktion, konnte keine signifikante Verbesserung erreicht werden. Ein Grund für diese geringe Ausbeute war möglicherweise auch, dass Thiol-En-Click-Reaktionen idealerweise in Gegenwart hoher Alkenkonzentrationen (mindestens 100 mM) durchzuführen sind (Gespräch mit Felix Wojcik).

Zum anderen zeigte sich aber auch, dass das komplexe Biomolekül RNA unspezifisch und somit unabhängig von der enzymatischen Modifizierung biotinyliert wird. Für eine potentielle Anwendung würde dies bedeuten, dass ein Großteil der in der Probe enthaltenen RNA-Spezies immobilisiert und keine spezifische Isolierung eukaryotischer mRNA erreicht würde. Durch Variation des durchgeführten Protokolls konnten keine Verbesserungen erzielt werden. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass eine chemo-enzymatische Modifizierung des Kappen-Analogons mittels Allylierung und anschließender Markierung durch eine Thiol-En-Click-Reaktion möglich und für dieses minimale Substrat spezifisch ist, aber eine Adaption dieser Methode für praktische Anwendungen nicht möglich war.

Neben der Möglichkeit, die Allylgruppe durch eine Thioetherbindung mit einem Reportermolekül zu verknüpfen, bestand eine weitere Option darin, diese reaktive Gruppe in einer Photoclick-Reaktion mit einem photoaktivierten Tetrazol zum Pyrazolin umzusetzen. Die Etablierung einer solchen Strategie war besonders interessant, da die Photoclick-Reaktion^[154,176] neben der SPAAC^[157] die bisher einzige beschriebene, erfolgreiche Click-Reaktion zur Fluoreszenzmarkierung von Biomolekülen im Inneren lebender, eukaryotischer Zellen darstellt. Die Vorteile dieser Cycloaddition, sind dabei die Bildung eines fluoreszierenden Produkts aus nicht fluoreszierenden Edukten, die Nutzung von Licht als Katalysator und die Bioorthogonalität der Reaktion. Die passive Aufnahme der Tetrazole durch die Zellen ist ein weiterer Vorteil für eine Durchführung der Reaktion *in vivo*.^[154,176]

Bisher wurden in der Photoclick-Reaktion C- und O-allylierte Proteine umgesetzt.^[154,176] Die von Prof. Herrmann durchgeführten KS-DFT-Kalkulationen zeigten aber, dass aufgrund der HOMO/LUMO-Abstände auch eine Cycloaddition des hier verwendeten Substrats N^2 -Allyl- m^7 G mit verschiedenen Tetrazolen zu erwarten war.

Diese Vorhersagen konnten experimentell bestätigt und die Bildung fluoreszierender Produkte aus *N*²-Allyl-*m*⁷GpppA **14** in Gegenwart verschiedener, photoaktivierter Tetrazole beobachtet werden. Die Bildung eines fluoreszierenden Pyrazolins wurde nur mit der enzymatisch modifizierten Kappe beobachtet, was die Spezifität dieses chemo-enzymatischen Ansatzes zeigt. Allerdings muss diese Spezifität in zukünftigen Arbeiten auch in Gegenwart des komplexen Biomoleküls RNA nachgewiesen werden. Die bisherigen Daten deuten aber darauf hin, dass eine Allylierung eukaryotischer mRNA gefolgt von Beleuchtung der Zellen in Gegenwart von Tetrazol eine zeitlich und räumlich steuerbare Fluoreszenzmarkierung eukaryotischer mRNA ermöglichen könnte. Die enzymatische Modifizierung der mRNA-Kappe und ihre anschließende Fluoreszenzmarkierung durch eine Photoclick-Reaktion stellt somit einen Ausgangspunkt für die Etablierung einer neuen Visualisierungsstrategie von mRNA *in vivo* dar. Hierfür wäre es vorstellbar das benötigte Cosubstrat AdoPropen **1**, entsprechend des Protokolls von Wang *et al.*, *in vivo* zu generieren und dadurch innerhalb der Zelle für die Variante GlaTgs2-V34A zugänglich zu machen.^[198] Um durch die chemo-enzymatische Strategie eine Markierung spezifischer mRNAs *in vivo* zu erreichen, wäre eine Fusion des mRNA-modifizierenden Enzyms GlaTgs2-V34A mit dem RNA-bindenden Protein Pumilio denkbar. Es müsste dabei gewährleistet sein, dass die Allylierung der Kappe nur erfolgt, wenn dieses Fusionskonstrukt an die entsprechende Ziel-RNA gebunden hat. Die Möglichkeit zur Modifizierung spezifischer mRNAs durch ein solches genetisch-codierbares Fusionskonstrukt wird derzeit von Dénes Haase im Rahmen seiner Masterarbeit untersucht. Theoretisch könnte man diese chemo-enzymatische Strategie aus enzymatischer Allylierung und anschließender Photoclick-Reaktion daher nutzen, um spezifische mRNAs zunächst enzymatisch *in vivo* zu modifizieren. Nach einer Inkubation der Zellen in Gegenwart von Tetrazol könnten diese mRNAs dann durch kurze Bestrahlung fluoreszenzmarkiert und visualisiert werden. Neben den bereits erwähnten, notwendigen Voraussetzungen hierfür, welche die Generierung einer sequenzspezifischen Variante und die Synthese von AdoPropen **1** *in vivo* umfassen, sind für die Etablierung einer solchen Strategie in weiterführenden Arbeiten allerdings noch einige weitere Optimierungen notwendig. Anders als die Variante der G9a-Methyltransferase,^[196,198] die durch Wang *et al.* für die *in vivo* Markierungen von Proteinen mit Hey-SAM genutzt wurde, zeigt die hier beschriebene Variante V34A eine hohe Aktivität gegenüber dem natürlichen Cosubstrat AdoMet **12**. Dabei ist der TTN-Wert für das natürliche Substrat etwa zehnfach höher als für AdoPropen **1** und aus einem Vergleich mit Literatur-bekannten Daten (6 µM, GlaTgs2-WT)^[229] kann abgeleitet werden, dass die Substrataffinität gegenüber AdoPropen **1** etwa 26x geringer ist. Man kann somit davon

ausgehen, dass in Gegenwart beider Cosubstrate, wie es *in vivo* der Fall wäre, eine Methylierung anstelle einer Allylierung der mRNA erfolgen würde. Es ist daher dringend notwendig, möglicherweise auf Basis von GlaTgs2-V34A, weitere Varianten zu erzeugen, die sich durch eine reduzierte Aktivität gegenüber dem natürlichen Cosubstrat **12** auszeichnen. Potentielle Aminosäuresubstitutionen, welche zu Varianten mit diesen Eigenschaften führen könnten, sollten bereits durch rationales Design auf Grundlage bioinformatischer Analysen (in Kooperation mit der Gruppe von Prof. Rarey, Universität Hamburg) vorhergesagt werden. Allerdings war die Beantwortung dieser Fragestellung bisher so nicht möglich. Eventuell könnte der, in dieser Arbeit etablierte, colorimetrische Assay (Kapitel 2.3.2.1.3) genutzt werden, um dieses Problem zu lösen. Dieser wies zur Charakterisierung promiskuitiver Aktivität den entscheidenden Nachteil auf, dass eine Konkurrenzreaktion mit zellulärem AdoMet **12** auftreten und generiertes AdoHcy **13** so auch aus einer Hypermethylierung der Kappe durch die Trimethylguanosinsynthase hervorgehen konnte. Dies würde aber für die Untersuchung der AdoMet-Aktivität keinen Nachteil darstellen und der Assay könnte, wie in Kapitel 3.1 dargestellt, zur Detektion von Varianten mit geringer Aktivität gegenüber dem nativen Cosubstrat adaptiert werden. Ein weiteres Problem, das sich aus der Verwendung von GlaTgs2-V34A zur mRNA-Markierung *in vivo* ergibt, ist die geringe Substrataffinität gegenüber der Kappenstruktur. Dieser Nachteil zeigte sich auch schon in den *in vitro*-Versuchen, da in allen durchgeführten Click-Reaktionen (sowohl Photoclick-Reaktion, als auch CuAAC) Nachweisgrenzen von etwa 200 μM initialer m^7GpppA -Konzentration erhalten wurden. Dabei sollte es zumindest mittels der CuAAC theoretisch möglich sein, RNA in einer Konzentration von bis zu 14 μM zu detektieren.^[155] Diese Tatsache sowie die nachgewiesene, geringe Substrataffinität der Variante gegenüber m^7GpppA **9**, deuten darauf hin, dass in Gegenwart niedriger m^7GpppA -Konzentrationen der enzymatische Transfer der Alkylgruppe den limitierenden Faktor darstellt. Um in Gegenwart der geringen zellulären mRNA-Konzentrationen eine ausreichende enzymatische Modifizierung zu erreichen, müsste der K_{M} -Wert des Enzyms gegenüber der Kappe deutlich verbessert werden. Eine erste Verbesserung der Affinität könnte, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, durch die Substitution des Serins an Position 38 durch eine aromatische Aminosäure erreicht werden. Alternativ könnte man, um eine Variante mit verbesserter Substrataffinität zu erhalten, auch eine Zufallsmutagenese durchführen. Allerdings steht derzeit keine *Screening*-Methode zur Verfügung, die eine Detektion von Varianten mit hoher Affinität gegenüber der Kappe ermöglichen würde. Die Grundlage einer solchen Strategie, könnte die Etablierung einer Methode auf Basis des sogenannten Tryptophan-*Quenching* darstellen. Diese wird eigentlich zum Nachweis der

Bindung von eIF4E an m^7GTP eingesetzt.^[292] Hierbei nutzt man, dass sich die intrinsische Proteinfluoreszenz bei Bindung des Moleküls m^7GTP ändert.^[292] Um ein *Screening* auf Basis dieser Idee zu etablieren, müsste zunächst die Frage beantwortet werden, ob ein solches Phänomen auch in Gegenwart der Trimethylguanosinsynthasen zu beobachten ist, da diese nicht dauerhaft an die Kappe binden. Darüber hinaus müsste auch überprüft werden, ob die Abnahme der Fluoreszenzintensität ($\lambda_{Ex}=290\text{ nm}$, $\lambda_{Em}=350\text{ nm}$) bei Messung in Lysat überhaupt detektierbar wäre. Alternativ wäre es möglich, einen radioaktiven Assay zur Charakterisierung der Varianten einzusetzen. Hierzu könnten Lysate verschiedener Varianten in Gegenwart geringer Konzentrationen m^7GpppA/m^7GTP mit ^3H - oder ^{14}C -markiertem AdoMet inkubiert werden und der Transfer der Methylgruppe im Anschluss quantifiziert werden. Man könnte weiterhin versuchen, eine Art Fusionsprotein aus GlaTgs2-V34A und einem Fragment des CBC zu generieren. Für den CBC wird eine hohe Affinität zur mRNA-Kappe m^7GpppG von ca. 10 nM beschrieben.^[293] Diese soll auf einer weiteren *Stacking*-Interaktion des CBP20 mit dem ersten nicht-methylierten Guanotin des RNA-Transkripts beruhen.^[294] Eine Fusion des entsprechenden Bereichs mit dem Kappen-modifizierenden Enzym GlaTgs2-V34A könnte eine Verbesserung der Substrataffinität bewirken, wobei zunächst der Einfluss des CBP80 auf die Affinität des CBC genauer evaluiert werden müsste. Darüber hinaus muss auch die Frage gestellt werden, warum die rekombinant produzierten Enzyme hTgs1 und GlaTgs2 überhaupt eine solch geringe Substrataffinität aufweisen, da sie *in vivo* die Hypermethylierung der UsnRNAs, die in geringen Konzentrationen vorliegen, katalysieren. Es besteht natürlich die Möglichkeit, dass die Substrataffinität mit der Länge des RNA-Substrats zunimmt und die in Gegenwart kurzer Oligonukleotide bestimmten Werte, nicht die natürlichen Eigenschaften der Enzyme wiedergeben können. Dieses ist beispielsweise auch für VP39 beschrieben.^[291] Für dieses Protein wurde eine zunehmende Substrataffinität mit zunehmender Länge des Oligonukleotids beobachtet.^[291] Allerdings konnte die Affinität so nur um einen Faktor von etwa 10 verbessert werden. Auch wäre es möglich, dass *in vivo* andere Proteine oder Faktoren vorliegen, die die Affinität der Enzyme deutlich verbessern. Man könnte beispielsweise spekulieren und eventuell auch experimentell überprüfen, ob GlaTgs1^[229] einen solchen Effekt in Bezug auf GlaTgs2 aufweist. Unter Umständen könnte man zunächst *Pulldown*-Experimente durchführen, um eine mögliche Interaktion beider Proteine zu überprüfen und im Anschluss hieran dann gegebenenfalls testen, ob ein Komplex dieser Proteine eine höhere Substrataffinität aufweist als GlaTgs2 alleine. Einen Einfluss auf Affinität und Aktivität von hTgs1 könnten unter Umständen Interaktionen mit den Sm-Proteinen haben. Für hTgs1 müsste darüber hinaus überprüft werden, ob die, durch Benarroch

et al.^[211] bestimmte, geringe Substrataffinität in Zusammenhang mit der Verkürzung des Enzyms steht und das komplette, native Enzym ganz andere Parameter aufweist. Eventuell könnte man aus den so gewonnenen Erkenntnissen Ideen zur Verbesserung von GlaTgs2-V34A ableiten.

Sollte keine Variante generiert beziehungsweise detektiert werden können, die eine deutlich verbesserte Substrataffinität aufweist, würde ein weiterer Schritt notwendig. Dieser könnte beinhalten, andere mRNA-Methyltransferasen, die nachweislich oder potentiell eine bessere Affinität gegenüber der Kappe bzw. ihrem Substrat aufweisen, hinsichtlich promiskuitiver Aktivität zu charakterisieren und gegebenenfalls zu evolvieren. Die Trimethylguanosinsynthase des Mimivirus (MimiTgs) weist mit einem K_M von 5 μM für $m^7\text{GDP}$ ^[211] die beste Substrataffinität beschriebener Trimethylguanosinsynthasen auf. Im Vergleich hierzu konnte mit dem gleichen Substrat für hTgs1 ein K_M -Wert von 30 μM ,^[225] für GlaTgs2 von 65 μM ^[229] und für *S. pombe* Tgs von 570 μM ^[295] bestimmt werden.

Eine Alternative zu einer weiteren Evolvierung von GlaTgs2-V34A stellt auch die Verwendung von TbMT511 für die enzymatische Modifizierung der Kappe *in vivo* dar. Diese Methyltransferase wurde in *Trypanosoma brucei* nachgewiesen und zeichnet sich durch eine hohe Sequenzidentität (39 %) zu der 2'-O-Methyltransferase VP39 des *Vaccinia* Virus aus.^[296] *Knockdown*-Experimente zeigten, dass TbMT511 eine 2'-O-Methylierung des dritten und vierten Nukleotides (C_3 und U_4) einer SL RNA (*spliced leader* RNA) in Abhängigkeit von der *Cap* 2-Struktur katalysiert. Die 2'-O-Methylierung des zweiten Nukleotids und damit Generierung der durch TbMT511 benötigten Substratstruktur wird durch TbMT417 katalysiert.^[296] Arhin *et al.* beschrieben ebenfalls Enzyme aus *Trypanosoma brucei*, allerdings unter den Namen TbMT48 und TbMT57, die an der Bildung der *Cap* 4-Struktur beteiligt sind.^[297] Auch in dieser Veröffentlichung wurde die Ähnlichkeit mit VP39 betont, welches eine hohe Substrataffinität gegenüber der Kappenstruktur aufweist (200 nM).^[291] Hieraus könnte man schließen, dass unter Umständen auch die Methyltransferasen aus *Trypanosoma brucei* ähnlich hohe Substrataffinitäten besitzen und damit möglicherweise einen Ausgangspunkt zur Etablierung der chemo-enzymatischen Strategie darstellen. Es müsste allerdings sichergestellt werden, dass alle mRNAs *in vivo* über die *Cap* 2-Struktur verfügen, so dass TbMT417 und TbMT511 gleichermaßen *in vivo* exprimiert werden müssten.

Die Etablierung einer chemo-enzymatischen Strategie mit dem *Cap* 4-generierenden Enzym TbMT511 könnte auch vorteilhaft sein, um ein weiteres Problem zu umgehen, welches bei der Durchführung der enzymatischen Markierung des Biomoleküls mRNA *in vivo* mit GlaTgs2 möglicherweise auftritt. Die mRNA-Kappe stellt ein wichtiges Charakteristikum dieses

Biomoleküls dar und dient unter anderem als Exportsignal und zur Rekrutierung des Translationsinitiationsfaktors eIF4E. Es könnte sein, dass die Position N^2 der Kappe *in vivo* nicht zugänglich für eine Modifikation durch GlaTgs2 ist. In der Literatur sind verschiedene Mechanismen zur Regulierung der Bindung von eIF4E beschrieben (zusammengefasst durch Topisirovic *et al.*)^[32] und es könnte Möglichkeiten geben, die Bindung dieses Proteins *in vivo* zu blockieren und so den Zugang des Enzyms GlaTgs2-V34A zu gewährleisten. Aufgrund der Wichtigkeit der Translationsinitiation besteht hierbei aber die Gefahr, dass ein Eingriff in diese Prozesse einen Einfluss auf die Zellvitalität hat.

Darüber hinaus besteht die Gefahr, dass eine Modifizierung des exocyclischen Stickstoffatoms der Kappe *in vivo* den Transport der mRNA beeinflusst. So werden beispielsweise hypermethylierte snRNAs durch Snurportin erkannt und in den Nukleus transportiert.^[298] Es scheint aber eher unwahrscheinlich, dass dieses Protein auch die dimodifizierte Kappe binden würde (Gespräch mit Prof. Ficner, Universität Göttingen) und darüber hinaus die längere Allylkette eine Rekrutierung dieses Proteins erlauben würde. Allerdings können solche Vorgänge bisher auch nicht ausgeschlossen werden. Um hierüber experimentell erste Aussagen zu erhalten, könnten *Gelshifts* mit dem jeweiligen, radioaktiv markiertem Kappen-Analogon und rekombinant produzierten Snurportin durchgeführt werden. Eine abschließende Beantwortung dieser Fragestellung wird aber erst möglich sein, wenn eine Allylierung von mRNA *in vivo* möglich ist, da hier der Einfluss aller zellulärer Bestandteile auf Transportmechanismen gewährleistet ist. Sowohl die Probleme hinsichtlich der Zugänglichkeit des Substrats als auch hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung der Transportwege der Ziel-RNA sowie die derzeit beobachtete geringe Substrataffinität im enzymatischen Schritt, könnten durch die Etablierung einer chemo-enzymatischen Strategie mittels TbMT417/TbMT511 unter Umständen umgangen werden.

Neben einer Optimierung des enzymatischen Transfers müsste auch die chemische Modifizierung verbessert werden, um eine Visualisierung eukaryotischer mRNA *in vivo* zu erlauben. Mittels der Photoclick-Reaktion war es bereits möglich Proteine in mammalischen Zellen zu visualisieren.^[154] Song *et al.* beschrieben, dass eine zweifach stärkere Fluoreszenz in den Reaktionen als in den Kontrollen zu beobachten war.^[154] Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass in den beschriebenen Experimenten alle neu translatierten Proteine visualisiert wurden und dennoch nur eine Verdoppelung der Fluoreszenzintensität beobachtet wurde. Der in dieser Arbeit beschriebene Ansatz sollte im idealen Szenario zur Visualisierung spezifischer endogener mRNAs genutzt werden, so dass hier die Konzentration des Ziel-Moleküls sehr viel geringer sein wird, als es in den Experimenten von Song *et al.* der Fall

war. Es muss somit eine deutliche Verbesserung hinsichtlich der Sensitivität erfolgen, um ein ausreichendes Signal in Gegenwart geringerer Eduktkonzentrationen zu erhalten. Eine Möglichkeit wäre dazu, die Quantenausbeute des resultierenden Pyrazolins zu verbessern.

In der Literatur wurden 1,3,5-Triaryl-Pyrazoline als Fluorophore^[299,300] mit Quantenausbeuten von beispielsweise 0,6^[300] (bezogen auf Quinin Sulfat) beschrieben. Ein solches Molekül könnte man möglicherweise *in vivo* generieren, wenn man anstelle des Allyl- einen Styrolrest enzymatisch auf die Kappe transferiert. Ausgehend von den bisherigen Erkenntnissen über die Aktivität von GlaTgs2-V34A mit AdoBenzyl **3** könnte der enzymatische Transfer dieser Gruppe durchaus möglich sein. Eine chemische Umsetzung des Styrols in Gegenwart eines photoaktivierten Tetrazols zum 1,3,5-Triaryl-Pyrazolin würde unter Umständen zur Bildung des benötigten, stark fluoreszierenden Produkts führen (Abbildung 3.2).

Alternativ könnte man versuchen, die Rigidität der Tetrazole durch Änderung der Reste zu erhöhen und so die Quantenausbeute des Produkts unter Verwendung der allylierten Kappe als Dipolarophil zu erhöhen. Allerdings müsste für das Design neuer Tetrazole beachtet werden, dass sie selbst keine Fluoreszenz aufweisen und dass sie photoaktivierbar sind.

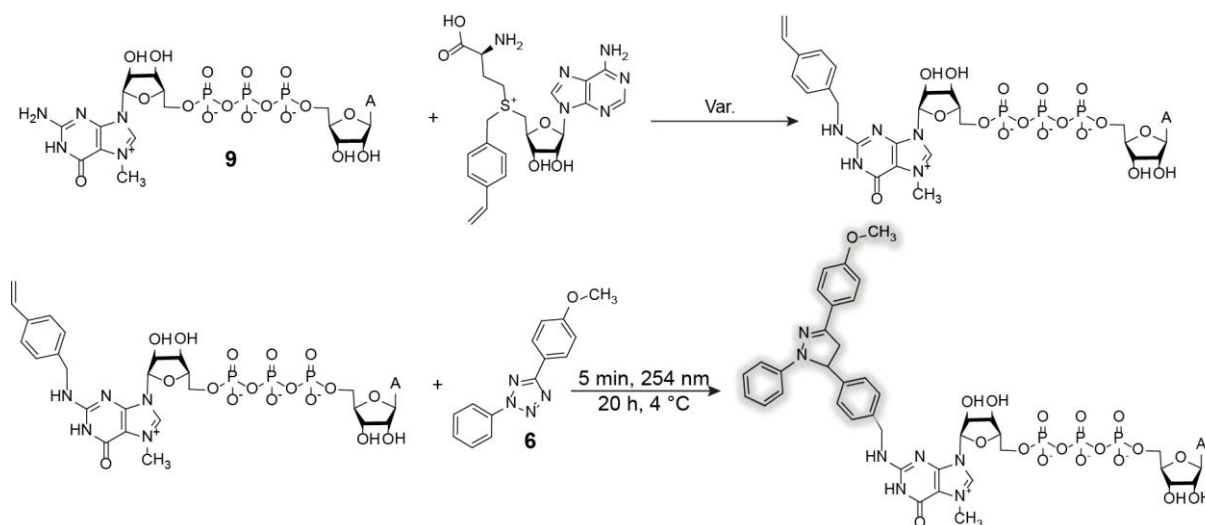


Abbildung 3.2 Mögliche Strategie zur Generierung eines Photoclick-Produkts mit hoher Quantenausbeute. 1,3,5-Triaryl-Pyrazoline könnten Photoclick-Produkte mit hoher Quantenausbeute darstellen. Hierzu müsste in einem ersten Schritt GlaTgs2-V34A oder eine entsprechende Variante genutzt werden, um den Styrolrest unter Verwendung des dargestellten AdoMet-Analogons auf die Kappenstruktur m⁷GpppA **9** zu übertragen. In einem zweiten Schritt würde die Alkenylgruppe mit Tetrazol **6**, für welches die Möglichkeit der Photoaktivierung bereits gezeigt wurde^[154] (und diese Arbeit) zum fluoreszierenden 1,3,5-Triaryl-Pyrazolin umgesetzt werden.

Ein weiteres Problem, das bei der Adaption dieser chemo-enzymatischen Strategie für die Visualisierung *in vivo* auftreten könnte, ist die Bildung des fluoreszierenden Nebenprodukts. Dieses konnte bei der Charakterisierung der Photoclick-Reaktionen *in vitro* detektiert und auf eine Reaktion des reaktiven Nitril-Imins zurückgeführt werden. In weiterführenden Arbeiten

müsste dieses Nebenprodukt zunächst charakterisiert und identifiziert werden, beispielsweise massenspektrometrisch. Darauf aufbauend könnte man Strategien entwickeln, wie dessen Bildung verhindert oder zumindest minimiert werden kann. Erst dann kann das Auftreten eines Hintergrundsignals bei Durchführung der Reaktion in Zellen vermieden werden.

Mit der erfolgreichen Fluoreszenzmarkierung der modifizierten Kappe durch die Photoclick-Reaktion konnte gezeigt werden, dass eine spezifische Markierung eukaryotischer mRNA auf Basis dieser chemo-enzymatischen Strategie durchaus möglich sein könnte, auch wenn für eine Anwendung *in vivo* eine Vielzahl weiterer Schritte und Optimierungen notwendig sein wird. Aber aufgrund der Modularität der Methode besteht eine Vielzahl von Möglichkeiten verschiedene Parameter unabhängig voneinander weiter zu optimieren.

Diese Modularität ermöglichte es auch, die mRNA-Kappe für eine weitere Click-Reaktion, die CuAAC, zugänglich zu machen. Hierfür wurde im enzymatischen Schritt eine Penteninygruppe anstelle des Allylrests übertragen. Anschließend wurde spezifisch die modifizierte Kappe N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA **15** in Gegenwart von Cu(I)/TBTA mit einem azidhaltigen Fluorophor verknüpft. Mittels dieses Ansatzes war es darüber hinaus möglich, das komplexe Biomolekül RNA spezifisch in Abhängigkeit von der Kappenstruktur zu modifizieren. Man könnte daher in einem nächsten Schritt versuchen, diese Methode für die Isolierung zellulärer mRNA zu adaptieren. Wie oben bereits beschrieben, müsste auch hierfür zunächst die Affinität der Variante GlaTgs2-V34A gegenüber der Kappe verbessert werden. Darüber hinaus müsste die Ausbeute des enzymatischen Transfers verbessert werden, da mit AdoEnYn **4** als Cosubstrat nur 25 % Umsatz von 1 mM m^7 GpppA **9** erreicht wurden. Diesen Schritt könnte man möglicherweise effizienter durchführen, wenn SeAdoYn als Cosubstrat eingesetzt wird. Dieses AdoMet-Analogon wurde durch die Gruppe um Prof. Weinhold beschrieben und synthetisiert und ermöglicht den enzymatischen Transfer eines Propinylrests.^[199] Diese reaktive Gruppe unterscheidet sich dabei in der Anzahl der Kohlenstoffatome nicht von AdoPropen **1** und sollte somit ähnlich effizient übertragen werden. Für AdoPropen **1** wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass ein nahezu quantitativer Umsatz von 1 mM m^7 GpppA **9** zu N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** durch GlaTgs2-V34A möglich ist. Erste Untersuchungen des Umsatzes von m^7 GpppA **9** zu der entsprechenden propinylierten Kappe unter Verwendung von SeAdoYn (zur Verfügung gestellt von Prof. Weinhold, RWTH Aachen) als Cosubstrat deuteten darauf hin, dass ähnlich gute Ausbeuten der modifizierten Kappe wie mit AdoPropen **1** erreicht werden können. So zeigten erste RP-HPLC-Analysen, dass etwa 50 % der enzymatisch propinylierten Kappe erhalten werden konnten (1 mM m^7 GpppA **9** als Edukt) und in Gegenwart von 200 μ M des Substrats **9** ein nahezu

quantitativer Umsatz erreicht wurde. Die Generierung einer GlTgs2-V34A-Variante mit höherer Substrataffinität und die Verwendung des Cosubstrats SeAdoYn könnten somit die Grundlage für die Etablierung einer effizienten Isolierungsstrategie von eukaryotischer mRNA bilden. Die CuAAC ist in der Literatur als Reaktion beschrieben, welche quantitative Umsätze ermöglicht^[188,210] und sollte somit keinen begrenzenden Faktor bei der Etablierung einer solchen Methode darstellen.

Eine chemo-enzymatische Strategie zur Isolierung wäre im Vergleich zu den derzeit verwendeten Methoden aufgrund zweier Faktoren vorteilhaft. Eine routinemäßig durchgeführte Isolierung eukaryotischer mRNAs basiert auf dem Poly(A)-Schwanz dieser Biomoleküle. Hierüber werden diese an oligo(dT)-*Beads* hybridisiert und gereinigt. Diese Methode birgt allerdings den Nachteil, dass mRNAs, welche einen kurzen Poly(A)-Schwanz aufweisen, unter Umständen nicht isoliert werden und somit nicht in die folgenden Analysen eingehen.^[96,104] Es besteht daher die Gefahr, dass bei einer Bestimmung zellulärer mRNA-Level, einige Spezies nicht quantifiziert werden und das Ergebnis verfälscht wird. Teilweise ist auch der Poly(A)-Schwanz selbst das zu analysierende Charakteristikum, da hieraus Dynamiken von mRNA-*Turnover* und Regulierung der Translationsrate hergeleitet werden können. Diese Analysen können aber durch die Isolierung mittels des Poly(A)-Schwanzes beeinflusst werden (Gespräch mit Cornelia de Moor). Eine Isolierung auf Grundlage der eukaryotischen mRNA-Kappe würde diese Nachteile umgehen und wurde auch bereits erfolgreich durch Verwendung einer hochaffinen Variante des Translationsinitiationsfaktors eIF4E durchgeführt.^[103] Dieses Protein wurde über einen GST-*Tag* auf Glutathion-Agarose-*Beads* immobilisiert und unter anderem zur Isolierung von mRNA aus Hepatitis C-infizierten Leberzellen in Abhängigkeit von der Kappenstruktur genutzt.^[104] Die chemo-enzymatische Strategie würde die Isolierung auf der Grundlage des gleichen Charakteristikums ermöglichen und auch die genannten Vorteile aufweisen. Darüber hinaus könnte eine chemo-enzymatisch basierte Isolierung aber noch weitere Vorteile bieten. Zum einen wird durch die Bildung des Triazols eine kovalente Verknüpfung von Matrix und mRNA erreicht. Hierdurch sollte es möglich sein, stringenter Waschbedingungen nutzen und so effizienter Verunreinigungen entfernen zu können. Die Analyse der isolierten mRNA würde dann direkt auf der Matrix erfolgen. Zum anderen muss in der chemo-enzymatischen Strategie, anders als bei der Verwendung von eIF4E, das Protein nicht in äquimolarer Menge zur mRNA eingesetzt werden.

Eine Optimierung des enzymatischen Transfers einer Alkynylgruppe auf die mRNA-Kappe könnte auch im Hinblick auf die Etablierung einer *in vivo*-Applikation nützlich sein. Dies

scheint zunächst ein unrealistisches Ziel darzustellen, da bisher innerhalb lebender Zellen keine chemische Markierung auf Basis der CuAAC durchgeführt wurde. Als Grund ist hierfür unter anderem zu nennen, dass die Cu(I)-Komplexe meist einen toxischen Effekt auf die Zellen zeigen.^[194] Studien von Kennedy *et al.* zeigten nun aber, dass diese Toxizität sowohl vom Zelltyp als auch der Art des verwendeten Liganden abhängt.^[194] Beispielsweise konnte für MDA-MB-468-Zellen ein IC₅₀-Wert für Cu(I)/TBTA von 29,6 µM bestimmt werden. Der gleiche Komplex ergab für HeLa-Zellen einen IC₅₀-Wert von nur 12,2 µM. In Gegenwart des Liganden L-Histidin wurde dieser Wert für beide Zellarten deutlich verbessert und lag bei >1000 µM.^[194] Analog zu verschiedenen in der Literatur beschriebenen Experimenten, welche die Kompatibilität der Markierung zellulärer Oberflächenstrukturen mittels CuAAC *in vivo* demonstrierten,^[267,301] konnten Kennedy *et al.* auch mittels des Cu(His)₂-Systems erfolgreich Alkin-modifizierte Glykane auf der Zelloberfläche markieren. Hierbei waren auch nach 24 Stunden keine toxischen Effekte auf die verwendeten Huh75-Zellen zu beobachten.^[194] Vor allem die effiziente zelluläre Aufnahme des Kupfers (45 ng/10⁶ HeLa-Zellen,^[194] korrespondierend zu einer Konzentration von 35 µM, wenn Zellvolumen von 20 pL angenommen wird) ohne Auftreten toxischer Effekte zeigt, dass bei einer weiteren Ligandenoptimierung eine CuAAC potentiell auch innerhalb lebender Zellen möglich sein könnte. Neben der Etablierung eines solchen Cu/Liganden-Systems wäre es für *in vivo*-Applikationen vorteilhaft, entsprechend der Photoclick-Reaktion auch in der CuAAC nichtfluoreszierende Substrate einzusetzen, um ein Hintergrundsignal zu vermeiden. Auch dies konnte bereits *in vitro* erfolgreich für die CuAAC gezeigt werden und stellt somit keine Beschränkung einer möglichen *in vivo*-Anwendung dar.^[301–305] Neben einer Weiterentwicklung der Photoclick-Reaktion könnte somit auch eine weitere Optimierung der CuAAC die Verwirklichung einer chemo-enzymatische Strategie zur Markierung zellulärer mRNA ermöglichen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in dieser Arbeit durch enzymatische Alkenylierung bzw. Alkinylierung und anschließende chemische Markierung mittels geeigneter Click-Reaktionen eine spezifische Fluoreszenzmarkierung der mRNA-Kappenstruktur erreicht wurde und so neue mögliche Methoden zur Markierung eukaryotischer mRNA aufgezeigt werden konnten. Um eine Adaption dieser Methoden für *in vivo*-Applikationen zu erreichen, sind noch einige Optimierungen nötig, wozu insbesondere eine Verbesserung der Substrataffinität der Variante GluTgs2-V34A zählt. Diesbezüglich konnten aber einige Ideen erarbeitet sowie alternative Enzyme vorgeschlagen werden, welche eine notwendige Verbesserung zur enzymatischen Markierung der mRNA-Kappe auch in

Gegenwart geringer Substratkonzentrationen eröffnen könnten (Kapitel 3.2). Einige dieser Enzyme stellen auch eine mögliche Alternative für den Schritt der mRNA-Modifizierung da, wenn *in vivo* die Position N^2 der Kappe nicht für eine Transferreaktion durch GlTgs2-V34A zugänglich sein sollte oder eine Modifizierung dieser Position die Transporteigenschaften der Ziel-mRNA verändert. Auch im Bereich der chemischen Markierung wurden Ideen aufgezeigt, wie eine Verbesserung der etablierten Click-Reaktionen erreicht werden könnte und welche alternativen Reaktionen möglich wären.

Die Bioorthogonalität wurde, zumindest für die Photoclick-Reaktion, bereits beschrieben^[154,176] und erste Versuche, dies auch im Rahmen dieser Arbeit für die verschiedenen Click-Reaktionen zu demonstrieren, konnten durch Verwendung von Lysaten erfolgen. Weitere Charakterisierungen hierzu müssten mit einer affineren Enzym-Variante erfolgen, um äquimolare Konzentrationen zellulärer Bestandteile und des Substrats m^7GpppA **9** gewährleisten zu können. Für die CuAAC wurde darüber hinaus die Kompatibilität und Spezifität der Markierung mit dem komplexen Biomolekül mRNA demonstriert.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass verschiedene enzymatische und chemische Modifizierungen zur Markierung der mRNA-Kappe genutzt werden können, die sich durch hohe Spezifität, Bioorthogonalität und Kompatibilität mit dem Biomolekül RNA auszeichnen. Die Ergebnisse zeigen auch, dass es in weiterführenden Arbeiten möglich sein könnte die Substrataffinität der Variante sowie Parameter der Click-Reaktion zu optimieren, andere Positionen der Kappe zu modifizieren sowie eine codierbare, sequenzspezifische Sonde zu generieren und die Methode damit auch in lebenden Zellen durchführen zu können.

Chemo-enzymatische Strategien zur Markierung der mRNA-Kappe können somit in Zukunft sinnvolle Ergänzungen derzeitiger Methoden zur Isolierung eukaryotischer mRNA und zur Visualisierung des Biomoleküls mRNA *in vivo* darstellen.

4. Ausblick

Chemo-enzymatische Strategien stellen eine neue Möglichkeit zur Markierung von Biomolekülen, wie Proteinen,^[195,199] DNA^[203] und RNA^[155,156] dar. In einem ersten Schritt wird hierbei enzymatisch eine reaktive Gruppe spezifisch auf das Ziel-Molekül übertragen, wodurch in einem zweiten Schritt eine kovalente Verknüpfung des Biomoleküls mit einer Reportergruppe in einer Click-Reaktion erreicht werden kann. Neben der Biokompatibilität und Spezifität ist ein weiterer Vorteil dieser Methoden ihr modularer Aufbau, der es ermöglicht durch den Einsatz geeigneter Enzyme verschiedenste Biomoleküle für chemische Modifizierungen durch unterschiedlichste Click-Reaktionen zugänglich zu machen. Im Zuge der chemischen Markierung können die Biomoleküle dann kovalent mit unterschiedlichsten Reportergruppen verknüpft und hierdurch nicht nur für Visualisierungs- sondern auch für Isolierungsstrategien zugänglich gemacht werden.

In dieser Arbeit wurden chemo-enzymatische Strategien zur spezifischen Markierung eukaryotischer mRNA entwickelt. Auf Grundlage dieser Ansätze könnten beispielsweise neue Methoden etabliert werden, um den Einfluss subzellulär lokalisierter mRNAs auf die zelluläre Integrität zu überprüfen. Sowohl die Isolierung als auch die Visualisierung zellulärer mRNAs könnten diesbezüglich neue Einblicke liefern und chemo-enzymatische Ansätze aufgrund ihres zweistufigen Aufbaus für diese verschiedenen Verfahren leicht adaptiert werden.

Um die Spezifität eines chemo-enzymatischen Ansatzes zu gewährleisten, müssen zunächst geeignete Enzyme zur Modifizierung des Zielmoleküls gewählt werden. In dieser Arbeit wurden für den enzymatischen Transfer der reaktiven Gruppe Trimethylguanosinsynthasen genutzt, da diese eine Hypermethylierung der mRNA-Kappe – einem Merkmal eukaryotischer mRNA – unter Verwendung von AdoMet als Cosubstrat katalysieren.^[211,229]

Für die Trimethylguanosinsynthase des Darmparasiten *Giardia lamblia* wurde hier eine geringe promiskuitive Aktivität gegenüber dem AdoMet-Analogon AdoPropen **1** gezeigt. Hierdurch war es möglich, die reaktive Allyl- anstelle der Methylgruppe auf die Position N^2 der mRNA-Kappe zu übertragen. Allerdings konnte die modifizierte Kappe durch diese Seitenaktivität mit dem Wildtyp-Enzym nur in Ausbeuten von 4 % generiert werden. Durch Substitution des Valins an Position 34 des Enzyms gegen Alanin konnte die Aktivität deutlich verbessert und Ausbeuten von bis zu 92 % N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** erreicht werden. Durch die Variante GlaTgs2-V34A wurde es möglich, die mRNA-Kappe m^7 GpppA **9** effizient zu modifizieren und für verschiedenste Click-Reaktionen zugänglich zu machen. Auf Grundlage der enzymatisch übertragenen Allylgruppe konnte die Kappe beispielsweise mittels einer

Thiol-En-Click-Reaktion biotinyliert werden. Auch wurde erfolgreich eine Photoclick-Reaktion eingesetzt, um eine Fluoreszenzmarkierung der Struktur N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** zu erreichen. Darüber hinaus wurde durch die Variante auch eine Penteninygruppe transferiert, wodurch die mRNA-Kappe für Markierungen durch die CuAAC zugänglich wurde. Durch Alkinylierung und anschließende CuAAC war nicht nur eine spezifische Markierung der minimalen *capped*-RNA m^7 GpppA **9** sondern auch des komplexen Biomoleküls mRNA möglich, was durch Fluoreszenzmarkierung einer 106 nt langen RNA spezifisch in Abhängigkeit der Cap 0-Struktur gezeigt werden konnte.

In dieser Arbeit wurden somit erste Schritte hin zu potentiellen Anwendungen chemo-enzymatischer Strategien im Bereich eukaryotischer mRNA-Visualisierung und -Isolierung gemacht.

Beispielsweise könnte die Alkinylierung mit anschließender CuAAC genutzt werden, um eine effiziente, Poly(A)-Schwanz-unabhängige Methode zur mRNA-Isolierung zu etablieren. Durch den enzymatischen Transfer der reaktiven Gruppe auf mRNAs und selektive Markierung dieser Biomoleküle durch die anschließende Click-Reaktion würden spezifisch diese Biomoleküle auf einer Matrix immobilisiert. Hierdurch könnte eine Verbesserung im Bereich der Untersuchung von mRNA-Expressionsleveln erreicht werden, da teilweise ineffiziente Isolierungen beobachtet werden, wenn die Immobilisierung von mRNAs mittels oligo(dT)-Beads erfolgt und der Poly(A)-Schwanz eine zu geringe Länge aufweist.^[104]

Aufgrund der Modularität chemo-enzymatischer Strategien ist es aber auch möglich, eine spezifische Fluoreszenzmarkierung Kappen-tragender Biomoleküle zu erreichen, was potentiell die Grundlage einer neuen Methode zur Visualisierung dieser Spezies *in vivo* darstellen könnte. Eine solche Strategie hätte die Vorteile, dass alle benötigten Komponenten, wie Enzym und AdoPropen,^[198] *in vivo* hergestellt werden könnten und darüber hinaus neben der Generierung anschaltbarer Fluoreszenzsignale auch die Möglichkeit zur Detektion endogener mRNA gegeben wäre. Letzteres stellt einen deutlichen Vorteil im Vergleich zu bisher genutzten Methoden dar, da man durch Visualisierung endogener Moleküle weitgehend ausschließen kann, dass Dynamiken des Transports oder der subzellulären Lokalisation durch eine Veränderungen der Ziel-mRNA beeinflusst werden. Um eine chemo-enzymatische Methode für *in vivo*-Applikationen adaptieren zu können, muss eine bioorthogonale Click-Reaktion für die chemische Modifizierung eingesetzt werden. Mit der Photoclick-Reaktion^[154,176] konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch solche Click-Reaktionen geeignet sind, um die mRNA-Kappe zu markieren. Die enzymatische Alkinylierung der eukaryotischen mRNA-Kappe und Fluoreszenzmarkierung mittels der Photoclick-Reaktion

stellt daher eine vielversprechende Basis zur Etablierung einer chemo-enzymatischen Strategie für die Visualisierung von mRNA in lebenden Zellen dar. Aber auch die CuAAC, die erfolgreich zur Fluoreszenzmarkierung alkinylierter mRNA eingesetzt wurde, könnte unter Umständen hierfür adaptiert werden, da neueste Erkenntnisse zeigen, dass auch diese Click-Reaktion möglicherweise in Zukunft für Anwendungen in lebenden Zellen geeignet sein könnte.^[194]

Für eine potentielle Anwendung der hier beschriebenen chemo-enzymatischen Strategien zur Isolierung oder Visualisierung von mRNA müssten in folgenden Arbeiten allerdings noch verschiedene Aspekte weiter verbessert werden. Hierzu zählen vor allem die Substrataffinität der Variante, die Verminderung der Aktivität gegenüber dem nativen Cosubstrat AdoMet **12** sowie die Generierung von anschaltbarer Fluorophoren mit hoher Quantenausbeute. Darüber hinaus sollten auch weitere Enzyme mit anderer Regiospezifität als GlaTgs2 charakterisiert werden. Hierdurch könnten möglicherweise auftretende Probleme, wie eine geringe Zugänglichkeit der Kappe oder eine Beeinflussung von mRNA-Transportwegen durch Modifikation der Position N^2 , *in vivo* umgangen werden.

Um eine praktische Anwendung auf Grundlage der hier gezeigten, chemo-enzymatischen Strategien zu etablieren, ist somit noch eine Vielzahl von Arbeitsschritten notwendig. Allerdings wird auch deutlich, dass aufgrund der Modularität der Methode eine Vielzahl von Lösungen und Optimierungsschritten denkbar ist.

Betrachtet man diese Möglichkeiten im Zusammenhang mit den hier etablierten Methoden und gezeigten Ergebnissen, so wird deutlich, dass chemo-enzymatische Strategien eine sinnvolle Ergänzung derzeitiger Methoden zur Isolierung eukaryotischer mRNA und potentiell zur Visualisierung des Biomoleküls mRNA *in vivo* darstellen könnten.

5. Material

5.1 Chemikalien und Bioreagenzien

Alle Standardchemikalien wurden von den Firmen Acros (Geel, B), AppliChem GmbH (Darmstadt, D), Baseclick (Tutzing, D), biomol (Hamburg, D), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D), Merck KGaA (Darmstadt, D), TCI (Eschborn, D), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, D), WAKO (Osaka, J) und 5PRIME (Hamburg, D) in Analyse-Qualität bezogen.

5.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5.1 **verwendete Verbrauchsmaterialien.**

Bezeichnung	Hersteller
DC-Fertigfolien Alugram® Xtra SIL G/UV	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D
Einweg-Laborhandschuhe (Vinyl und Nitril)	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Einweg-Spritzen (5-50 mL)	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, D
Einweg-Kanülen (0.9 x 40 mM)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Elektroporationsküvetten (1 mM)	Molecular Bio products, Inc., San Diego, USA
Falcontubes (15 mL, 50 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Filtrierpapiere MN-615	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D
Glaskugeln	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Kulturröhrchen (14 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
MF-Millipore™ Membrane Filters (0,025 µM)	EMD Millipore Corporation, Billerica, USA
Millipore Express® PLUS Membrane Filters	EMD Millipore Corporation, Billerica, USA
Nitrocellulosemembran	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Parafilm M Verschlussfolie	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, D
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, D

Tabelle 5.1 **verwendete Verbrauchsmaterialien, Fortsetzung.**

Bezeichnung	Hersteller
Nitrocellulosemembran	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Parafilm M Verschlussfolie	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, D
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, D
Petrischalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Reaktionsgefäße (0,2-2,0 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Serologische Pipetten, steril (1,0-25 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Sterilfilter Filtropur S 0,25 µm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Sterilfilter Filtropur S 0,4 µm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Vernichtungsbeutel	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Whatman® Gel-Blotting-Papier	Whatman GmbH, Dassel, D
Zentrifugalfiltereinheiten Amicon® Ultra-15	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Groningen, D
Zentrifugalfiltereinheiten Vivaspin® 500	Sartorius AG, Göttingen, D
Zeba Spin Desalting Columns, 7K MWCO	<i>Thermo Fisher Scientific Inc.</i> , Bonn, D

5.3 Geräte

Tabelle 5.2 **verwendete Geräte.**

Gerät	Hersteller
ÄKTA purifier™ system	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB
Analysenwaage Kern ABJ	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, D
Autoklav Systec D-150	Systec GmbH, Wettenberg, D
Brutschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Eppendorf Eporator	Eppendorf AG, Hamburg, D
ESI-TOF Agilent 6224, gekoppelt an Agilent HPLC 1200 Series	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG, Waldbronn, D

Tabelle 5.2 **verwendete Geräte, Fortsetzung.**

Gerät	Hersteller
FE20 – FiveEasy™ pH	Mettler-Toledo, Inc., Columbus, USA
Gefriertrocknungsanlage Christ® Alpha 1-2	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, D
Glovebox UniLab	MBraun, Garching, D
HPLC Agilent 1260 Infinity	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG, Waldbronn, D
Inkubationsschüttler Multitron Standard	Infors AG, Bottmingen/Basel, CH
Imager VersaDoc™ MP 4000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Leica Mikroskop DM 2000	Leica Mikrosysteme, Wetzlar, D
MALDI TOF-TOF Bruker UltrafleXtrem	Bruker, Billerica/MA, USA
Membranpumpe MZ 2C NT	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, D
Mikrowelle 900 & Grill	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, D
Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
MR Hei-Mix L	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
MyCycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Olympus IX81, inverses Konfokalmikroskop	Olympus, Hamburg, D
PEQLAB Power Supply eV261	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
PeqPetten Einkanal (0.5 bis 1000 µL)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Präzisionswaage Kern EG-N	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, D
Primus 25 advanced® Thermocycler	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Milli-Q® Reference A+ System	EMD Millipore Corporation, Billerica, USA
Research® plus (0,1 bis 1000 µL)	Eppendorf AG, Hamburg, D

Tabelle 5.2 **verwendete Geräte, Fortsetzung.**

Gerät	Hersteller
Rota-Filler 3000®	Heathrow Scientific LLC, Vernon Hills, D
Roth UV-Handlampe, 254 nm und 365 nm, 2x 6 W	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Rotilabo®-centrifuge with butterfly-rotor	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Semi-Dry-Blotter V20-SDB	Biostep GmbH, Jahnsdorf, D
SmartSpec™ Plus Spectrophotometer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Thermomixer HLC	Digital Biomedical Imaging Systems AG, Pforzheim, D
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Zentrifugen 5424 R, 5415 R und 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, D

5.4 Säulen

Tabelle 5.3 **verwendete HPLC-Säulen.**

Säule	Hersteller
NUCLEODUR® C18 Pyramid, 5 µm, 4 mm ID, Länge 125 mm	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D
NUCLEODUR® C18 Pyramid, 5 µm, 10 mm ID, Länge 125 mm	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D
NUCLEODUR® Hilic, 5 µm, 4 mm ID, Länge 125 mm	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D

Tabelle 5.4 **verwendete Säulen zur Proteinreinigung mittels des ÄKTA purifier™ systems.**

Säule	Hersteller
HiTrap™ FF 1 columns	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB
HiTrap™ DEAE FF 1 columns	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB

5.5 Matrices

Tabelle 5.5 verwendete Matrices.

Matrix	Hersteller
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden, D
Streptavidin <i>Beads</i>	Bioclone Inc., San Diego CA, USA
<i>Cationic exchange P11 cellulose phosphate</i>	Whatman, Dassel, D

5.6 Puffer, Lösungen und Medien

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden in Wasser aus der Reinstwasseranlage Milli-Q® Reference A+ mit RNase-Filter angesetzt. Die verwendeten Puffer und Lösungen zur Analyse von Nukleinsäuren und Proteinen sowie deren Zusammensetzungen sind in Tabelle 5.6 aufgeführt.

Tabelle 5.6 verwendete Puffer und Lösungen für Protein- und Nukleinsäureanalyse.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Anodenpuffer (5x)	0,2 M Tris; pH 8,9
APS-Stocklösung	10 % (w/v) APS in ddH ₂ O
AP-Entwicklerlösung	100 mM Tris; 100 mM MgCl ₂ ; 100 mM NaCl; pH 9,5
BCIP-Lösung	0,5 % (w/v) BCIP in DMF
Blockierungspuffer 1	1 % (w/v) BSA, 0,03 % (w/v) in PBS (pH 7,4)
Blockierungspuffer 2	4 % (w/v) BSA in 1x PBS
3x CARO-Puffer	120 mM Tris, 6 mM Spermidin, 0,03 % (v/v) Triton-X, 4,5 % (w/v) PEG6000, 15 mM DTT, pH 8,1
Coomassie-Entfärbelösung	20 % (v/v) Eisessig
Coomassie-Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250; 45 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure
AP-Detektionspuffer	100 mM Tris, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, pH 9,5
dNTPs	100 mM dATP: dGTP: dCTP: dTTP 1: 1: 1: 1

Tabelle 5.7 **verwendete Puffer und Lösungen für Protein- und Nukleinsäureanalyse, Fortsetzung.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
Natriumacetat-Lösung	3 M Natriumacetat
Natriumhydroxid-Lösung	0,5 M NaOH
NBT-Lösung	0,1 % (w/v) NBT in 0,1 M Tris; pH 9,5
Nickelsulfat-Lösung	100 mM NiSO ₄
NTPs	100 mM ATP: GTP: CTP: UTP 1: 1: 1: 1
PBS (10x)	1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 15 mM KH ₂ PO ₄ ; 10 mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
2x RNA-Loading Dye	95 % (v/v) Formamid, 87 µM SDS, 0,5 mM EDTA
Transferpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Isopropanol; pH 8,3
5x Transkriptionspuffer	200 mM Tris, pH 7,9
20 % Stammlösung, denat,	8 M Urea, 50 % (v/v) Acrylamid (40 %; 29: 1), 0,1 % (v/v) TEMED, 2 % (v/v) TAE (50 %)
T-PBS	0,1 % (v/v) Tween in 1x PBS

Tabelle 5.8 **verwendete Puffer und Lösungen zur Proteinproduktion und Reinigung.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
Proteaseinhibitor Cocktail	1 Tablette "cOmplete mini" (Roche) in 1,5 mL ddH ₂ O
Dialysepuffer GlaTgs2	50 mM Tris; 100 mM NaCl; 2 mM DTT; 1 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerol; pH 8,0
Dialysepuffer hTgs1	50 mM Tris; 100 mM NaCl; 10 % (v/v) Glycerol; pH 8,0
Dialysepuffer LuxS	50 mM Hepes; 10 % (v/v) Glycerol; pH 8,0
Dialysepuffer MTAN	50 mM Hepes; 10 % (v/v) Glycerol; pH 7,0
Elutionspuffer A GlaTgs2	250 mM Imidazol in Lysepuffer GlaTgs2
Elutionspuffer B GlaTgs2	500 mM Imidazol in Lysepuffer GlaTgs2
Elutionspuffer A hTgs1	500 mM Imidazol in Lysepuffer hTgs1

Tabelle 5.9 **verwendete Puffer und Lösungen zur Proteinproduktion und Reinigung, Fortsetzung.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
Elutionspuffer A LuxS	100 mM Imidazol in Lysepuffer LuxS
Elutionspuffer B LuxS	200 mM Imidazol in Lysepuffer LuxS
Elutionspuffer C LuxS	300 mM Imidazol in Lysepuffer LuxS
Elutionspuffer D LuxS	500 mM Imidazol in Lysepuffer LuxS
Elutionspuffer A MTAN	250 mM Imidazol in Lysepuffer MTAN
Lysepuffer GlaTgs2	50 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8,0
Lysepuffer hTgs1	50 mM Tris, 1 M NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8,0
Lysepuffer LuxS	15 mM Na ₂ HPO ₄ , 15 mM NaH ₂ PO ₄ , 500 mM NaCl, soll pH 7,2
Lysepuffer MTAN	26 mM Na ₂ HPO ₄ , 24 mM NaH ₂ PO ₄ , soll pH 7,5
Waschpuffer A GlaTgs2	50 mM Imidazol in Lysepuffer GlaTgs2
Waschpuffer B GlaTgs2	100 mM Imidazol in Lysepuffer GlaTgs2
Waschpuffer A hTgs1	50 mM Imidazol in Lysepuffer hTgs1
Waschpuffer A LuxS	10 mM Imidazol in Lysepuffer LuxS
Waschpuffer B LuxS	50 mM Imidazol in Lysepuffer LuxS
Waschpuffer A MTAN	50 mM Imidazol in Lysepuffer MTAN

Tabelle 5.10 **verwendete Puffer und Lösungen zur colorimetrischen Analyse der Enzymaktivität.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
Chlorogensäure	10 mM in H ₂ O/DMSO (42: 1)
DTNB-Stocklösung	10 mM in 100 mM Hepes (pH 8,0)
(-)-Epigallocatechingallat	10 mM in ddH ₂ O
Kaffeesäure	10 mM in ddH ₂ O
Quenching-Lösung	8 M Guanidiniumchlorid, 0,5 mM EDTA, in 100 mM Hepes (pH 8,0)

Tabelle 5.11 verwendete Puffer und Lösungen zur colorimetrischen Analyse der Enzymaktivität, Fortsetzung.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Reaktionspuffer 1 Assay	3 μ M MTAN, 9 μ M LuxS, 200 mM AdoMet, 150 mM m^7 GTP, in 100 mM Hepes (pH 8,0)/finale Konzentrationen
Reaktionspuffer 2 Assay	3 μ M MTAN, 9 μ M LuxS, 200 mM AdoMet, in 100 mM Hepes (pH 8,0)/finale Konzentrationen

Tabelle 5.12 verwendete Puffer und Lösungen zur Charakterisierung von Biokonversionen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
AdoMet-Analoga 1-4	5-25 mM in ddH ₂ O (diese Arbeit)
AdoMet	3,54 mM in 1 mM HCl
Eluent A, HPLC	100 mM Kaliumphosphat, pH 6,5
Fixierlösung PC3-Zellen	125 mM Pipes, 10 mM EGTA, 1 mM MgCl ₂ , 0,2 % (v/v) Triton X-100, 3,7 % (v/v) Formaldehyd, pH 6,8
HCCA-Matrix	gesättigte Lösung in ddH ₂ O: Acetonitril (2: 1), 0,1 % (v/v) TFA
m^7 GTP	5 mM in ddH ₂ O
m^7 GpppA	10 mM in ddH ₂ O
PUS-Puffer	100 mM Tris, 10 mM MgCl ₂ , 100 mM NH ₄ OAc, 0,1 mM EDTA (0,5 mM DTT), pH 8,0
Reaktionspuffer 2	50 mM Tris; 100 mM MgCl ₂ ; 100 mM NH ₄ OAc; pH 8,4

Tabelle 5.13 verwendete Puffer und Lösungen zur Durchführung chemischer Modifikationen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Benzoat-Tetrazol 7	50 mM in CHCl_3 (diese Arbeit)
Biotinthiol 5	200 mM in DMF (diese Arbeit)
Biphenyl-Tetrazol 8	50 mM in DMF (diese Arbeit)
CuBr-Stocklösung	30 mM in <i>Click Solution</i>
Eluent A, HPLC präparativ	ddH ₂ O, 0,01 % (v/v) TFA
Eluent B, HPLC präparativ	Acetonitril, 0,01 % (v/v) TFA
Eterneon-Azid	2,5 mM in <i>Click Solution</i>
Methoxy-Tetrazol 6	50 mM in DMSO (diese Arbeit)
TBTA-Stocklösung	111 mM in <i>Click Solution</i>

Die verwendeten Medien und Lösungen für die Bakterienkultivierung, die in Tabelle 5.14 dargestellt sind, wurden steril filtriert oder für 20 Minuten bei 120 °C und 1.4 bar Dampfdruck autoklaviert.

Tabelle 5.14 verwendete Medien und Lösungen zur Bakterienkultivierung.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Ampicillin-Stocklösung	100 mg/mL Ampicillin in 70 % (v/v) Ethanol
IPTG-Stocklösung	0.16 M IPTG
Glucose-Lösung	33 % (w/v) D-(+)-Glucosemonohydrat in ddH ₂ O; steril filtriert
Kanamycin-Stocklösung	25 mg/mL Kanamycin
LB-Medium	10 g/L Trypton; 10 g/L NaCl; 10 g/L Hefeextrakt
SOC-Medium	20 g/L Trypton; 12.5 mM NaCl; 5 g/L Hefeextrakt; 20 mM Glucose; 2.5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; pH 7.0
YT-Medium (2x)	10 g/L Trypton; 5 g/L NaCl; 10 g/L Hefeextrakt

5.7 Kommerziell erworbene Puffer und Lösungen

Tabelle 5.15 kommerziell erworbene Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
<i>Click Solution</i>	DMSO: <i>t</i> BuOH (3: 1)	Baseclick, Tutzing, D
DNA-Probenpuffer (6x)	10 mM Tris-HCl; 60 % Glycerol; 60 mM EDTA; 0,03 % Bromphenolblau; 0,03 % Xylen Cyanol FF; pH 7,6	Fermentas GmbH, St, Leon-Rot, D
FastAP [®] -Puffer (10x)	100 mM Tris-HCl; 50 mM MgCl ₂ ; 1 M KCl; 0,2 % Triton X-100; 1 mg/mL BSA; pH 8,0	Fermentas GmbH, St, Leon-Rot, D
FastDigest [®] -Puffer	Zusammensetzung geschützt	Fermentas GmbH, St, Leon-Rot, D
HF-Puffer	Zusammensetzung geschützt	Finnzymes Oy, Vantaa, FIN

Tabelle 5.16 kommerziell erworbene Puffer und Lösungen, Fortsetzung.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
PCR-Puffer (10x)	800 mM Tris-HCl; 200 mM Ammoniumsulfat; 0,2 % (w/v) Tween-20; pH 8,8	Solis BioDyne, Tartu, EST
Rotiphorese [®] Gel 40 (29: 1)	40 % Acrylamid/Bisacrylamid Mischungsverhältnis 29: 1	Carl Roth GmbH & Co, KG, Karlsruhe, D
Tango-Puffer (10x)	330 mM Tris-Acetat; pH 7,9; 100 mM MgOAc; 660 mM KOAc; 1 mg/mL BSA	Fermentas GmbH, St, Leon-Rot, D
T4 DNA Ligase-Puffer (10x)	400 mM Tris-HCl; 100 mM MgCl ₂ ; 100 mM DTT; 5 mM ATP; pH 7,8	Fermentas GmbH, St, Leon-Rot, D
<i>Vaccinia Capping Enzyme Buffer</i> (10x)	500 mM Tris-HCl; 50 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM DTT; pH 8,0	NEB, Frankfurt a/M, D

5.8 Protein- und Nukleinsäurestandards

Tabelle 5.17 verwendete Protein und Nukleinsäurestandards.

Bezeichnung	Hersteller
<i>GeneDireX[®] 100 bp DNA Ladder</i>	GeneDireX, Taipeh, TW
<i>GeneRuler[™] 1 kb DNA Ladder</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
<i>PageRuler[™] Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
<i>PageRuler[™] Unstained Protein Ladder</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
<i>Precision Plus Protein[™] Dual Color Standards</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
<i>RiboRuler Low Range RNA Ladder 100-1000 bp</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D

5.9 Kappen-Analoga

Tabelle 5.18 verwendete Kappen-Analoga.

Bezeichnung	Hersteller
<i>m⁷GTP</i>	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D
<i>m⁷GpppA</i>	NEB, Frankfurt a/M, D

5.10 Oligonukleotide und Gene

Alle aufgeführten Oligonukleotide wurden durch die Firma Invitrogen synthetisiert. Die Schnittstellen für die jeweilige Endonuklease, sofern vorhanden, sind unterstrichen. Die Synthese des Gens GlaTgs2 (Codon optimiert) erfolgte durch Geneart.

Tabelle 5.19 verwendete Oligonukleotide und synthetisierte Gene.

Bezeichnung	Sequenz
GlaTgs2 (Codon optimiert)	Siehe Anhang

Tabelle 5.20 verwendete Oligonukleotide und synthetisierte Gene, Fortsetzung.

Bezeichnung	Sequenz
T7 promotor seq primer	taatacgaactcactataggg
T7 rev seq primer	tatgctagttattgctcag
GlaTgs for BamHI	gatcggatccatgagcacctgg
GlaTgs stop rev XhoI	gatactcgagttattcaccgctaccgcgtgt
GlaTgs V34A for	atcaaaatgaatgaagccgccttttttagcgtt
GlaTgs V34A rev	aacgctaaaaaaggcggcttcattcattttgat
GlaTgs T70A for	attgatggcgccgcatgtgttggtggt
GlaTgsT70A rev	accaccaacacatgcggcgccatcaat
GlaTgsC72A for	gatggcaccgcagccgttggtggtgat
GlaTgsC72A rev	atcaccaccaacggctgcggtgccatc

5.11 Enzyme

Tabelle 5.21 verwendete Enzyme.

Enzym	Hersteller
BamHI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
DNase I	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
DpnI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Enterokinase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
FastAP TM	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
FastDigest [®] BamHI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
FastDigest [®] XhoI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
FIREPol [®] DNA Polymerase	Solis BioDyne, Tartu, EST
GlaTgs2 und Varianten	Diese Arbeit
hTgs1	Diese Arbeit

Tabelle 5.22 verwendete Enzyme, Fortsetzung.

Enzym	Hersteller
LuxS	Diese Arbeit
Lysozym	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
MTAN	Diese Arbeit
Phusion®-High-Fidelity-DNA-Polymerase	Finnzymes Oy, Vantaa, FIN
Pyrophosphatase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
RiboLock RNase Inhibitor	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
T4-DNA-Ligase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
T7-Polymerase	Eigene Herstellung; u.a. durch Stephanie Besztejan, Julia Sandberg-Meinhardt, Anna Rath
<i>Vaccinia Capping</i> Enzym	NEB, Frankfurt a/M, D
XhoI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D

5.12 Bakterienstämme

Tabelle 5.23 verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp
BL21(DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 =λ sBamHI ΔEcoRI-B int: : (lacI: : PlacUV5: : T7 gene1) i21 Δnin5</i>
TOP10	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str^R) endA1 λ⁻ nupG</i>
Tuner™(DE3)pLacI	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1(DE3)pLacI(Cam^R)</i>

5.13 Vektoren

Tabelle 5.24 **Verwendete Vektoren.**

Vektor	Beschreibung	Quelle
pRSET-A	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, pUC und f1 <i>origin</i> , T7 und bla Promotoren, AmpR, 6x His-Taq, Xpress TM Epitop, Enterokinase recognition site	Invitrogen TM (Life Technologies GmbH, Darmstadt, D)
pRSET-A-GlaTgs2/Varianten	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, pUC und f1 <i>origin</i> , T7 und bla Promotoren, AmpR, 6x His-Taq, Xpress TM Epitop, Enterokinase <i>recognition site</i> , mit Gen codierend für GlaTgs2 oder dessen Varianten	Diese Arbeit
pGEX-6P-1-hTgs1 ₆₁₈₋₈₅₃	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, pBR322 <i>origin</i> , tac Promotor, AmpR, GST-Taq, PreScission cleavage site, mit Gen codierend für hTgs1 ₆₁₈₋₈₅₃ , <i>E. coli</i> Expressionsvektor	Prof. Ralf Ficner, Universität Göttingen
pRSET-A-hTgs1 ₆₁₈₋₈₅₃	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, pUC und f1 <i>origin</i> , T7 und bla Promotoren, AmpR, 6x His-Taq, Xpress TM Epitop, Enterokinase <i>recognition site</i> , mit Gen codierend für hTgs1 ₆₁₈₋₈₅₃	Diese Arbeit
pMalc2x GlaTgs2	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, pBR322 und f1 <i>origin</i> , pLac Promotor, AmpR, MBP-Taq, mit Gen codierend für GlaTgs2	Diese Arbeit
pET-29a-LuxS	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, pBR322 und f1 <i>origin</i> , T7 Promotor, KanR, 5x His- und S-Taq, Thrombin <i>recognition site</i> , mit Gen codierend für LuxS	Prof. Birgit Dräger, Universität Halle
pProEx-MTAN	<i>E. coli</i> Expressionsvektor, f1 <i>origin</i> , trc Promotor, AmpR, 6x His-Taq, mit Gen codierend für MTAN	Prof. Birgit Dräger, Universität Halle

5.14 Antikörper

Tabelle 5.25 verwendete Antikörper.

Antikörper	Anwendung	Hersteller
Anti-Mouse IgG (whole molecule)- Alkaline Phosphatase, Ziege, Sekundärantikörper	1: 30 000 in 2 % BSA-PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
His Detetct	-	CAN GmbH, Hamburg, D
Penta His-Antibody, BSA free, Primärantikörper	1: 2 000 in 2 % BSA-PBS	5 PRIME GmbH, Hamburg, D

5.15 Software

Tabelle 5.26 verwendete Software.

Software	Hersteller
ChemStation Revision B.04.03	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG, Waldbronn, D
Chromas Lite 2.1	Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, AU
ClustalW2-Multiple Sequence Alignment	European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK
i-control™ 1.7	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Intas GDS	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, D
LabImage 1D Gel and Western Blot Analysis	Kapelan Bio-Imaging GmbH, Leipzig, D
Oligo Calculator version 3.26	Warren A. Kibbe, Feinberg School of Medicine, Chicago, USA
Origin 8.5	OriginLab Corporation, Northampton, USA
Plasma-DNA 1.4.2	University of Helsinki, Helsinki, FIN
Quantity One	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D

Tabelle 5.27 **verwendete Software, Fortsetzung.**

Software	Hersteller
SpinWorks 3.1.8 beta 4	University of Manitoba, Winnipeg, CA
UCSF Chimera	Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, SF, USA

.

6. Methoden

6.1 Mikrobiologische Methoden

Die hier beschriebenen Arbeiten wurden in einem gentechnischen Labor der Sicherheitsstufe 1 und unter der Flamme eines Bunsenbrenners durchgeführt. Alle verwendeten Puffer, Lösungen und Medien wurden mit Reinstwasser (ddH₂O) aus einer Milli-Q[®] Reference A+ System-Anlage angesetzt und steril filtriert.

6.1.1 Transformation von *E. coli*-Zellen mittels Elektroporation

Mittels einer Elektroporation kann Plasmid-DNA in *E. coli*-Zellen eingebracht werden. Dabei wird angenommen, dass durch die angelegte Spannung eine kurzzeitige Porosität der Zellmembran erzeugt und eine Aufnahme von Plasmid-DNA durch Diffusion ermöglicht wird. Abhängig von der Art der transformierten Zellen können diese für die Amplifikation des Plasmids *in vivo* oder die rekombinante Produktion des jeweils codierten Proteins genutzt werden.

Für die Transformation wurden 50 µL elektrokompenter, kryokonservierter Zellen (6.1.4) auf Eis aufgetaut und 10 ng gereinigte Plasmid-DNA (6.2.1.6) beziehungsweise bis zu 5 µL eines Ligationsansatzes (6.2.2.3) hinzugefügt. Direkt im Anschluss wurden die Zellen in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt und die Elektroporation durch Anlegen einer Spannung von 1.8 kV für ca. 500 msec durchgeführt. Die Zellen wurden daraufhin sofort mit 450 µL vorgewärmtem SOC-Medium versetzt, in ein Reaktionsgefäß überführt und für 30-45 min bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Hierbei konnte sich die auf dem Plasmid codierte Resistenz gegenüber einem Antibiotikum in erfolgreich transformierten Zellen ausbilden.

Die Zellen wurden anschließend durch dreiminütige Zentrifugation bei 800 xg sedimentiert, in 50 µL SOC-Medium resuspendiert und auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, welche ein entsprechendes Antibiotikum zur Selektion erfolgreich transformierter Zellen enthielten. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

6.1.2 Kultivierung von *E. coli*-Zellen

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen erfolgte aerob in Erlenmeyerkolben (gegebenenfalls aus Kunststoff), in 4-mL-Kulturröhrchen oder auf LB-Agar-Platten. Für die Flüssigkulturen wurde 2YT-Medium genutzt und dieses je nach verwendetem Selektionsmarker mit 100 µg/mL Ampicillin oder 25 µg/mL Kanamycin versetzt.

Als Vorkulturen zur Proteinproduktion (6.3.2) sowie zur Isolierung von Plasmid-DNA (6.2.1.6) aus *E. coli*-Zellen wurden 4 mL 2YT-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie oder mit Zellen eines Kryostocks (6.1.3) inokuliert und 16 h bei 37 °C und 200-240 rpm inkubiert.

Für die Kultivierung auf LB-Agar-Platten wurden *E. coli*-Zellen hierauf mittels Glaskugeln ausgestrichen und anschließend für 16 h bei 37 °C inkubiert.

6.1.3 Lagerung von *E. coli*-Zellen

Zur dauerhaften Lagerung eines Zellstamms wurden die entsprechenden Zellen zunächst in 4 mL 2YT-Medium kultiviert (6.1.2). Hiervon wurden 700 µL mit 300 µL einer 87 %igen (v/v) Glycerol-Lösung versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

6.1.4 Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen

Elektrokompente *E. coli*-Zellen wurden durch Kultivierung der entsprechenden Zellart (Top10-, BL21(DE3)- oder TunerTM(DE3)pLacI-Zellen) sowie anschließendes mehrfaches Waschen der Zellen und Überführung in wässrige Glycerol-Lösung erhalten.

Hierfür wurden 4 mL LB-Medium mit den jeweiligen Zellen inokuliert und 16 h bei 37 °C und 240 rpm inkubiert. Für die Hauptkultur wurden 400 mL LB-Medium mit 4 mL der Vorkultur angeimpft und die Zellen hierin bei 37 °C und 200 rpm inkubiert, bis ein OD₆₀₀-Wert von ca. 0,4 erreicht war. Die Kultur wurde dann sofort für 15 min auf Eis gekühlt und in eiskalte, sterile 50 mL-Falcons überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4 °C und 3 220 xg für 15 min pelletiert und jedes erhaltene Pellet in 10 mL eiskaltem, sterilem ddH₂O resuspendiert. Zwei der resuspendierten Pellets wurden vereinigt und mit sterilem, eiskaltem ddH₂O auf 50 mL ergänzt. Es folgte erneut ein Zentrifugationsschritt von 15 min bei 3 320 xg und 4 °C, bevor erhaltene Zellpellets wieder resuspendiert wurden. Diese Schritten wurden wiederholt bis ein einzelnes Pellet erhalten wurde, welches in 50 mL 10 % (v/v) Glycerol resuspendiert und wie oben beschrieben mittels Zentrifugation sedimentiert wurde. Das Pellet wurde in 2 mL 10 % (v/v) Glycerol aufgenommen und zu je 50 µL aliquotiert. Die Zellen wurden daraufhin sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

6.2 Molekularbiologische Methoden

6.2.1 Analytische und präparative Trennung sowie Reinigung von Nukleinsäuren

6.2.1.1 Native Agarosegelelektrophorese

Sowohl zur Analyse als auch zur Reinigung wurden DNA-Fragmente einer Agarosegelelektrophorese unterzogen. Hierbei wird ausgenutzt, dass die elektrophoretische Mobilität von Nukleinsäuren in einer Gelmatrix invers proportional zum Molekulargewicht ist, wobei sich der trennbare Massenbereich aus der Prozentigkeit des Gels ergibt.

Je nach Molekulargewicht der zu trennenden Fragmente wurden in dieser Arbeit 1-2 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Hierfür wurde der entsprechende Massenanteil Agarose in 50 mL TAE-Puffer erwärmt und die erhaltene Lösung in einem Gießstand erstarrt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 6x DNA-Loading Dye versetzt und über einen Zeitraum von 30-60 min bei einer Spannung von 140 V in TAE-Puffer gelelektrophoretisch getrennt. Die Detektion der Nukleinsäuren erfolgte mittels des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid). Das Gel wurde dazu für 15-30 min in einer Lösung von 4 µg Ethidiumbromid pro 1 mL TAE-Puffer inkubiert und anschließend kurz mit ddH₂O gewaschen. Die Detektion von Nukleinsäuren erfolgte durch Beleuchtung des Agarosegels mit UV-Licht (λ_{Ex} =312 nm). Gegebenenfalls wurden Fragmente im Anschluss aus dem Gel isoliert (6.2.1.5), um hiermit weitere Arbeitsschritte durchführen zu können.

6.2.1.2 Analytische Gelelektrophorese unter Verwendung denaturierender Polyacrylamidgele

Zur Analyse und Reinigung von RNA sowie zur Analyse der Fluoreszenzmarkierung des Kappen-Analogons m⁷GpppA **9** wurde eine gelelektrophoretische Trennungen unter Verwendung denaturierender Polyacrylamidgele durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht, wie auch die Agarosegelelektrophorese (6.2.1.1), auf einem invers proportionalen Zusammenhang von elektrophoretischer Mobilität und Molekulargewicht der Nukleinsäuren in einer Gelmatrix. Allerdings zeichnen sich Polyacrylamidgele durch eine engmaschigere Polymerisation aus, wodurch auch Moleküle mit geringerem Molekulargewicht effizient getrennt werden können.

Für die Herstellung eines denaturierenden Polyacrylamidgels wurde die 20 %ige Stammlösung (Tabelle 6.1) zunächst mittels einer 8 M Urea-Lösung auf die benötigte finale Konzentration verdünnt und die Polymerisation durch Zugabe von 0,7 % (v/v) einer 10 %igen (w/v) APS-Lösung induziert.

Tabelle 6.1 Zusammensetzung der 20 %igen Stammlösung zur Herstellung denaturierender Polyacrylamidgele.

Komponente	Anteil
Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid, 40 % (19: 1)	400 mL
TEMED	800 µL
Urea	384 g
50x TAE-Puffer	16 mL
ddH ₂ O	ad 800 mL

Vor dem Probenauftrag wurden die Gele jeweils durch 10-minütiges Anlegen einer Spannung von 20 V erwärmt. Zur Analyse von RNA (> 100 nt) wurde die entsprechende Probe mit 2x RNA-Loading Dye versetzt und bei einer Spannung von 12 V über einen Zeitraum von 25 min gelelektrophoretisch getrennt. Proben, welche das Kappen-Analogon **9** enthielten, wurden einer 25-50-minütigen Gelelektrophorese bei 10 V unterzogen. Für die Probenvorbereitung wurde hierbei ein 2x RNA-Loading Dye eingesetzt, welcher keine Farbstoffe enthielt. Je nach Fragestellung erfolgte die Analyse der Gele durch Ethidiumbromidfärbung (6.2.1.1), UV-Shadowing (6.6.2) oder die Exzitation von Fluoreszenzsignalen (6.6.2, 6.6.3).

6.2.1.3 Analytische Gelelektrophorese unter Verwendung nativer Polyacrylamidgele

Die Herstellung dieser Gele erfolgte analog der Methode zur Herstellung denaturierender Polyacrylamidgele (6.2.1.2), wobei TAE-Puffer anstelle einer 8 M Urea-Lösung zur Verdünnung eingesetzt wurde. Auch die Stammlösung wurde entsprechend ohne Urea angesetzt.

6.2.1.4 Präparative Polyacrylamidgelelektrophorese zur Reinigung von RNA

Zur Reinigung von RNA aus einer *in vitro*-Transkription (6.2.2.4) wurde diese mit 2x RNA-Loading Dye versetzt, auf ein 10 %iges denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt (6.2.1.2). Die Detektion der RNA erfolgte mittels UV-Shadowing. Banden, welche das erwartete Molekulargewicht aufwiesen, wurden ausgeschnitten und in 500 µL 0,3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,3) für 1 h bei 42 °C und 900 rpm inkubiert. Die RNA wurde aus der Lösung mittels Alkoholpräzipitation gefällt (6.2.1.9).

6.2.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung, Reinigung und Entsalzung von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* gemäß der Herstellerangaben, wobei der Waschschrift doppelt durchgeführt wurde. Die Elution der an die Silica-Matrix gebundenen DNA erfolgte durch 15 µL des Elutionspuffer, wenn im Anschluss hiermit eine Hybridisierungs-PCR (6.2.2.1) oder Ligation (6.2.2.3) durchgeführt werden sollte bzw. 40 µL wenn eine Restriktion der eluierten Fragmente (6.2.2.3) folgen sollte. Die Entsalzung von Ligationsansätzen erfolgte ebenfalls unter den angegebenen Bedingungen, wobei ein Elutionsvolumen von 15 µL genutzt wurde.

6.2.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmide konnten durch Kultivierung entsprechend transformierter *E. coli* Top10-Zellen (6.1.1) amplifiziert werden. Hierfür wurden die jeweiligen Zellen in 4 mL 2YT-Medium kultiviert (6.1.2) und anschließend durch 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 3 320 xg pelletiert. Die Plasmid-DNA wurde aus den Zellen nach Herstellerangaben mit dem *HiYield® Plasmid mini Kit* isoliert. Die Konzentration und Reinheit der erhaltenen Plasmid-Präparation wurde, wie in Abschnitt 6.2.1.10 beschrieben, analysiert.

6.2.1.7 Isolierung von Total-RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Isolierung von Total-RNA erfolgte nach einem Protokoll von Chomczynski und Sacchi^[306] aus bis zu 8×10^8 PC3-Zellen. Die erhaltene, pelletierte RNA wurde in 20 µL PBS gelöst und eine Konzentrations- und Reinheitsanalyse (6.2.1.10) durchgeführt. Darüber hinaus wurde 1 µL der Probe mit 1 µL 1 M NaOH gemischt, mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 6 µL ergänzt und für 5 min auf 80 °C erhitzt. Die Analyse dieser Probe sowie einer Kontrolle, welche die RNA in Abwesenheit von NaOH beinhaltete, erfolgte mittels Gelelektrophorese (6.2.1.2).

6.2.1.8 Phenol-Chloroform-Extraktion

Für die Phenol-Chloroform Extraktion wurde die Transkription (6.2.2.4) mit 1 Volumen Phenol (sauer): Chloroform (1: 1) versetzt, mehrfach invertiert und 30 min bei 4 °C und $16,1 \times 10^3$ xg zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und wie oben beschrieben erneut mit Phenol: Chloroform extrahiert. Die erhaltene wässrige Phase wurde mit 1 Volumen Chloroform versetzt, mehrfach invertiert und wie oben

beschrieben zentrifugiert. Die RNA wurde anschließend aus der wässrigen Phase mittels einer Alkoholpräzipitation (6.2.1.9) gefällt.

6.2.1.9 Alkoholpräzipitation von Nukleinsäuren

Die Präzipitation von Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 1 Volumen eiskaltem Isopropanol und 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,3), bezogen auf das Ausgangsvolumen der Probe. Es folgte eine Inkubation von mindestens 60 min bei -20 °C. Nukleinsäuren wurden durch 30-minütige Zentrifugation bei $16,1 \times 10^3$ xg und 4 °C präzipitiert und mit 50 µL 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt für 15 min bei 4 °C und $16,1 \times 10^3$ xg wurde das erhaltene Pellet bei 37 °C oder Raumtemperatur getrocknet.

6.2.1.10 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die in Nukleinsäuren auftretenden Aromaten Purin und Pyrimidin weisen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm auf. In einem bestimmten Bereich besteht dabei ein linearer Zusammenhang zwischen Absorption und Nukleinsäurekonzentration.

Durch Bestimmung der optischen Dichte bei $\lambda=260$ nm einer Probe (1 µL) mittels der Infinite®200 PRO NanoQuant-Platte am Tecan Infinite® M200 PRO, konnte die Konzentration von DNA bzw. RNA in der Probe ermittelt werden. Es galten dabei folgende Zusammenhänge:

$$\text{OD}_{260}=1 \triangleq 50 \text{ ng doppelsträngige DNA (dsDNA)}/\mu\text{L}$$

$$\text{OD}_{260}=1 \triangleq 40 \text{ ng einzelsträngige DNA (ssDNA)}/\mu\text{L}$$

$$\text{OD}_{260}=1 \triangleq 33 \text{ ng RNA}/\mu\text{L}$$

Gleichzeitig konnte auch die Reinheit der Probe bezogen auf Proteinverunreinigung bestimmt werden. Hierzu wurde die Absorption bei 280 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge weisen aromatische Aminosäuren ein Absorptionsmaximum auf. Die Reinheit der erhaltenen Nukleinsäure wurde automatisiert als Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Eine reine Nukleinsäure-Lösung weist einen $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -Wert von 2.0 auf.^[307]

6.2.1.11 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Klonierte sowie auch die, durch andere Gruppen zur Verfügung gestellten, DNA-Plasmide wurden mittels Sequenzierung durch die Firmen Eurofins MWG GmbH, GATC Biotech AG oder SeqLab überprüft.

6.2.2 Modifikation und Präparation von Nukleinsäuren

6.2.2.1 Ortsgerichtete Mutagenese

Um eine spezifische Mutationen in das Gen codierend für GlaTgs2 einzubringen, wurde in dieser Arbeit die SOE-PCR genutzt. Zunächst wurden hierfür zwei Fragmente des Gens amplifiziert, wobei mittels zweier, überlappender Oligonukleotide die jeweilige Mutation eingeführt wurde. In einem zweiten Schritt erfolgte die Assemblierung der Fragmente und Amplifikation des mutierten Gens.

Die Generierung der Fragmente erfolgte in 50 µL-Ansätzen. Hierfür wurden etwa 50 ng der zu amplifizierenden Matrize mit 0,5 µL dNTP-Mix (25 mM), 1 µL Phusion®-DNA-Polymerase (2 U/µL), 10 µL 5x HF-Puffer sowie je 25 pmol des *for*- und des *rev*-Oligonukleotids (100 µM) versetzt und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 µL ergänzt. Die Verwendung der Phusion®-DNA-Polymerase war hier essentiell, da diese eine Fehlerrate von nur $4,4 \times 10^{-7}$ aufweist und somit das Risiko einer ungewollten Mutation im Vergleich zur Verwendung der *Taq*-Polymerase reduziert wird.

Das Temperaturprogramm der durchgeführten PCR ist in Tabelle 6.2 angegeben.

Tabelle 6.2 **PCR-Programm zur Genamplifikation mittels der Phusion-Polymerase.**

Phase	Temperatur/°C	Dauer/sec	Zyklen
Primäre Denaturierung	98	90	1
Denaturierung	98	30	
<i>Annealing</i>	58-60	45	29
Elongation	72	60	
Finale Elongation	72	300	1

Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch unter Verwendung eines Agarosegels entsprechend ihres Molekulargewichts getrennt (6.2.1.1). Fragmente, welche die erwartete Größe aufwiesen, wurden aus diesem isoliert (6.2.1.2) und hinsichtlich ihrer

Konzentration und Reinheit charakterisiert (6.2.1.5). Für die folgende Assemblierung wurden je 10 ng der Fragmente mit 1 μL Phusion®-DNA-Polymerase (2 U/ μL), 0,5 μL dNTP-Mix (25 mM) und 10 μL 5x HF-Puffer in einem Gesamtvolumen von 45 μL einer Hybridisierungs-PCR unterzogen. Das Standard-Programm hierfür ist in Tabelle 6.3 zusammengefasst.

Tabelle 6.3 **Standard-Programm für eine Hybridisierungs-PCR.**

Phase	Temperatur/°C	Dauer/sec	Zyklen
Primäre Denaturierung	98	120	1
Denaturierung	98	30	7
<i>Annealing</i>	58	60	
Elongation	72	60	

Anschließend wurden je 25 pmol der flankierenden Oligonukleotide zugefügt und das entstandene Konstrukt gemäß den in Tabelle 6.2 angegebenen Bedingungen amplifiziert.

Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch unter Verwendung eines Agarosegels entsprechend ihres Molekulargewichts getrennt (6.2.1.1). Fragmente, welche die erwartete Größe aufwiesen, aus diesem isoliert (6.2.1.2) und hinsichtlich ihrer Konzentration und Reinheit charakterisiert (6.2.1.10). Anschließend wurden die Fragmente restringiert und in den ebenfalls restringierten Vektor pRSET-A ligiert (6.2.2.3). Mit den erhaltenen Plasmiden wurden *E. coli* Top10-Zellen transformiert (6.1.1).

6.2.2.2 Kolonie-PCR

Um die Präsenz eines bestimmten Gens in einer *E. coli*-Kolonie zu untersuchen, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Die *E. coli*-Zellen wurden hierfür zunächst auf LB-Agar-Platten kultiviert (6.1.2) und anschließend wurden einzelne bakterielle Klone in je 20 μL ddH₂O resuspendiert. Je 1 μL dieser Suspension wurde mit 0,25 μL dNTP-Mix (25 mM), 0,5 μL FIREPol®-DNA-Polymerase (5 U/ μL), 2,5 μL 10x PCR-Puffer, 2,5 μL MgCl₂ (25 mM) sowie je 12,5 pmol des *for*- und *rev*-Oligonukleotids versetzt und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 25 μL ergänzt. Da die bei der Kolonie-PCR erhaltenen Fragmente nicht weiter genutzt werden, konnte hierbei auch eine Polymerase ohne Korrekturlesefunktion, wie die FIREPol®-Polymerase, verwendet werden. Das Temperaturprogramm einer Kolonie-PCR ist in Tabelle 6.4 angegeben.

Tabelle 6.4 PCR-Programm zur Durchführung einer Kolonie-PCR.

Phase	Temperatur/°C	Dauer/sec	Zyklen
Primäre Denaturierung	98	120	1
Denaturierung	98	30	29
<i>Annealing</i>	53-58	45	
Elongation	72	70	
Finale Elongation	72	300	1

Nach der Amplifikation wurden die Proben mit 5 µL 6x DNA-Loading Dye versetzt und auf ein Agarosegel (6.2.1.1) aufgetragen. Nach der gelelektrophoretischen Trennung erfolgte die Detektion von Nukleinsäuren durch Ethidiumbromidfärbung (6.2.1.1).

Klone, welche das erwartete *Insert* enthielten wurden kultiviert (6.1.2), die Plasmid-DNA isoliert (6.2.1.6) und sequenziert (6.2.1.11).

6.2.2.3 Restriktion und Ligation

Zur Klonierung von DNA-Plasmiden war es notwendig sowohl das jeweilige *Insert* als auch den Vektor mittels passender Restriktionsendonukleasen vom TypII zu restringieren. Hierbei wurden einzelsträngige Überhänge erzeugt mittels derer eine Hybridisierung von Vektor und *Insert* und so eine effizientere Ligation als bei Vorliegen sogenannter *blunt-end*-Produkte erfolgt. Die Restriktionen erfolgten entsprechend der Herstellerangaben, wobei jeweils 2 µg Vektor in einem Volumen von 20 µL restringiert wurden. Die Restriktion amplifizierter Fragmente wurde in einem Gesamtvolumen von 40 µL durchgeführt, wobei das gesamte PCR-Produkt eingesetzt wurde. Nach der Restriktion erfolgte die Reinigung des Vektors mittels Agarosegelelektrophorese (6.2.1.1) und anschließender Gelextraktion (6.2.1.5). Das restringierte DNA-Fragmente wurden direkt mittels des *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits* gereinigt (6.2.1.5). Zur Elution wurden jeweils 15 µL Elutionspuffer eingesetzt. Vor Durchführung der Ligation wurde Konzentration und Reinheit der restringierten Nukleinsäure überprüft (6.2.1.10).

Für die Ligation wurden 50 ng des restringierten Vektors in Gegenwart eines fünffach molaren Überschusses des restringierten *Inserts* sowie 1 µL T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 µL, welches durch Zugabe von 1x T4-DNA-Ligase Puffer erreicht wurde, für 3 h bei 22 °C bzw. für 16 h bei 16 °C inkubiert. Die Ligation wurde mittels des

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits gereinigt (6.2.1.5) und bis zu 5 µL des gereinigten Ansatzes zur Transformation von *E. coli* Top10-Zellen eingesetzt (6.1.1).

6.2.2.4 T7 *in vitro*-Transkription

Für die Transkription der 16-3 RNA wurde zunächst mittels PCR das Templat amplifiziert. Hierfür wurden 15 µL DNA-Templat (aus einer vorherigen PCR-Reaktion), 10 µL dNTP (25 mM), 100 µL 5x HF-Puffer, 5 µL DMSO, 2,5 µL Phusion®-DNA-Polymerase (2 U/µL) sowie 1 nmol des *for*- und *rev*-Oligonukleotids gemischt und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 500 µL ergänzt. Der PCR-Ansatz wurde zu 100 µL aliquotiert und Amplifikation erfolgte unter Verwendung des in Tabelle 6.5 dargestellten Temperaturprogramms.

Tabelle 6.5 **Temperaturprogramm zur Amplifikation des Transkriptionstemplats.**

Phase	Temperatur/°C	Dauer/sec	Zyklen
Primäre Denaturierung	95	20	1
Denaturierung	95	30	
<i>Annealing</i>	60	30	7-14
Elongation	72	30	
Finale Elongation	72	300	1

Die einzelnen PCR-Ansätze wurden gepoolt und mittels Alkoholpräzipitation gefällt (6.2.1.9). Das erhaltene Pellet wurde für die Transkription in 270 µL ddH₂O aufgenommen und mit 100 µL 5x Transkriptionspuffer, 50 µL NTPs (25 mM), 75 µL MgCl₂ (100 mM) sowie 5 µL T7-RNA-Polymerase versetzt und für 180-240 min bei 37 °C und 300 rpm inkubiert, wobei 30 min vor Ende der Inkubationszeit je 1 µL DNase (1 U/µL) sowie Pyrophosphatase (20 U/µL) hinzugefügt wurden.

Alternativ erfolgte die Transkription in CARO-Puffer. Hierfür wurde das Pellet in 256 µL ddH₂O resuspendiert und mit 166,6 µL 3x CARO-Puffer, 50 µL NTPs (25 mM), 15 µL MgOAc (500 mM) sowie 12,5 µL T7-RNA-Polymerase versetzt und für 180-240 min bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Die Zugabe von DNase und Pyrophosphatase erfolgte wie oben beschrieben.

Zur Fällung der RNA wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion (6.2.1.8) mit anschließender Alkoholpräzipitation (6.2.1.9) durchgeführt oder die RNA direkt mittels Isopropanol gefällt (6.2.1.9). Das erhaltene Pellet wurde in 50 µL PBS resuspendiert. Hierzu wurde es bis zu 3 h unter gelegentlichem vortexen bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Verifizierung, dass RNA vorlag, wurde ein Teil der Probe mit 0,1 M NaOH verdünnt (1: 10), 5 min bei 80 °C inkubiert und mittels Gelelektrophorese (6.2.1.2) analysiert.

6.3 Proteinbiochemische und Immunologische Methoden

6.3.1 Analyse von Proteinen

6.3.1.1 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (dSDS-PAGE)

Proteinhaltige Proben wurden mittels dSDS-PAGE (diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) auf Proteingehalt und Zusammensetzung überprüft. Die dSDS-PAGE gehört zu den chromatographischen Methoden, bei der die Bestandteile unter Einfluss eines elektrischen Feldes in einem Polyacrylamidgel getrennt werden. Den Proben wird dabei SDS zugesetzt. Hierdurch werden enthaltene Proteine denaturiert und erhalten eine negative Nettoladung. Die elektrophoretische Mobilität hängt dann nur noch vom Molekulargewicht ab. Durch Zusatz von Glycin im Sammelgel wird darüber hinaus ein Feldgradient erzeugt, wodurch eine Fokussierung der Probenbestandteile erfolgt.

Für die Herstellung der Gele wurde zunächst das 10 %ige Trenngel angesetzt, in eine Gelkammer (1 mM *Spacerbreite*) eingefüllt und mit 500 µL ddH₂O überschichtet. Die Polymerisation erfolgte über einen Zeitraum von etwa 45 min. Das Wasser wurde abgenommen, das Trenngel mit Sammelgel überschichtet, welches in Gegenwart eines Kammes polymerisierte.

Für die Gelelektrophorese wurden die Probe mit 3x Probenpuffer versetzt, 5 min auf 96 °C erhitzt und hiervon 2-15 µL auf ein 10 %iges Tris-Tricin-Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurden 1x Kathodenpuffer sowie 1x Anodenpuffer eingesetzt. Die Trennung erfolgte in einem elektrischen Feld, wobei für die Fokussierung eine Spannung von 100 V und für die Trennung eine Spannung von 130 V angelegt wurde.

Zur Detektion aller in der Probe enthaltenen Proteine wurde das Gel anschließend unter Schwenken für mindestens 30 min in *Coomassie*-Färbelösung inkubiert. Dieser Farbstoff lagert sich an basische Seitenketten von Aminosäuren an und ermöglicht so die Visualisierung aller in der Probe enthaltenen Proteine. Für die Entfärbung wurde das Gel wiederholt in *Coomassie*-Entfärbelösung erwärmt und unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 6.6 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel eines 10 %igen Tris-Tricin-Gels.

Komponente	Trenngel		Sammelgel	
	Volumen	C_{final}	Volumen	C_{final}
Acrylamid: Bisacrylamid (37,5: 1) 30 %	2 mL	10 % (w/v)	0,64 mL	3,8 % (w/v)
3x Gelpuffer	2 mL	1x	1,24 mL	0,7x
87 % (v/v) Glycerol	0,73 mL	10,6 % (v/v)	–	–
ddH ₂ O	1,26 mL	–	3,12 mL	–
TEMED	3 µL	6,1 mM	3 µL	7,2 mM
10 % (w/v) APS	30 µL	0,05 % (w/v)	30 µL	0,06 % (w/v)

6.3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels dSDS-PAGE

Die Konzentrationsbestimmung gereinigter Proteine erfolgte mit Hilfe einer BSA-Standardreihe und linearer Regression nach gelelektrophoretischer Trennung und *Coomassie*-Färbung (6.3.1.1) der Bestandteile. Hierfür wurde die jeweilige Probe und BSA in verschiedenen Konzentrationen (1,0 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,02 mg/mL in ddH₂O) mit 3x Probenpuffer versetzt. Nach einer Inkubation von 5 min bei 96 °C wurden 2-8 µL der Probe sowie jeweils 15 µL des BSA-Standards auf ein 10 %iges Tris-Tricin-Gel aufgetragen und die Komponenten gelelektrophoretisch getrennt (6.3.1.1). Nach Färbung mittels *Coomassie* (6.3.1.1) wurde die Proteinkonzentration im Vergleich zu der BSA-Standardreihe mittels der *LabImage 1D Gel and Western Blot Analysis*-Software bestimmt.

6.3.1.3 Immunblot

Für die Durchführung eines Immunblots wurde die Probe, die durch dSDS-PAGE aufgetrennt worden war (6.3.1.1), mittels *Semi-Dry-Blot* auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Hierfür wurden das Polyacrylamidgel, die Membran sowie zwei Blotpapiere in Transferpuffer getränkt und in einer Blotapparatur angeordnet. Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von 80 mA/Gel über einen Zeitraum von 1 h auf die Membran übertragen. Die auf der Membran verbliebenen freien Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit 4 % (w/v) BSA (in PBS; Blockierungspuffer 2) unter leichtem Schütteln für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Die Membran wurde dreimal je 5 min mit 10 mL PBS gewaschen, bevor der

Primärantikörper *penta* His-IgG (1: 2 000 in 2 % (w/v) BSA in PBS) zugegeben wurde. Es folgte eine Inkubation von 1 h bei 22 °C unter leichtem Schütteln, wonach der Überstand dekantiert und die Membran dreimal 10 min mit 10 mL PBS gewaschen wurde. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mit dem Enzym-markierten Sekundärantikörper *anti-mouse* IgG-AP (1: 30 000 in 2 % (w/v) BSA in PBS) inkubiert. Nachdem die Membran dreimal für 10 min unter leichtem Schütteln mit PBS gewaschen wurde, erfolgte die Detektion durch Zugabe von 10 mL AP-Detektionspuffer, 100 µL 0,1 % (w/v) NBT und 100 µL 0,5 % (w/v) BCIP. Die Substratumsetzung erfolgte unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur ohne Schwenken.

6.3.2 Reinigung rekombinant produzierter Proteine

Die Enzyme wurden rekombinant in *E. coli*-Zellen produziert und mittels IMAC gereinigt, wobei dies manuell oder mittels des ÄKTA *purifier*TM-Systems erfolgte.

6.3.2.1 Prokaryotische Produktion von hTgs1 und Reinigung mittels IMAC

Der Leserahmen codierend für hTgs1₆₁₈₋₈₅₃ wurde unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI in pRSET-A kloniert (6.2.2.3). Für die Produktion von hTgs1 wurden zunächst *E. coli* Tuner(DE3)pLacI-Zellen mit pRSET-A-hTgs₆₁₈₋₈₅₃ transformiert (6.1.1) und auf LB-Agar-Platten (100 µg/mL Ampicillin) kultiviert (6.1.2). Im Anschluss wurden 10 mL 2YT-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin und Glucose (7.3 g/L) supplementiert und mit den transformierten, kultivierten Zellen inokuliert. Die Kultivierung erfolgte für 16 h bei 37 °C und 200 rpm. Für die Hauptkultur wurde 2YT-Medium wie oben beschrieben supplementiert und mit 2,5 % (v/v) der Vorkultur inokuliert. Die Kultivierung erfolgte für 4 h bei 37 °C und 200 rpm. Die Proteinproduktion wurde durch Zugabe von 0,32 mM IPTG und 2 % (v/v) Ethanol induziert und erfolgte über einen Zeitraum von 20 h bei 17 °C und 200 rpm. Zellen wurden durch Zentrifugation (4 °C, 3 220 xg, 20 min) sedimentiert und bei -20 °C gelagert.

Für die Reinigung wurden die Zellen aus 200 mL der Kultur in 10 mL Lysepuffer resuspendiert und durch Sonifizierung (3x, Stufe 3, 30 %, je 3 min) aufgeschlossen. Zelldebris wurde durch Zentrifugation (4 °C, 12,0x10³ xg, 30 min) entfernt und das Lysat mittels Sterilfilter Filtropur S 0,25 µm filtriert. Die Reinigung erfolgte manuell unter Verwendung von 1 mL Ni-NTA-Agarose bei 4 °C. Zum Waschen wurden jeweils 4-10 mL des Lysepuffers genutzt. Die Elution erfolgte mit 4 mL Waschpuffer sowie 6 mL des Elutionspuffers, wobei Fraktionen von je 2 mL gesammelt wurden. Die Reinigung wurde mittels dSDS-PAGE

überprüft (6.3.1.1). Fraktionen, welche das gereinigte Protein enthielten, wurden vereinigt und mittels Amicon[®] Ultra-15A Zentrifugalfiltereinheiten (MWCO 10 000) dialysiert, wobei dreimal 10 mL Dialysepuffer genutzt wurden. Das gereinigte Protein wurde bei -80 °C gelagert. Die Zusammensetzung der hier verwendeten Puffer entsprach den Vorgaben von Bennaroch *et al.*.^[211]

6.3.2.2 Prokaryotische Produktion von GlaTgs2 und Reinigung mittels IMAC

Für die Produktion von GlaTgs2 sowie dessen Varianten wurden zunächst *E. coli* Tuner(DE3)pLacI-Zellen mit dem entsprechenden Vektorkonstrukt transformiert (6.1.1) und auf LB-Agar-Platten (100 µg/mL Ampicillin) kultiviert (6.1.2). Im Anschluss wurden 4 mL 2YT-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin und Glucose (7.3 g/L) supplementiert und mit den transformierten, kultivierten Zellen inokuliert. Die Kultivierung erfolgte für 16 h bei 37 °C und 200 rpm.

Die Produktionen von GlaTgs2 wurden in Kunststoff-Erlenmeyerkolben durchgeführt. Hierfür wurde 2YT-Medium ebenfalls mit Ampicillin und Glucose supplementiert und mit 2,5 % (v/v) der Vorkultur angeimpft. Die Hauptkulturen wurden für 4 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur gekühlt. Die Proteinproduktion wurde durch Zugabe von 0,32 mM IPTG und 2 % (v/v) Ethanol induziert und erfolgte über einen Zeitraum von 17 h bei 17 °C und 200 rpm.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4 °C, 3 220 xg, 15 min) pelletiert und bei -20 °C gelagert. Für die Reinigung wurden die Zellen aus 200 mL Kultur in 10 mL Lysepuffer resuspendiert, 500 µL Proteaseinhibitor *cOmplete mini* (1 Tablette/1,5 mL ddH₂O) hinzugefügt und die Zellen durch Sonifizierung (3x, Stufe 3, 30 %, je 3 min) aufgeschlossen. Zelldebris wurde durch Zentrifugation (4 °C, 12,0x10³ xg, 30 min) entfernt und das Lysat mittels Sterilfilter Filtropur S 0,25 µm filtriert. Die manuelle Reinigung wurde unter Verwendung von 1 mL Ni-NTA-Agarose bei 4 °C durchgeführt. Zum Waschen wurden jeweils 4-10 mL Lysepuffer genutzt. Die Elution erfolgte mit je 2 mL Waschpuffer A und B sowie je 2 mL Elutionspuffer A und B durch Erhöhung der Imidazol-Konzentration. Alternativ erfolgte die Reinigung mittels des ÄKTA *purifier*[™]-Systems unter Verwendung einer HisTrap[™] FF 1-Säule. Für die Reinigung wurden hierbei Lysepuffer sowie Elutionspuffer B eingesetzt. Nach dem Probenauftrag wurde zunächst mittels Lysepuffer für 2 min, anschließend in Gegenwart von 50 mM Imidazol (10 % Elutionspuffer B) für 8 min gewaschen. Die Elution erfolgte durch einen Gradienten von 10-100 % Elutionspuffer B über einen Zeitraum von 50 min bei einer Flussrate von 1 mL/min. Die Reinigungen wurden

jeweils mittels dSDS-PAGE überprüft (6.3.1.1). Fraktionen, welche das gereinigte Protein enthielten, wurden vereinigt und mittels Amicon® Ultra-15A Zentrifugalfiltereinheiten (MWCO 10 000) dialysiert, wobei dreimal 10 mL Dialysepuffer genutzt wurden. Das gereinigte Protein wurde bei -80 °C gelagert. Die Zusammensetzung der hier verwendeten Puffer entsprach den Vorgaben von Hausmann *et al.*^[229]

6.3.2.3 Prokaryotische Produktion von MTAN und Reinigung mittels IMAC

Für die Produktion von MTAN wurden zunächst *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit dem Plasmid pProEx-MTAN transformiert (6.1.1) und auf LB-Agar-Platten (100 µg/mL Ampicillin) kultiviert (6.1.2). Die Produktion sowie die Reinigung erfolgte entsprechend der Vorschrift von Lee *et al.*, wobei vor der Lyse kein Proteaseinhibitor zugesetzt wurde.^[308] Die manuelle Reinigung erfolgte unter Verwendung von 1 mL Ni-NTA-Agarose bei 4 °C. Hierbei wurde zunächst mit 5 mL Lysepuffer sowie 5 mL Waschpuffer gewaschen und anschließend durch Zugabe von fünfmal je 2 mL Elutionspuffer eluiert. Alternativ erfolgte die Reinigung mittels des ÄKTA purifier™ -Systems unter Verwendung einer HisTrap™ FF 1-Säule. Die Reinigung erfolgte dabei mit dem Programm, welches auch zur Reinigung von GlcTgs2 genutzt wurde (6.3.2.2), wobei hier Lysepuffer sowie Elutionspuffer A von MTAN als Laufmittel eingesetzt wurden. Die Reinigungen wurden mittels dSDS-PAGE (6.3.1.1) überprüft. Fraktionen, welche das gereinigte Protein enthielten, wurden vereinigt und mittels Amicon® Ultra-15A Zentrifugalfiltereinheiten (MWCO 10 000) dialysiert, wobei dreimal 10 mL Dialysepuffer genutzt wurden. Das gereinigte Protein wurde bei -80 °C gelagert. Die Zusammensetzung der hier verwendeten Puffer entsprach den Vorgaben von Biastoff.^[240]

6.3.2.4 Prokaryotische Produktion von LuxS und Reinigung mittels IMAC

Die Produktion sowie die Reinigung erfolgte nach Vorgaben von Hilger *et al.* sowie nach Vorgaben von Biastoff.^[240,309] Für die Produktion von LuxS wurden zunächst *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit dem Plasmid pET-29a-LuxS transformiert (6.1.1), auf LB-Agar-Platten (25 µg/mL Kanamycin) kultiviert (6.1.2) und hiermit eine Vorkultur (10 mL 2YT-Medium mit 25 µg/mL Kanamycin) inokuliert. Nach der Kultivierung wurde die Hauptkultur (400 mL 2YT-Medium mit 25 µg/mL Kanamycin) angeimpft, so dass ein OD₆₀₀-Wert von 0,1 vorlag und diese anschließend bei 37 °C und 200 rpm kultiviert bis OD₆₀₀-Wert von 1,0 erreicht war. Die Proteinproduktion wurde mit 0,8 mM IPTG induziert und erfolgte über einen Zeitraum von 6 h bei 37 °C und 200 rpm. Zellen wurden durch Zentrifugation (4 °C, 3 320 xg, 20 min) sedimentiert und bei -20 °C gelagert.

Für die Reinigung wurden Zellen aus 200 mL Kultur in 10 mL Lysepuffer resuspendiert und durch Sonifizierung (3x, Stufe 3, 30 %, je 3 min) aufgeschlossen. Zelldebris wurde durch Zentrifugation (4 °C, $12,0 \times 10^3$ xg, 30 min) entfernt und Lysat mittels Sterilfilter Filtropur S 0,25 µm filtriert. Die manuelle Reinigung wurde unter Verwendung von 1 mL Ni-NTA-Agarose bei 4 °C durchgeführt. Zum Waschen wurden jeweils 5 mL Lysepuffer genutzt. Die Elution erfolgte mit je 2 mL Waschpuffer A und B sowie je 2 mL Elutionspuffer A-D durch Erhöhung der Imidazolkonzentration. Alternativ erfolgte die Reinigung mittels des ÄKTA *purifier*TM-Systems unter Verwendung einer HisTrapTM FF 1-Säule. Die Reinigung erfolgte hierbei mit dem Programm, welches auch zur Reinigung von GlaTgs2 genutzt wurde (6.3.2.2), wobei hier Lysepuffer sowie Elutionspuffer D von LuxS als Laufmittel eingesetzt wurden. Die Reinigungen wurden mittels dSDS-PAGE überprüft (6.3.1.1). Fraktionen, welche das gereinigte Protein enthielten, wurden vereinigt und mittels Amicon[®] Ultra-15A Zentrifugalfiltereinheiten (MWCO 10 000) dialysiert, wobei dreimal 10 mL Dialysepuffer genutzt wurden. Das gereinigte Protein wurde bei -80 °C gelagert.

6.4 Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivität

6.4.1 Bestimmung der Enzymaktivitäten von MTAN und LuxS

Die Aktivität der Enzyme MTAN und LuxS wurde wie folgt analysiert: Es wurde 100 mM Hepes (pH 8,0) vorgelegt, so dass ein finales Volumen von 300 µL erreicht werden konnte und MTAN (2 µM) sowie LuxS (9 µM) hinzugefügt. Die Proben wurden für 10 min bei 37 °C inkubiert, bevor 30 µL einer AdoHcy-Stammlösung zugefügt wurden. Die Konzentration dieser Stammlösung wurde so gewählt, dass durch die Zugabe von 10 % (v/v) die gewünschte finale Konzentration AdoHcy **13** erreicht werden konnte. Die Reaktionen wurden nach Zugabe von AdoHcy **13** für bis zu 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Detektion von Homocystein erfolgte nach Zugabe von 30 µL des Reaktionsansatzes zu 90 µL der *Quenching*-Lösung (mit 240 µM DTNB) nach 3, 5, 10 bzw. 15 min und Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 414 nm mittels des Tecan Infinite[®] M200.

6.4.2 Colorimetrischer Nachweis der Trimethylguanosinsynthaseaktivität

Für den colorimetrischen Assay wurde gereinigtes hTgs1 (2 µM) mit MTAN (3 µM), LuxS (9 µM), AdoMet (**12**, 150 µM) und m⁷GTP (200 µM) bzw. ddH₂O (Kontrolle) in 100 mM Hepes (pH 8,0; mit N₂ über einen Zeitraum von 30-60 min entgast) gemischt. Die Reaktionen wurden bei 37 °C für bis zu 90 min inkubiert. Die Biokonversionen wurden durch Zugabe von

30 μL des Reaktionsansatzes zu 90 μL der *Quenching*-Lösung (mit 240 μM DTNB) nach 30, 60 und 90 min gestoppt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 414 nm mittels des Tecan Infinite® M200 bestimmt.

Zur Charakterisierung kleiner Moleküle hinsichtlich ihres inhibitorischen Potentials gegenüber hTgs1, wurde dieses Enzym in einer finalen Konzentration von 9 μM mit LuxS (144 μM), MTAN (48 μM), m^7GTP (200 μM) bzw. ddH_2O (Kontrolle) gemischt und der jeweilige potentielle Inhibitor in einer finalen Konzentration von 25 μM sowie 100 μM addiert. Das Reaktionsvolumen wurde mit 100 mM Hepes (pH 8,0) auf 90 μL ergänzt, bevor 10 μL AdoMet (**12**, 3,54 mM) hinzugefügt wurden. Die Proben wurden bei 37 °C für bis zu 100 min inkubiert, wobei nach 40, 70 und 100 min die Biokonversion wie oben beschrieben gestoppt und analysiert wurde.

6.4.3 Colorimetrischer Nachweis der Trimethylguanosinsynthaseaktivität aus Lysat

Für die Durchführung des colorimetrischen Assay aus Lysat wurden zunächst *E. coli* TunerTM(DE3)pLacI-Zellen mit dem Plasmid pRSET-hTGS1₆₁₈₋₈₅₃ bzw. pRSET-A transformiert (6.1.1) und für die Proteinproduktion (6.1.2, 6.3.2.1) in einem Maßstab von 4 mL genutzt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (4 °C, 3 320 xg, 20 min) und für mindestens 24 h bei -20 °C gelagert.

Die Zellen wurden in 100 μL Lysepuffer hTgs1 (supplementiert mit Lysozym and DNase) resuspendiert und 1 h bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Zelldebris wurde durch Zentrifugation (4 °C, $16,1 \times 10^3$ xg, 10 min,) entfernt, 50 μL des erhaltenen Überstands mit 1 Volumen Assay-Reaktionspuffer A bzw. B (Hepes zuvor jeweils entgast mit N_2 über einen Zeitraum von 30-60 min) versetzt und bei 37 °C für bis zu 60 min inkubiert. Die Biokonversionen wurden durch Zugabe von 30 μL des Reaktionsansatzes zu 90 μL der *Quenching*-Lösung (mit 240 μM DTNB) nach 30 und 60 min gestoppt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 414 nm mittels des Tecan Infinite® M200 bestimmt.

6.4.4 Durchführungen von Biokonversionen für die chromatographische Analyse

6.4.4.1 Nachweis natürlicher Enzymaktivität

Zum Nachweis der natürlichen Enzymaktivität wurden in 20 μL Gesamtvolumen 2 μL hTgs1 bzw. GlTgs2 oder Varianten hiervon (ca. 3 μM) mit 200 μM m^7GTP und 300 μM AdoMet **132** inkubiert, wobei 100 mM Hepes (pH 8,0) als Puffer eingesetzt wurde. Die Reaktion wurde vor und nach der Inkubation (1 h, 37 °C, 300 rpm) durch Zugabe von 1/10 Volumen

Perchlorsäure (1 M) gestoppt, 1 min auf Eis inkubiert, 10 min bei 4 °C und $16,1 \times 10^3$ xg zentrifugiert und der erhaltene Überstand mittels RP-HPLC (6.4.5) sowie gegebenenfalls MALDI-TOF-MS (6.4.6.1) analysiert. Für die massenspektrometrische Analyse erfolgte zunächst allerdings entweder eine 30-minütige Dialyse gegen ddH₂O oder 10 mM Tris (pH 8,0) unter Verwendung der MF-Millipore™ Membran Filter (0,025 µm) oder die Reaktion wurde direkt unter Verwendung von 10 mM Tris (pH 8,0) als Puffer durchgeführt. Die Thermostabilitäten der Enzyme wurden entsprechend dieser Vorschrift bestimmt, wobei die jeweiligen Enzyme vor der Zugabe zu einer Biokonversion zunächst 15 min bei einer Temperatur zwischen 37 °C und 45 °C inkubiert wurden. Nach der Biokonversion wurde die Produktbildung mittels RP-HPLC analysiert (6.4.5). Die jeweils generierte Menge der hypermethylierten Kappe m^{2,7}GTP in Abhängigkeit der Präinkubationstemperatur des Enzyms wurde mittels eines Boltzmann-Plots (*Origin*) dargestellt und hieraus die Temperatur ermittelt die eine Halbierung der Enzymaktivität bewirkt.

6.4.4.2 Nachweis promiskuitiver Aktivität

Für die Charakterisierung der Wildtyp-Enzyme hinsichtlich promiskuitiver Aktivität wurden 20-30 µM des jeweiligen Enzyms mit 275 µM Cap (**9**, m⁷GpppA), 1,1 mM AdoPropen **1**, 4 µM MTAN und 3 µM LuxS gemischt und mit Reaktionspuffer 2 auf ein Reaktionsvolumen von 40 µL ergänzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 300 rpm für 4 h bevor die Biokonversion durch Zugabe von Perchlorsäure gestoppt (6.4.4.1) und mittels RP-HPLC (6.4.5) analysiert wurde.

6.4.4.3 Charakterisierung des Substratspektrums der Variante GlaTgs2-V34A

Für die Charakterisierung des Substratspektrums wurden 50-120 µM GlaTgs2-V34A mit 0,360 mM m⁷GpppA **9** sowie 0,4-1,2 mM des jeweiligen Cosubstrats (2.1) in Gegenwart von 4 µM MTAN und 3 µM LuxS inkubiert. Das Gesamtvolumen der Reaktion von 10 µL wurde durch Zugabe von PBS (pH 7,4) erreicht. Die Reaktion wurde vor und nach der Inkubation (3 h, 37 °C, 300 rpm) durch Zugabe von 1/10 Volumen Perchlorsäure (1 M) gestoppt, 1 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei 4 °C und $16,1 \times 10^3$ xg zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde mittels RP-HPLC (6.4.5) sowie MALDI-TOF-MS (6.4.6.1) analysiert. Für die massenspektrometrische Analyse wurde die Biokonversion 30 min gegen ddH₂O unter Verwendung eines MF-Millipore™ Membran Filters (0,025 µM) dialysiert.

6.4.4.4 Bestimmung kinetischer Parameter sowie des TTN-Werts

Die Bestimmung der Substrataffinität gegenüber dem Kappen-Analogon **9** sowie AdoPropen **1** wurde wie in 6.4.4.3 beschrieben durchgeführt, wobei jeweils das Kappen-Analogon **9** in Konzentrationen von 2-300 μM bzw. AdoPropen **1** (diasteromerenrein) in Konzentrationen von 44-875 μM eingesetzt wurde. Die Reaktionen wurden bereits nach 15 und 30 min Inkubation bei 37 °C gestoppt (6.4.4.1) und mittels RP-HPLC analysiert (6.4.5). Produkt- und Eduktsignal wurden integriert und aus diesen Werten die lineare Zunahme des Produkts $\text{m}^{2,7}\text{GpppA}$ **10** bzw. $\text{N}^2\text{-Allyl-m}^7\text{GpppA}$ **14** in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Die Steigung der erhaltenen Geraden entsprach der Anfangsgeschwindigkeit des Enzyms in Gegenwart der jeweiligen Substratkonzentration.

Die Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 6.1) ermöglicht die Bestimmung der Substrataffinität durch Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit als Funktion der Substratkonzentration (Origin Hill Fit).

$$v_0 = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

Gleichung 6.1 **Michaelis-Menten-Gleichung zur Bestimmung der Substrataffinität aus der direkten Auftragung von Anfangsgeschwindigkeit v_0 gegen Substratkonzentration $[S]$.** Aus dieser Gleichung geht hervor, dass eine halbmaximale Geschwindigkeit $v_{\max}/2$ erreicht wird, wenn die vorliegende Substratkonzentration K_M entspricht.

Durch diese Art der direkten Auftragung wird eine Hyperbel erhalten, welche sich dem Wert der maximalen Geschwindigkeit des Enzyms annähert. Die maximale Geschwindigkeit beschreibt den Substratumsatz pro Zeiteinheit, der durch weitere Steigerung der Substratkonzentration nicht verbessert werden kann, da jedes Enzym zu jedem Zeitpunkt bereits in einen Katalysezyklus involviert ist. Die halbmaximale Geschwindigkeit liegt vor, wenn K_M und Substratkonzentration den gleichen Wert annehmen, so dass K_M direkt aus dem erhaltenen Diagramm abgelesen werden kann. Je niedriger dieser Wert, umso höher ist dabei die Affinität des Enzyms gegenüber dem Substrat, was bedeutet, dass eine Sättigung aller Enzyme in der jeweiligen Reaktion schon bei geringeren Konzentrationen an Substrat erreicht werden kann.

Zur Bestimmung der Wechselzahl k_{cat} wurden die Reaktionen wie in 6.4.4.3 beschrieben durchgeführt, wobei die Analyse bereits nach 15 und 30 min Inkubation erfolgte (6.4.4.1, 6.4.5). Aus den Chromatogrammen konnte die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit ermittelt und über diese lineare Zunahme der Produktkonzentration ($d[P]$) in bestimmten Zeitintervall

(dt) bei bekannter Enzymkonzentration (E_0), gemäß Gleichung 6.2, die Anzahl an Reaktionen berechnet werden, die jedes einzelne Enzym in einem bestimmten Zeitintervall katalysiert.

$$k_{cat} = \frac{\left(\frac{d[P]}{dt}\right)_{max}}{E_0}$$

Gleichung 6.2 **Gleichung zur Bestimmung der Wechselzahl.** Die katalytische Wechselzahl k_{cat} beschreibt die Anzahl an Umsätzen, die ein Enzym bei maximaler Geschwindigkeit pro Zeiteinheit katalysieren kann. Sie ergibt sich aus dem Quotienten von Änderung der Produktkonzentration in bestimmtem Zeitintervall ($d[P]/dt$) und Enzymkonzentration (E_0).

Für die Bestimmung kinetischer Parameter wurden das Wildtyp-Enzym und die Variante GlaTgs2-V34A jeweils gleichen Konzentrationen eingesetzt (4-14 μ M).

Zur Bestimmung der TTN-Werte wurden Enzyme und die jeweiligen Substrate in Konzentrationen eingesetzt, die einen Umsatz während der gesamten Inkubationszeit von 60 min bzw. 180 min ermöglichten. Der TTN-Wert wurde als Quotient aus Produkt- und Enzymkonzentration bestimmt.

6.4.4.5 Überprüfung der Regiospezifität

Um die Regiospezifität der Variante GlaTgs2-V34A mit AdoPropen **1** als Cosubstrat zu überprüfen, wurde, entsprechend der Vorschrift von Weller *et al.*,^[310] eine Blockierung des Ziel-Atoms durch Methylierung und anschließende Biokonversion mit dem AdoMet-Analogon AdoPropen **1** durchgeführt. Hierfür wurde das m^7 GpppA (**9**, 275 μ M) durch GlaTgs2-V34A innerhalb von 30 min bei 37 °C und 300 rpm in Gegenwart von MTAN (3 μ M) und LuxS (9 μ M) unter Verwendung von AdoMet (**12**, 307 μ M) als Cosubstrat in PBS premethyliert, wobei die quantitative Umsetzung mittels RP-HPLC (6.4.5) überprüft wurde. Dem Reaktionsansatz wurde nach der Premethylierung AdoPropen (**1**, 560 μ M) zugesetzt und für weitere 2 h bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Die Reaktion wurde wie in 6.4.4.1 gestoppt und mittels RP-HPLC (6.4.5) analysiert.

6.4.5 Analyse der Biokonversionen sowie chemischer Modifizierungen mittels HPLC

Die Analysen sowohl der Biokonversionen (6.4.4, 6.6.1.1, 6.6.2, 6.6.3) als auch der Thiol-En-Click-Reaktionen (6.6.1.1) wurde mittels einer Agilent 1260 *Infinity* HPLC, ausgestattet mit einem *Diode Array Detector* (190 nm-640 nm), durchgeführt und erfolgten unter Verwendung einer NUCLEODUR® C18 Pyramid-Säule (5 μ m, 125x4 mm). Es wurden 3 μ L der

jeweiligen Probe injiziert und entsprechend des Protokolls von Monecke *et al.* eluiert.^[227] Die Elution erfolgte bei einer Flussrate von 1 mL/min mittels eines Gradienten von 0-30 % (v/v) Acetonitril in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,5; Lösungsmittel A) innerhalb von 13 min, nachdem ein isokratischer Schritt von 5 min in Gegenwart von 100 % des Lösungsmittels A erfolgt war. Die Detektion erfolgte *on-line* durch Messung der Absorption bei 260 nm und 300 nm.

6.4.6 Massenspektrometrische Analyse

6.4.6.1 MALDI-TOF-MS

Die MALDI-TOF-MS-Messungen wurden mittels eines Bruker *UltrafleXtreme Smartbeam II* Laser-Systems durch den MS-Service der Universität Hamburg durchgeführt. Hierfür wurden 1 µL der Probe mit 1 µL HCCA und 1 µL Ammoniumfluorid (100 µM) kokristallisiert. Die Messungen erfolgten im Reflektormodus unter Verwendung folgender Parameter: Positiver Ionenmodus: Massenbereich m/z 500-3500, Matrix *Suppression* bis m/z 450, *sample rate* 4 Gs/s, *Ion Source* 1: 25 kV, *Ion Source* 2: 22,5 kV, *Lens* 7,9 kV, *Reflector* 1: 26,45 kV, *Reflector* 2: 13,55 kV, *Detector Voltage Reflector* 2200 V, *Laser Attenuator Offset* 70 , *Range* 15 %, *Laserintensität* 54 %, *Size* 5_Ultra.

Negativer Ionenmodus: Massenbereich m/z 700-3500, Matrix *Suppression* bis m/z 650, *sample rate* 4 Gs/s, *Ion Source* 1: 20 kV, *Ion Source* 2: 17,95 kV, *Lens* 6,5 kV, *Reflector* 1: 21,15 kV, *Reflector* 2: 10,75 kV, *Detector Voltage Reflector* 2200 V, *Laser Attenuator Offset* 71 %, *Range* 20 %, *Laserintensität* 44 %, *Size* 4_Large. Pro Spektrum wurden mindestens 1000 Schüsse initiiert.

Die Matrix HCCA wurde als gesättigte Lösung in ddH₂O: Acetonitril (2: 1) angesetzt und mit 0,1 % (v/v) TFA supplementiert.

6.4.6.2 ESI-TOF-MS

Die ESI-TOF-MS-Messungen wurden mittels eines Agilent 6224 ESI-TOF-Systems gekoppelt an eine Agilent HPLC 1200 *Series*-Anlage durch den MS-Service der Universität Hamburg durchgeführt.

Die Messung synthetisierter Verbindungen erfolgte unter Verwendung folgender Parameter: *Gas Temp*: 325 °C, *Drying Gas* 10 L/min, *Nebulizer* 15 psig, *VCap* 4000V, *Fragmentor* 200 V, *Skimmer* 65 V, *OCT 1 RF Vpp* 750 V, *Messbereich* m/z 110-3200.

HPLC-ESI-TOF-MS-Messungen wurden unter Verwendung desselben Systems sowie gleicher Parameter durchgeführt, lediglich für den *Nebulizer* wurden hierbei 30 psig eingestellt.

Für die chromatographische Trennung wurden 10 µL der jeweiligen Reaktion injiziert und mittels einer NUCLEODUR® Hilic (5 µm, 125x3 mm) getrennt. Vor der Elution erfolgte ein fünfminütiger isokratischer Schritt, wobei eine 10 % (v/v) 20 mM Ammoniumacetat (pH 5,3) als Laufmittel eingesetzt wurde. Die Elution erfolgte bei einer Flussrate von 0,6 mL/min durch einen Gradienten von 10-90 % (v/v) einer 20 mM Ammoniumacetat-Lösung (pH 5,3) innerhalb von 13 min, wobei Acetonitril als zweites Lösungsmittel eingesetzt wurde.

6.5 Chemische Methoden

6.5.1 Synthesen der AdoMet-Analoga

Die AdoMet-Analoga AdoPropen (5'-[(R/S)-[(3S)-3-Amino-3-carboxypropyl]prop-2-enylsulfonio]-5'-desoxyadenosin) **1**, 2-Me-AdoPropen (5'-[(R/S)-[(3S)-3-Amino-3-carboxypropyl]2-methyl-prop-2-enyl-sulfonio]5'-desoxyadenosin) **2** sowie AdoBenzyl (5'-[(R/S)-[(3S)-3-Amino-3-carboxypropyl]-methylbenzylsulfonio]-5'-desoxyadenosin) **3**, wurden entsprechend der Vorschrift von Dalhoff *et al.* synthetisiert.^[234] Die AdoMet-Analoga wurden aus dem erhaltenen Rohextrakt mittels RP-HPLC unter Verwendung einer NUCLEODUR® C18 Pyramid (5 µm, 125x10 mm) gereinigt. Die Elution erfolgte durch einen wässrigen Acetonitril-Gradienten von 0-7 % (v/v) innerhalb von 15 min. Beide Laufmittel waren hierbei mit 0,01 % (v/v) TFA supplementiert.

Fraktionen, welche das gewünschte Produkt enthielten, wurden vereinigt und lyophilisiert. Der resultierende weiße Feststoff wurde in 50-100 µL ddH₂O gelöst und die Konzentration durch Messung der Absorption bei $\lambda=260$ nm mittels des *SmartSpec™ Plus Spectrophotometers* bestimmt, wobei Verdünnung von 1: 50, 1: 100 und 1: 200 in ddH₂O angefertigt wurden. Als molarer Extinktionskoeffizient wurde für alle Analoga ein Wert von $15\,400\text{ mol L}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ^[234] angenommen. Gereinigte Produkte wurden mittels ESI-TOF-MS (6.4.6.2) analysiert.

6.5.2 Synthesen der Substrate für Click-Reaktionen

6.5.2.1 Synthese von Biotinthiol (2-(Biotinamido)ethanthiol) **5**

Für die chemische Modifizierung der allylierten Kappen sollte die Thiol-En-Click-Reaktion etabliert werden. Als Markermolekül wurde hierfür Biotinthiol **5** entsprechend der Vorschrift

von Lo Conte *et al.*^[236] synthetisiert und das erhaltene Produkt mittels ESI-TOF-MS analysiert (6.4.6.2). Von dem gereinigten Produkt wurde eine 200 mM Lösung in DMF hergestellt, die unter Luftausschluss bei 4 °C gelagert wurde.

6.5.2.2 Synthese der Tetrazole

Neben der Thiol-En-Click-Reaktion, sollten auch die CuAAC sowie die Photoclick-Reaktion zur chemischen Modifizierung der enzymatisch markierten Kappe etabliert werden, wobei für die Photoclick-Reaktion verschiedene Tetrazole als Substrate synthetisiert werden mussten. Die Synthese von 5-(4-Methoxyphenyl)-2-phenyl-2*H*-tetrazol **6**, 5-(4-Methoxybenzoat)-2-phenyl-2*H*-tetrazol **7** sowie 5-(Biphenyl)-2-phenyl-2*H*-tetrazol **8** erfolgte dabei nach einer Vorschrift von Ito *et al.*^[237] Die erhaltenen Rohprodukte wurden mittels Silica-Gel (0,02-0,045 mm; 230-400 mesh) unter Verwendung von Toluol als mobiler Phase gereinigt. Eine DC-Analyse (DC Fertigfolien Alugram® Xtra SIL G/UV, Toluol als mobile Phase) der Fraktionen zeigte, dass die Produkte durch Anregung mit einer Wellenlänge von 365 nm detektiert werden konnten und Retentionsfaktoren von 0,3-0,5 aufwiesen.

6.6 Chemo-enzymatische Markierungen

6.6.1 Markierung der allylierten mRNA-Kappe mittels Thiol-En-Click-Reaktion

Durch die im Folgenden beschriebenen Methoden konnte erfolgreich eine kovalente Verknüpfung der mRNA-Kappe mit Biotin generiert werden. Allerdings war es nicht möglich eine entsprechende Vorschrift zur Markierung Kappen-tragender RNA zu adaptieren.

6.6.1.1 Markierung des Kappen-Analogons m⁷GpppA mittels Thiol-En-Click-Reaktion

Für die chemo-enzymatische Modifizierung von m⁷GTP/m⁷GpppA mittels Thiol-En-Click-Reaktion wurde 1 mM des Kappen-Analogons **9** mit AdoPropen (**1**, 0,5-1 mM) durch GlaTgs2-V34A (5-120 µM) umgesetzt. Zur Degradation entstehenden S-Adenosylhomocysteins **13** wurden 4 µM MTAN sowie 3 µM LuxS zugesetzt und die Reaktion mit PBS (pH 7,4) auf ein Endvolumen von 10 µL ergänzt. Der enzymkatalysierte Transfer der Allylfunktion erfolgte über einen Zeitraum von 3 h bei 37 °C und 300 rpm. Die Reaktion wurde, wenn nicht anders angegeben, durch Zugabe von 1/10 Volumen Perchlorsäure gestoppt, 1 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei 4 °C und 16,1x10³ xg zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde für etwa 30 sec mit Argon entgast und in eine *Glovebox* eingeschleust.

Gegebenenfalls wurde der Erfolg des enzymkatalysierten Transfers mittels RP-HPLC analysiert (6.4.5).

Das *in situ* generierte N^2 -Allyl- m^7 GpppA **14** wurde mittels der Thiol-En-Click-Reaktion kovalent mit Biotin verknüpft. Hierzu wurden 20 μ L der Reaktion welche etwa 800 μ M **14** enthielt, mit 40 mM Biotinthiol (**5**, 5 μ L eines 200 mM Stocks in DMF) und 800 μ M VA-044 (0,1 μ L eines 200 mM Stocks in ddH₂O) versetzt und bis zu 8 h bei 44 °C unter Luftausschluss inkubiert. Die Analyse der Reaktionen erfolgte mittels RP-HPLC (6.4.5) und MALDI-TOF-MS (6.4.6.1).

Für Versuche bezüglich der Nachweisgrenze beziehungsweise des Einflusses der Biotinthiolkonzentration auf die Ausbeute an **16**, wurden die entsprechenden Konzentrationen angepasst.

6.6.1.2 Versuche zur Biotinylierung von mRNA mittels Thiol-En-Click-Chemie

Für die mögliche Etablierung eines Protokolls zur Markierung von RNA mittels Thiol-En-Click-Reaktion wurde zunächst 16-3 RNA durch *in vitro*-Transkription hergestellt (6.2.2.4), gelelektrophoretisch getrennt und gereinigt (6.2.1.4). Vor der *Capping*-Reaktion wurde die RNA 5 min auf 65 °C erhitzt und direkt auf Eis überführt. Es wurden 0,12 nmol dieser RNA mit 1 μ L *Vaccinia Capping* Enzym (10 U/ μ L), 1 μ L GTP (10 mM) und 2 μ L AdoMet (**12**, 2 mM) in einen Gesamtvolumen von 20 μ L VCE-Puffer gemischt. Als Kontrolle wurde die Reaktion in Abwesenheit von AdoMet **12** durchgeführt. Die Proben wurden 45 min bei 37 °C inkubiert, anschließend 5 min auf 65 °C erhitzt und die RNA wurde mittels Alkoholpräzipitation gefällt (6.2.1.9).

Die RNA wurde in 20 μ L einer Lösung aus 9 μ M GlaTgs2-V34A, 1,6 mM AdoPropen **1** sowie 1,5 μ L RiboLock RNase Inhibitor in PBS resuspendiert, 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die RNA mittels Alkoholpräzipitation (6.2.1.9) gefällt. Die Pellets wurden in 22 μ L 0,3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,3) resuspendiert und 10 sec mit Argon entgast. Für die Thiol-En-Click-Reaktion wurden 9,47 mM Biotinthiol **5** (6.5.2.1) sowie 947 μ M VA-044 zugefügt und unter Luftausschluss bei 44 °C für bis zu 8 h inkubiert. Es wurden 2 μ L der Proben mit 8 μ L einer 6,3 μ M Streptavidin-Lösung (in 0,3 M Natriumacetat-Lösung, pH 5,3) versetzt, gelelektrophoretisch unter Verwendung eines 7,5 %igen nativen Polyacrylamidgels getrennt und mittels Ethidiumbromidfärbung analysiert (6.2.1.3).

Alternativ wurden 2,4 nmol der 16-3 RNA mit 5 μ L *Vaccinia Capping* Enzym (50 U/ μ L), 5 μ L GTP (10 mM) und 5 μ L AdoMet (2 mM) in einen Gesamtvolumen von 50 μ L VCE-Puffer gemischt. Als Kontrolle wurde die Reaktion in Abwesenheit von AdoMet **12**

durchgeführt. Die Proben wurden 45 min bei 37 °C inkubiert, 5 min auf 65 °C erhitzt und RNA wurde mittels Alkoholpräzipitation gefällt (6.2.1.9).

Die RNA wurde in 20 µL einer Lösung aus 14 µM GlaTgs2-V34A, 1,1 mM AdoPropen **1** sowie 3,3 µL RiboLock RNase Inhibitor in PBS resuspendiert, 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend RNA mittels Alkoholpräzipitation (6.2.1.9) gefällt. Die Pellets wurden in 22 µL 0,3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,3) resuspendiert und 10 sec mit Argon entgast. Für die Thiol-En-Click-Reaktion wurden 22 µL der RNA-Lösung mit 17 mM Biotinthiol **5** (6.5.2.1) sowie 847 µM VA-044 unter Luftausschluss bei 44 °C für bis zu 6 h inkubiert. Für die Analyse wurden 0,5 µL der Reaktion mit 9,5 µL einer 6,3 µM Streptavidin-Lösung (in PBS, pH 7,4) versetzt und 1 h bei 22 °C inkubiert. Die Proben wurden mit 6x DNA-Loading Dye versetzt und mittels eines 8,5 %igen denaturierenden Polyacrylamidgels analysiert (6.2.1.2).

Da nach dieser Analyse keine erfolgreiche Biotinylierung festgestellt werden konnte, wurde ein Teil der Probe mittels eines *Dot Blots* analysiert. Hierfür wurden 2 µL der Probe nach durchgeführter Thiol-En-Click-Reaktion mit 8 µL 0,3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,3) versetzt und die RNA mittels Alkoholpräzipitation gefällt (6.2.1.9). Das erhaltene Pellet wurde in 10 µL ddH₂O resuspendiert und 6 µL auf einer Nylonmembran durch Bestrahlung mit UV-Licht (120 J) immobilisiert. Die Membran wurde für 1 h bei Raumtemperatur in RNA-Blockierungspuffer 1 inkubiert und anschließend zweimal für jeweils 10 min mit 10 mL PBS (pH 7,4) gewaschen. Es folgte die Zugabe von Extravidin-AP (1: 10 000 in 2 % (w/v) BSA in PBS) und eine einstündige Inkubation bei 22 °C bevor erneut gewaschen wurde. Die Detektion erfolgte durch Zugabe von 10 mL Detektionspuffer sowie je 50 µL NBT und BCIP. Im Folgenden sollte die Möglichkeit zur Immobilisierung von mRNA aus Total-RNA mittels der chemo-enzymatischen Strategie überprüft werden. Hierfür wurde zunächst RNA aus PC3-Zellen isoliert (6.2.1.7). Es wurden 26 µL der isolierten RNA (853 ng/µL) mit 10 µL GlaTgs2-V34A (15 µM), AdoPropen (**1**, 5,8 mM) sowie 1 µL RiboLock RNase Inhibitor versetzt. Ein Teil der Probe wurde als Kontrolle abgenommen und bei -20 °C gelagert. Die Biokonversion wurde bei 37 °C und 300 rpm für 90 min durchgeführt. Die Proben wurden anschließend etwa 30 sec mit Argon entgast, hiervon 10 µL mit 2 µL Biotinthiol (**5**, 200 mM) sowie 0,1 µL VA-044 (200 mM) versetzt und bei 44 °C für 6 h inkubiert. Es wurden 2,5 µL der Reaktionen mit 10 µL Streptavidin-Beads in einem Gesamtvolumen von 15 µL (mit PBS pH 7,4) für 1 h bei 4 °C und 600 rpm inkubiert. Die Matrix wurde durch Zentrifugation abgetrennt (4 °C, 16,1x10³ xg, 2,5 min) und 2,5 µL des Überstandes mit 2,5 µL PBS (pH 7,4) sowie 5 µL 2x RNA-Loading Dye versetzt. Die Analyse erfolgte nach gelelektrophoretischer Trennung (10 %iges denat. Polyacrylamidgel, 6.2.1.2) durch Ethidiumbromidfärbung.

Da die Reaktion nicht erfolgreich war, wurde in einem weiteren Versuch nach der Biokonversion eine Alkoholpräzipitation der RNA durchgeführt (6.2.1.9) und das Pellet in 20 μL 0,3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,3) resuspendiert, bevor die Thiol-En-Click-Reaktion durchgeführt wurde. Die Immobilisierung erfolgte dann wie oben beschrieben unter Verwendung von Streptavidin-*Beads*, wobei diese vor der Zentrifugation für 5 min auf 80 °C erhitzt wurden.

6.6.2 Markierung der allylierten mRNA-Kappe mittels Photoclick-Reaktion

Für die chemo-enzymatische Modifizierung von $m^7\text{GpppA}$ mittels der Photoclick-Reaktion wurden 1 mM des Kappen-Analogons $m^7\text{GpppA}$ **9** mit AdoPropen (**1**, 0,5-1 mM) durch GluTgs2-V34A (5-120 μM) umgesetzt. Zur Degradation des entstehenden S-Adenosylhomocysteins **13** wurden 4 μM MTAN sowie 3 μM LuxS zugesetzt und die Reaktion mit PBS (pH 7,4) auf ein Endvolumen von 10 μL ergänzt. Der enzymkatalysierte Transfer der Allylfunktion erfolgte über einen Zeitraum von 4 h bei 37 °C und 300 rpm. Zur Degradation verbliebenen AdoMet-Analogons wurde die Reaktion anschließend 25 min auf 68 °C erhitzt. Hierbei denaturiertes Protein wurde durch Zentrifugation (4 °C, $16,1 \times 10^3 \text{ xg}$, 10 min) sedimentiert und der erhaltene Überstand 20 min mittels eines MF-Millipore™ Membran Filters gegen PBS (pH 7,4) dialysiert. Es wurden 8 μL der dialysierten Reaktion in einer schwarzen 364-well Platte zu 8 μL Acetonitril gegeben, wonach die Zugabe von 0,2 μL Methoxy-Tetrazol **6** ($c_{\text{final}}=625 \mu\text{M}$) bzw. 0,4 μL Benzoat-Tetrazol **7** ($c_{\text{final}}=1,25 \text{ mM}$) (6.5.2.2) erfolgte. Die Reaktion wurde durch Pipettieren gemixt, 5 μL hiervon in eine zweite Vertiefung überführt und das Tetrazol durch fünfminütige Bestrahlung bei 254 nm durch eine UV-Handlampe aktiviert, wobei die Lampe direkt oberhalb der Platte angebracht wurde. Anschließend wurden 7,5 μL der Reaktion in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit 2,5 μL Acetonitril gespült und der Reaktion zugeführt. Diese wurde für bis zu 17 h bei 4 °C inkubiert.

Die Analyse der Reaktion erfolgte nach gelelektrophoretischer Trennung (6.2.1.2) durch Detektion fluoreszierender Produkte. Hierfür wurden 10 μL 2x RNA-Loading Dye zu der Photoclick-Reaktion gegeben und der komplette Ansatz auf ein 20 %iges denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Die gelelektrophoretische Trennung wurde bei 10 W über einen Zeitraum von 50 min durchgeführt. Die Analyse erfolgte durch Beleuchtung des Gels mit Hilfe einer UV-Handlampe bei 365 nm und Fluoreszenzsignale wurden mittels des *VersaDoc Imagers* (kein Filter, 30-60 sec) oder mittels einer Digitalkamera aufgenommen.

Teilweise wurde auch das Kappen-Analogon **9** bzw. **14** visualisiert. Hierzu wurde das Gel auf eine DC-Folie gelegt und durch eine UV-Handlampe bei 254 nm beleuchtet. Die Detektion und Sicherung der Daten erfolgte mittels des *VersaDoc Imagers*.

Entsprechend dieser Vorgehensweise erfolgte auch die Fluoreszenzmarkierung des alkylierten Kappen-Analogons N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA **15**. Hierbei wurde in den Biokonversionen lediglich AdoEnYn (**4**, 0,36-1 mM) als Cosubstrat eingesetzt. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde das Kappen-Analogon m^7 GpppA **9** in der jeweils angegebenen Konzentration für die Biokonversion eingesetzt.

6.6.3 Markierung der alkylierten mRNA-Kappe mittels Cu(I)-katalysierter Click-Reaktion

Die Cu(I)-katalysierte Click-Reaktion wurde erfolgreich mit dem Kappen-Analogon N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA **15** unter Verwendung von CuBr als Katalysator durchgeführt.

Diese chemo-enzymatische Strategie konnte weiterhin zur erfolgreichen Markierung von N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA **15** in pro- als auch eukaryotischem Lysat erweitert und ebenfalls genutzt werden, um das komplexe Biomolekül RNA spezifisch in Abhängigkeit von der Kappenstruktur zu markieren.

6.6.3.1 Fluoreszenzmarkierung von m^7 GpppA mittels GlaTgs2-V34A und CuAAC

Für die chemo-enzymatische Modifizierung von m^7 GpppA **9** mittels der Cu(I)-katalysierten Click-Reaktion wurden 1 mM des Kappen-Analogons m^7 GpppA **9** mit AdoEnYn (**4**, 0,36-1 mM) durch GlaTgs2-V34A (5-120 μ M) umgesetzt. Zur Degradation entstehenden *S*-Adenosylhomocysteins **13** wurden 4 μ M MTAN sowie 3 μ M LuxS zugesetzt und die Reaktion mit PUS-Puffer auf ein Endvolumen von 10 μ L ergänzt. Der enzymkatalysierte Transfer der Alkynylgruppe wurde über einen Zeitraum von 3 h bei 37 °C und 300 rpm durchgeführt. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei 68 °C sowie die Dialyse mittels eines MF-Millipore™ Membran Filters (0,025 μ M) gegen PUS-Puffer (inkl. 5 mM DTT) über einen Zeitraum von 15 min. Gegebenenfalls erfolgte die Kontrolle der enzymatischen Markierung mittels RP-HPLC entsprechend der in Kapitel 6.4.5 beschriebenen Methode.

Die Markierung des *in situ* hergestellten N^2 -(Pent-2-en-4-ynyl)- m^7 GpppA **15** mit Eterneon™480/635-Azid **18** erfolgte entsprechend den Vorgaben des Herstellers (*Jenabioscience*). Hierzu wurden 5 μ L der nach der Dialyse erhaltenen Lösung von **15** mit 4 μ L *Click Solution* versetzt und 1,5 μ L einer frisch präparierten Cu(I)/TBTA-Lösung sowie

1 μL EterneonTM 480/635-Azid (**18**, 2,5 mM in *Click Solution*) zugefügt. Der Ansatz wurde gevortext und bei 37 °C und 300 rpm für 1 h inkubiert. Für die Herstellung der Cu(I)/TBTA-Lösung wurde CuBr aus der *Glovebox* ausgeschleust und eine 314 mM CuBr-Lösung in *Click Solution* hergestellt. Bevor ein Farbwechsel dieser Lösung von gelb nach grün erfolgte, wurde ein Teil hiervon 1: 10 in einer TBTA-Lösung (111 mM in *Click Solution*) verdünnt.

Die Proben wurden mit 2x RNA-Loading Dye versetzt und auf ein 20 %iges denaturierendes Polyacrylamidgel (6.2.1.2) aufgetragen. Die gelelektrophoretische Trennung erfolgte für 30 min bei 10 W (6.2.1.2). Das erhaltene Gel wurde anschließend mittels des *VersaDoc Imagers* unter Verwendung grüner LEDs beleuchtet und Signale mit Wellenlängen von mehr als 605 bzw. 695 nm detektiert. Für die massenspektrometrische Analyse wurde die fluoreszierende Bande ausgeschnitten, zerkleinert und 60 min in 10 μL Acetonitril inkubiert. Die Lösung wurde mittels MALDI-TOF-MS analysiert (6.4.6.1).

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze, wurde die entsprechend angegebene Konzentration an m^7GpppA **9** für die enzymatische Markierung eingesetzt. Die folgenden Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

6.6.3.2 Fluoreszenzmarkierung von m^7GpppA mittels GlTgs2-V34A und CuAAC in Lysat

Für die chemo-enzymatische Markierung in Gegenwart prokaryotischen Lysats wurden *E. coli* TunerTM(DE3)pLacI-Zellen aus einer 2 mL-Übernachtskultur (6.3.2.2) pelletiert (4 °C, 3 220 xg, 20 min) und in 20 μL PUS-Puffer, welcher mit DNase und Lysozym versetzt war, resuspendiert. Die Lyse erfolgte für 1 h bei 37 °C und 300 rpm.

Zur Markierung in Gegenwart eukaryotischen Lysats wurden PC3-Zellen (7×10^7) pelletiert (4 °C, 3 320 xg, 20 min). Das Pellet wurde zweimal mit je 50 μL PUS-Puffer gewaschen und jeweils für 1 min bei 4 °C und $16,1 \times 10^3$ xg zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 40 μL PUS-Puffer resuspendiert und die Zellen durch Sonifizierung (3x, Stufe 2, 10 %, je 1 min) aufgeschlossen. Zelldebris wurde nach der jeweiligen Lyse durch Zentrifugation (4 °C, $16,1 \times 10^3$ xg, 10 min) entfernt und der erhaltene Überstand anstelle des Puffers in dem enzymatischen Transfer, beschrieben in 6.6.3.1, eingesetzt. Die folgenden Schritte wurden dann wie in Kapitel 6.6.3.1 beschrieben durchgeführt.

6.6.3.3 Fluoreszenzmarkierung Kappen-tragender RNA mittels GlaTgs2-V34A und CuAAC

Für die chemo-enzymatische Modifizierung Kappen-tragender RNA mittels der CuAAC wurde RNA durch *in vitro*-Transkription (6.2.2.4) hergestellt und mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (6.2.1.8) und anschließender Alkoholpräzipitation (6.2.1.9) gereinigt. Die RNA wurde unter Verwendung des *Vaccinia Capping* Enzyms (VCE) entweder mit der eukaryotischen Kappe *Cap 0* beziehungsweise einem unmethylierten Guanosin, welches die Negativkontrolle darstellte, versehen. Hierzu wurden 0,9 nmol RNA (2 μ L einer 450 μ M RNA-Lösung) mit GTP (10 nmol) und VCE (20 U) in An- bzw. Abwesenheit von AdoMet **12** (2 nmol) in einem finalen Volumen von 20 μ L für 1 h bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Nach der *Capping* Reaktion folgten zwei Schritte, welche eine Reduzierung der AdoMet-Konzentration bewirken sollten, da dieses sonst als Kompetitor des AdoMet-Analogons AdoEnYn **4** in der anschließenden enzymatischen Modifizierung fungieren und hierdurch den Transfer der reaktiven Alkynylgruppe durch GlaTgs2-V34A auf die eukaryotische Kappe verhindern könnte. Zur Degradation von AdoMet **12** wurden die Reaktionen für 15 min auf 65 °C erhitzt, anschließend auf Eis gekühlt, mit 0,2 μ L RiboLock RNase Inhibitor sowie 5 μ L einer CIEX-Suspension (Spatelspitze *cation exchanger P11 cellulose phosphate* in 50 μ L PBS pH 7,4) versetzt und 15 min bei 4 °C und 900 rpm inkubiert. Die CIEX-Beads wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei $16,1 \times 10^3$ xg und 4 °C entfernt und die RNA aus dem erhaltenen Überstand gefällt (6.2.1.9). Anschließend erfolgte die enzymatische Markierung. Hierzu wurde die pelletierte RNA in PUS-Puffer resuspendiert, bevor 0,25 μ L RiboLock RNase Inhibitor, MTAN (1,2 μ M), LuxS (0,6 μ M), GlaTgs2-V34A (37-49 μ M) und AdoEnYn (**4**, 1,5-1,7 mM) zugegeben und die Reaktion in einem finale Volumen von 5 μ L für 90 min bei 37 °C und 300 rpm inkubiert wurde. Die RNA wurde gefällt (6.2.1.9) und für die Click-Reaktion eingesetzt. Hierzu wurde die pelletierte RNA für etwa 15 min in 4 μ L PUS-Puffer (inkl. 5 mM DTT) inkubiert. Zur Herstellung der im nächsten Schritt benötigten Cu(I)/TBTA-Lösung, wurde CuBr aus der *Glovebox* ausgeschleust und eine 314 mM Lösung in *Click Solution* hergestellt. Bevor ein Farbwechsel dieser Lösung von gelb nach grün erfolgte, wurde ein Teil hiervon 1: 10 in einer TBTA-Lösung (111 mM) verdünnt. Es wurden 3,2 μ L *Click Solution* sowie 1 μ L der frisch präparierten Cu(I)/TBTA-Lösung und 0,8 μ L, EterneonTM 480/635-Azid (**18**, 2,5 mM) zu der RNA gegeben, die Reaktion durch Pipettieren gemischt und 1 h bei 37 °C und 300 rpm inkubiert, wobei die Ansätze etwa alle 15 min gevortext wurden. Die Reaktionen wurden mit 2x RNA-Loading Dye versetzt, auf ein 10 %iges denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 12 W für 25 min

elektrophoretisch getrennt (6.2.1.2). Die Analyse erfolgte mittels des *VersaDoc Imagers*. Dazu wurde zunächst die fluoreszierende Produkte durch Extinktion mit grünen LEDs (BP=695 nm) detektiert, wobei die Aufnahmen über einen Zeitraum von 30-60 sec erfolgten. Anschließend wurde eine Färbung mit Ethidiumbromid (6.2.1.2) durchgeführt um die RNA zu visualisieren. Mittels *Quantity One* konnte ein Overlay beider erhaltenen Bilder erstellt werden.

6.7 Versuche zur chemo-enzymatischen Markierung zellulärer mRNA

6.7.1 Präparation von PC3-Zellen

Eine Visualisierung zellulärer mRNA mittels Photoclick-Reaktion oder CuAAC wurde unter Verwendung fixierter PC3-Zellen versucht. Hierzu wurden $1,2 \times 10^4$ PC3-Zellen in die Vertiefung einer sterilen *μ -Slide VI 0.4, ibiTreat-Platte* gegeben und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das DMEM-Medium wurde abgenommen, die Zellen mit 120 μ L sterilem PBS gewaschen und 30 min in Fixierlösung inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen 5 min mit 120 μ L 0,1 % (v/v) Tween-PBS-inkubiert. Diese Arbeitsschritte wurden durch Frau Stephanie Besztejan durchgeführt. Je nach Anwendung wurden die Zellen mit PBS oder PUS-Puffer gewaschen und 20-25 μ L der jeweiligen Biokonversion (6.6.2, 6.6.3) auf die Zellen gegeben. Als Negativkontrolle wurde GlaTgs2-V34A hitzedenaturiert (5 min, 95 °C) und für die Reaktion eingesetzt. Die Platte wurde mittels Parafilm verschlossen und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Biokonversion wurden verschiedene Protokolle zum Waschen der Zellen etabliert. Hierzu wurde entweder nur mit PBS bzw. PUS-Puffer gewaschen oder die folgenden Lösungsmittels abwechselnd eingesetzt: PBS und DMSO, PUS und *Click Solution*, PBS und Acetonitril, PBS und 5 % (w/v) SDS sowie PBS und 0,1 M NaOH. Bevor im Folgenden der jeweilige Click-Reaktionsansatz zugegeben wurde, wurden die Zellen mehrfach mit PBS bzw. PUS-Puffer gewaschen. Für die Photoclick-Reaktion wurde Tetrazol **6**, wie in 6.6.2 beschrieben aktiviert, 40 μ L hiervon auf die Zellen gegeben und die Proben für 16 h bei 4 °C inkubiert. Die CuAAC wurde wie in 6.6.3.1 beschrieben durchgeführt. Nach den Click-Reaktionen wurden die verschiedenen Waschprozeduren getestet um unspezifisch gebundene Fluorophore zu entfernen. Die Visualisierung der Zellen erfolgte wie in 6.7.3 beschrieben.

6.7.2 Präparation von Baculovirus-infizierten Sf9-Zellen

Die Kultivierung, Infektion und Fixierung der Sf9-Zellen wurde durch Frau Katrin Seelhorst durchgeführt. Hierzu wurden Sf9-Zellen in Vertiefung einer sterilen μ -Slide VI 0.4, ibiTreat-Platte gegeben und für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bevor die Infektion mit Baculovirus erfolgte. Die Zellen wurden 24 bzw. 48 h nach der Infektion durch Zugabe von 120 μ L eiskaltem Methanol und fünfminütige Inkubation fixiert. Anschließend wurde Methanol abgenommen und die Zellen nicht weiter behandelt. Als Kontrolle für die chemoenzymatische Modifizierung wurden auch nicht-infizierte Zellen fixiert.

6.7.3 Visualisierung

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden an einem Olympus IX81 Konfokalmikroskop oder Leica Fluoreszenzmikroskop mit 20 x-Objektiv aufgenommen. Die Anregung erfolgte mittels eines 405 nm-gepulsten (Photoclick-Reaktionen) oder mittels eines 488 nm-Lasers (616 V, Power 10 %) bzw. einer Quecksilberlampe (Photoclick-Reaktionen). Fluoreszenz wurde in einem Bereich von 630-640 nm bei Verwendung des Konfokalmikroskops detektiert.

7. Literatur

- [1] C. R. Eckmann, C. Rammelt, E. Wahle, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2011**, 2, 348–61.
- [2] T. H. Beilharz, T. Preiss, *RNA* **2007**, 13, 982–97.
- [3] H. Nakazato, S. Venkatezan, M. Edmonds, *Nature* **1975**, 256, 144–146.
- [4] P. Karnik, J. Taljanidisz, M. Sasvari-Szekely, N. Sarkar, *J. Mol. Biol.* **1987**, 196, 347–54.
- [5] S. Kadaba, A. Krueger, T. Trice, A. M. Krecic, A. G. Hinnebusch, J. Anderson, *Genes Dev.* **2004**, 18, 1227–1240.
- [6] M. Werner, E. Purta, K. H. Kaminska, I. A. Cymerman, D. A. Campbell, B. Mittra, J. R. Zamudio, N. R. Sturm, J. Jaworski, J. M. Bujnicki, *Nucleic Acids Res.* **2011**, 39, 4756–68.
- [7] J. D. Bangs, P. F. Crainll, T. Hashizumell, J. A. Mccloskeyllii, J. C. Boothroyd, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 9805–9815.
- [8] J. D. Lewis, D. Görlich, I. W. Mattaj, *Nucleic Acids Res. Res.* **1996**, 24, 3332–6.
- [9] J. D. Lewis, E. Izaurralde, A. Jarmolowski, C. McGuigan, I. W. Mattaj, *Genes Dev.* **1996**, 10, 1683–1698.
- [10] H. Cheng, K. Dufu, C.-S. Lee, J. L. Hsu, A. Dias, R. Reed, *Cell* **2006**, 127, 1389–400.
- [11] S. Muthukrishnan, G. W. Both, Y. Furuichi, A. J. Shatkin, *Nature* **1975**, 255, 33–37.
- [12] A. Ghosh, C. D. Lima, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2010**, 1, 152–72.
- [13] P. Fechter, G. G. Brownlee, *J. Gen. Virol.* **2005**, 86, 1239–49.
- [14] E. Y. Jacobs, I. Ogiwara, A. M. Weiner, *Mol. Cell. Biol.* **2004**, 24, 846–855.
- [15] X. Cai, C. H. Hagedorn, B. R. Cullen, *RNA* **2004**, 10, 1957–1966.
- [16] S. Moteki, D. Price, *Mol. Cell* **2002**, 10, 599–609.
- [17] E.-J. Cho, T. Takagi, C. R. Moore, S. Buratowski, *Genes Dev.* **1997**, 11, 3319–3326.
- [18] E. Kim, L. Du, D. B. Bregman, S. L. Warren, *J. Cell Biol.* **1997**, 136, 19–28.
- [19] M. J. Mortillaro, B. J. Blencowe, X. Wei, H. Nakayasu, L. Du, S. L. Warren, P. A. Sharp, R. Berezney, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93, 8253–7.
- [20] Y. Hirose, R. Tacke, J. L. Manley, *Genes Dev.* **1999**, 13, 1234–1239.
- [21] A. Aguilera, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2005**, 17, 242–50.
- [22] F. Chen, C. C. MacDonald, J. Wilusz, *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23, 2614–20.
- [23] M. Fitzgerald, T. Shenkt, *Cell* **1981**, 24, 251–260.

- [24] Z. F. Chou, F. Chen, J. Wilusz, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2525–31.
- [25] S. Masuda, R. Das, H. Cheng, E. Hurt, N. Dorman, R. Reed, *Genes Dev.* **2005**, *19*, 1512–7.
- [26] G. M. Hautbergue, M.-L. Hung, A. P. Golovanov, L.-Y. Lian, S. A. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 5154–9.
- [27] M. Ohno, A. Segref, A. Bachi, M. Wilm, I. W. Mattaj, *Cell* **2000**, *101*, 187–98.
- [28] M. Fornerod, M. Ohno, M. Yoshida, I. W. Mattaj, *Cell* **1997**, *90*, 1051–1060.
- [29] E. Izaurralde, U. Kutay, C. von Kobbe, I. W. Mattaj, D. Görlich, *EMBO J.* **1997**, *16*, 6535–47.
- [30] A. McCloskey, I. Taniguchi, K. Shinmyozu, M. Ohno, *Science* **2012**, *335*, 1643–6.
- [31] Y. Ishigaki, X. Li, G. Serin, L. E. Maquat, *Cell* **2001**, *106*, 607–17.
- [32] I. Topisirovic, Y. V Svitkin, N. Sonenberg, A. J. Shatkin, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2011**, *2*, 277–98.
- [33] M. J. Moore, *Science* **2005**, *309*, 1514–8.
- [34] U. Sheth, R. Parker, *Science* **2003**, *300*, 805–8.
- [35] J. T. Bell, A. A. Pai, J. K. Pickrell, D. J. Gaffney, R. Pique-Regi, J. F. Degner, Y. Gilad, J. K. Pritchard, *Genome Biol.* **2011**, *12*, R10.
- [36] R. Ben-Levy, I. A. Leighton, Y. N. Doza, P. Attwood, N. Morrice, C. J. Marshall, P. Cohen, *EMBO J.* **1995**, *14*, 5920–30.
- [37] K. C. Martin, A. Ephrussi, *Cell* **2009**, *136*, 1–21.
- [38] W. R. Jeffery, C. R. Tomlinson, R. D. Brodeur, *Dev. Biol.* **1983**, *99*, 408–17.
- [39] J. B. Lawrence, R. H. Singer, *Cell* **1986**, *45*, 407–15.
- [40] E. Bertrand, P. Chartrand, M. Schaefer, S. M. Shenoy, R. H. Singer, R. M. Long, *Mol. Cell* **1998**, *2*, 437–45.
- [41] J. Kim-Ha, J. L. Smith, P. M. Macdonald, *Cell* **1991**, *66*, 23–35.
- [42] D. St Johnston, W. Driever, T. Berleth, S. Richstein, C. Nüsslein-Volhard, *Development* **1989**, *107 Suppl*, 13–9.
- [43] C. E. Holt, S. L. Bullock, *Science* **2009**, *326*, 1212–6.
- [44] J. Eberwine, K. Miyashiro, J. E. Kacharina, C. Job, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 7080–5.
- [45] D. E. Willis, E. a van Niekerk, Y. Sasaki, M. Mesngon, T. T. Merianda, G. G. Williams, M. Kendall, D. S. Smith, G. J. Bassell, J. L. Twiss, *J. Cell Biol.* **2007**, *178*, 965–80.
- [46] E. Lécuyer, H. Yoshida, N. Parthasarathy, C. Alm, T. Babak, T. Cerovina, T. R. Hughes, P. Tomancak, H. M. Krause, *Cell* **2007**, *131*, 174–87.

- [47] I. J. Cajigas, G. Tushev, T. J. Will, S. tom Dieck, N. Fuerst, E. M. Schuman, *Neuron* **2012**, 74, 453–66.
- [48] E. R. Gavis, R. Lehmann, *Cell* **1992**, 71, 301–13.
- [49] J. R. Hughes, S. L. Bullock, D. Ish-Horowicz, I. Fields, *Curr. Biol.* **2004**, 14, 1950–1956.
- [50] L. A. Mingle, N. N. Okuhama, J. Shi, R. H. Singer, J. Condeelis, G. Liu, *J. Cell Sci.* **2005**, 118, 2425–2433.
- [51] S. Miller, M. Yasuda, J. K. Coats, Y. Jones, M. E. Martone, M. Mayford, *Neuron* **2002**, 36, 507–519.
- [52] A. M. Simon, P. Hoppe, S. J. Burden, *Development* **1992**, 114, 545–53.
- [53] D. Ding, S. M. Parkhurst, S. R. Halsell, H. D. Lipshitz, *Mol. Cell. Biol.* **1993**, 13, 3773–81.
- [54] K. M. Forrest, E. R. Gavis, *Curr. Biol.* **2003**, 13, 1159–1168.
- [55] Y. Oleynikov, R. H. Singer, N. York, *Curr. Biol.* **2003**, 13, 199–207.
- [56] Y. Kanai, N. Dohmae, N. Hirokawa, *Neuron* **2004**, 43, 513–25.
- [57] K. Ainger, D. Avossa, F. Morgan, S. J. Hill, C. Barry, E. Barbarese, J. H. Carson, *J. Cell Biol.* **1993**, 123, 431–41.
- [58] R. B. Knowles, J. H. Sabry, M. E. Martone, T. J. Deerinck, M. H. Ellisman, G. J. Bassell, K. S. Kosik, *J. Neurosci.* **1996**, 16, 7812–20.
- [59] S. Lange, Y. Katayama, M. Schmid, O. Burkacky, C. Bräuchle, D. C. Lamb, R.-P. Jansen, *Traffic* **2008**, 9, 1256–67.
- [60] G. Elvira, S. Wasiak, V. Blandford, X.-K. Tong, A. Serrano, X. Fan, M. del Rayo Sánchez-Carbente, F. Servant, A. W. Bell, D. Boismenu, et al., *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, 5, 635–51.
- [61] M. Mallardo, A. Deitinghoff, J. Müller, B. Goetze, P. Macchi, C. Peters, M. A. Kiebler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100, 2100–5.
- [62] M. a Kiebler, G. J. Bassell, *Neuron* **2006**, 51, 685–90.
- [63] J. H. Carson, S. Kwon, E. Barbarese, *Curr. Opin. Neurobiol.* **1998**, 8, 607–12.
- [64] K. Ainger, D. Avossa, A. S. Diana, C. Barry, E. Barbarese, J. H. Carson, *J. Cell Biol.* **1997**, 138, 1077–87.
- [65] I. Gonzalez, S. B. Buonomo, K. Nasmyth, U. von Ahsen, *Curr. Biol.* **1999**, 9, 337–40.
- [66] O. Hachet, A. Ephrussi, *Nature* **2004**, 428, 959–693.
- [67] K. L. Mowry, D. A. Melton, *Science* **1992**, 255, 991–4.
- [68] M. Mayford, D. Baranes, K. Podsypanina, E. R. Kandel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93, 13250–5.

- [69] J. E. Wilhelm, J. Mansfield, N. Hom-boohar, S. Wang, C. W. Turck, T. Hazelrigg, R. D. Vale, *J. Cell Biol.* **2000**, *148*, 427–439.
- [70] R. L. Kelley, *Genes Dev.* **1993**, *7*, 948–960.
- [71] K. N. Clouse, S. B. Ferguson, T. Schüpbach, *Dev. Biol.* **2008**, *313*, 713–724.
- [72] H. L. Zhang, T. Eom, Y. Oleynikov, S. M. Shenoy, D. A. Liebelt, J. B. Dictenberg, R. H. Singer, G. J. Bassell, *Neuron* **2001**, *31*, 261–275.
- [73] S. Hüttelmaier, D. Zenklusen, M. Lederer, J. Dictenberg, M. Lorenz, X. Meng, G. J. Bassell, J. Condeelis, R. H. Singer, *Nature* **2005**, *438*, 512–5.
- [74] A. Nakamura, K. Sato, K. Hanyu-Nakamura, *Developmental Cell* **2004**, *6*, 69–78.
- [75] W. Gu, Y. Deng, D. Zenklusen, R. H. Singer, *Genes Dev.* **2004**, *18*, 1452–1465.
- [76] Y. Deng, R. H. Singer, W. Gu, *Genes Dev.* **2008**, *22*, 1037–1050.
- [77] L. Wu, D. Wells, J. Tay, D. Mendis, M. Abbott, A. Barnitt, E. Quinlan, A. Heynen, J. R. Fallon, J. D. Richter, *Neuron* **1998**, *21*, 1129–1139.
- [78] L. L. McGrew, J. D. Richter, *EMBO J.* **1990**, *9*, 3743–3751.
- [79] F. Besse, A. Ephrussi, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 971–80.
- [80] Y.-S. Huang, M.-Y. Jung, M. Sarkissian, J. D. Richter, *EMBO J.* **2002**, *21*, 2139–48.
- [81] V. M. Latham, E. H. Yu, A. N. Tullio, R. S. Adelstein, R. H. Singer, *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 1010–6.
- [82] K. E. Burgin, M. N. Waxham, S. Rickling, S. A. Westgate, W. C. Mobley, P. T. Kelly, *J. Neurosci.* **1990**, *10*, 1788–98.
- [83] C. Andreassi, A. Riccio, *Trends Cell Biol.* **2009**, *19*, 465–74.
- [84] C. Meignin, I. Davis, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2010**, *22*, 112–9.
- [85] G. J. Bassell, S. T. Warren, *Neuron* **2008**, *60*, 201–14.
- [86] D. A. Lyons, S. G. Naylor, A. Scholze, W. S. Talbot, *Nat. Genet.* **2009**, *41*, 854–8.
- [87] Y. S. Aulchenko, I. a Hoppenbrouwers, S. V Ramagopalan, L. Broer, N. Jafari, J. Hillert, J. Link, W. Lundström, E. Greiner, A. Dossa Sadovnick, et al., *Nat. Genet.* **2008**, *40*, 1402–3.
- [88] G. Vainer, A. Pikarsky, S. M. Shenoy, F. Oberman, A. Yeffet, R. H. Singer, E. Pikarsky, *J. Pathol.* **2008**, 445–456.
- [89] M. Grammel, H. Hang, N. K. Conrad, *Chembiochem* **2012**, *13*, 1112–5.
- [90] G. Brawerman, J. Mendecki, S. J. Lee, *Biochemistry* **1971**, *11*, 637–641.
- [91] M. Edmonds, M. G. Caramela, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 1314–1324.

- [92] H. Aviv, P. Leder, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1972**, 69, 1408–1412.
- [93] N. Jacobsen, P. S. Nielsen, D. C. Jeffares, J. Eriksen, H. Ohlsson, P. Arctander, S. Kauppinen, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, e64.
- [94] D. L. Shelton, L. F. Reichardt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, 83, 2714–2718.
- [95] U. Gubler, B. J. Hoffman, *Gene* **1983**, 25, 263–269.
- [96] Y. H. Choi, C. H. Hagedorn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100, 7033–7038.
- [97] R. Mendez, J. D. Richter, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, 2, 521–529.
- [98] L. L. McGrew, E. Dworkin-Rastl, M. B. Dworkin, *Genes Dev.* **1989**, 3, 803–815.
- [99] T. W. Munns, M. K. Liszewski, J. T. Tellam, H. F. Sims, R. E. Rhoads, *Biochemistry* **1982**, 21, 2922–8.
- [100] D. Muhlrad, C. J. Decker, R. Parker, *Genes Dev.* **1994**, 8, 855–866.
- [101] S. K. Lim, L. E. Maquat, *EMBO J.* **1992**, 11, 3271–8.
- [102] I. Edery, L. L. Chu, N. Sonenberg, J. Pelletier, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, 15, 3363–3371.
- [103] T. Spivak-Kroizman, D. E. Friedland, C. De Staercke, K. M. Gernert, D. J. Goss, C. H. Hagedorn, *FEBS Lett.* **2002**, 516, 9–14.
- [104] M. E. Folkers, D. A. Delker, C. I. Maxwell, C. A. Nelson, J. J. Schwartz, D. A. Nix, C. H. Hagedorn, *PLoS One* **2011**, 6, e14697.
- [105] N. Papic, C. I. Maxwell, D. A. Delker, S. Liu, B. S. E. Heale, C. H. Hagedorn, S. L. City, *Viruses* **2012**, 4, 581–612.
- [106] M. D. Blower, A. Jambhekar, D. S. Schwarz, J. A. Toombs, *PLoS One* **2013**, 8, e77700.
- [107] D. G. Wansink, W. Schul, I. Van Der Kraan, B. Van Steensel, R. Van Driel, L. De Jong, *J. Cell Biol.* **1993**, 122, 283–293.
- [108] C. Y. Jao, A. Salic, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105, 15779–84.
- [109] D. Qu, L. Zhou, W. Wang, Z. Wang, G. Wang, W. Chi, B. Zhang, *Anal. Biochem.* **2013**, 434, 128–35.
- [110] R. W. Dirks, C. Molenaar, H. J. Tanke, *Histochem. Cell Biol.* **2001**, 115, 3–11.
- [111] J. B. Glotzer, R. Saffrich, M. Glotzer, A. Ephrussi, *Curr. Biol.* **1997**, 7, 326–37.
- [112] J. C. Politz, K. L. Taneja, R. H. Singer, *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23, 4946–53.
- [113] J. C. Politz, E. S. Browne, D. E. Wolf, T. Pederson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95, 6043–8.
- [114] R. Dirks, H. Tanke, *Biotechniques* **2006**, 40, 489–496.

- [115] V. Menchise, G. De Simone, T. Tedeschi, R. Corradini, S. Sforza, R. Marchelli, D. Capasso, M. Saviano, C. Pedone, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 12021–6.
- [116] C. Wahlestedt, P. Salmi, L. Good, J. Kela, T. Johnsson, T. Ho, C. Broberger, F. Porreca, J. Lai, K. Ren, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 5633–5638.
- [117] S. Obika, R. Hemamayi, T. Masuda, T. Sugimoto, S. Nakagawa, *Nucleic Acid Res. Suppl* **2001**, 145–146.
- [118] C. Molenaar, S. A. Marras, J. C. Slats, J. C. Truffert, M. Lemaître, A. K. Raap, R. W. Dirks, H. J. Tanke, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, E89–9.
- [119] M. Majlessi, N. C. Nelson, M. M. Becker, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 2224–9.
- [120] B. S. Sproat, A. I. Lamond, B. Beijer, P. Neuner, U. Ryder, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 3373–3386.
- [121] C. Molenaar, A. Abdulle, A. Gena, H. J. Tanke, R. W. Dirks, *J. Cell Biol.* **2004**, *165*, 191–202.
- [122] J. C. Politz, R. A. Tuft, T. Pederson, R. H. Singer, *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 285–91.
- [123] J. C. Politz, *Trends Cell Biol.* **1999**, *9*, 284–7.
- [124] Y. V Il'ichev, M. A. Schwörer, J. Wirz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4581–95.
- [125] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303–308.
- [126] T. Matsuo, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1379*, 178–184.
- [127] Z.-Q. Cui, Z.-P. Zhang, X.-E. Zhang, J.-K. Wen, Y.-F. Zhou, W.-H. Xie, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 3245–52.
- [128] D. P. Bratu, B.-J. Cha, M. M. Mhlanga, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 13308–13.
- [129] S. Tyagi, O. Alsmadi, *Biophys. J.* **2004**, *87*, 4153–62.
- [130] A. K. Chen, M. A. Behlke, A. Tsourkas, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e149.
- [131] A. Tsuji, H. Koshimoto, Y. Sato, M. Hirano, Y. Sei-Iida, S. Kondo, K. Ishibashi, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 3260–3274.
- [132] P. J. Santangelo, B. Nix, A. Tsourkas, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e57.
- [133] J. S. Rinne, T. P. Kaminski, U. Kubitscheck, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 5375–7.
- [134] K. B. Joshi, A. Vlachos, V. Mikat, T. Deller, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2746–8.
- [135] L. Bethge, D. V. Jarikote, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 114–25.
- [136] O. Seitz, F. Bergmann, D. Heindl, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 2203–2206.
- [137] S. Kummer, A. Knoll, E. Socher, L. Bethge, A. Herrmann, O. Seitz, *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 2051–60.

- [138] J. P. Leonetti, N. Mechti, G. Degols, C. Gagnor, B. Lebleu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 2702–6.
- [139] R. M. Long, R. H. Singer, X. Meng, I. Gonzalez, K. Nasmyth, R. P. Jansen, *Science* **1997**, *277*, 383–7.
- [140] D. Fusco, N. Accornero, B. Lavoie, S. M. Shenoy, J. M. Blanchard, R. H. Singer, E. Bertrand, *Curr. Biol.* **2003**, *13*, 161–7.
- [141] M. S. Rook, M. Lu, K. S. Kosik, *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 6385–6393.
- [142] N. Daigle, J. Ellenberg, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 633–636.
- [143] J. König, S. Baumann, J. Koepke, T. Pohlmann, K. Zarnack, M. Feldbrügge, *EMBO J.* **2009**, *28*, 1855–66.
- [144] S. Tyagi, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 331–338.
- [145] A. Calapez, H. M. Pereira, A. Calado, J. Braga, J. Rino, C. Carvalho, J. P. Tavanetz, E. Wahle, A. C. Rosa, M. Carmo-Fonseca, *J. Cell Biol.* **2002**, *159*, 795–805.
- [146] M. Valencia-Burton, R. M. McCullough, C. R. Cantor, N. E. Broude, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 421–427.
- [147] O. Rackham, C. M. Brown, *EMBO J.* **2004**, *23*, 3346–55.
- [148] T. Ozawa, Y. Natori, M. Sato, Y. Umezawa, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 413–419.
- [149] C.-G. Cheong, T. M. T. Hall, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 13635–9.
- [150] H. Yoshimura, A. Inaguma, T. Yamada, T. Ozawa, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 999–1005.
- [151] S. Cabantous, G. F. Waldo, *Protein-Protein Interaction Detection System Using Fluorescent Protein Microdomains* WO 2006062882 A2, **2007**.
- [152] S. J. Kellermann, A. K. Rath, A. Rentmeister, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 200–4.
- [153] J. S. Paige, K. Wu, S. R. Jaffrey, *Science* **2011**, *333*, 642–646.
- [154] W. Song, Y. Wang, Z. Yu, C. I. R. Vera, J. Qu, Q. Lin, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 875–885.
- [155] Y. Motorin, J. Burhenne, R. Teimer, K. Koynov, S. Willnow, E. Weinhold, M. Helm, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 1943–52.
- [156] M. Tomkuvienė, B. Clouet-d’Orval, I. Cerniauskas, E. Weinhold, S. Klimasauskas, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 6765–73.
- [157] K. E. Beatty, J. D. Fisk, B. P. Smart, Y. Y. Lu, J. Szychowski, M. J. Hangauer, J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, D. A. Tirrell, *ChemBiochem* **2010**, *11*, 2092–5.
- [158] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [159] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2596–9.

- [160] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057–64.
- [161] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 666–676.
- [162] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, 287, 2007–2010.
- [163] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046–7.
- [164] K. J. Shea, J.-S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4846–4855.
- [165] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104, 16793–7.
- [166] W. D. Cook, F. Chen, D. W. Pattison, P. Hopson, M. Beaujon, *Polym. Int.* **2007**, 56, 1572–1579.
- [167] O. Norberg, I. H. Lee, T. Aastrup, M. Yan, O. Ramström, *Biosensors Bioelectron.* **2012**, 34, 51–56.
- [168] T. Posner, *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1905**, 38, 646–657.
- [169] C. R. Morgan, F. Magnotta, A. D. Ketley, *J. Polym. Sci.* **1977**, 15, 627–645.
- [170] C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, 49, 1540–73.
- [171] C. A. Guymon, E. S. Jo, *J. Polym. Sci. Part A* **2004**, 42, 6283–6298.
- [172] N. B. Cramer, S. K. Reddy, A. K. O. Brien, C. N. Bowman, *Macromolecules* **2003**, 36, 7964–7969.
- [173] J. A. Crowe, J. Genzer, N. Carolina, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 17610–17611.
- [174] S. Wittrock, T. Becker, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, 46, 5226–5230.
- [175] Y. Iwasaki, H. Matsuno, *Macromol. Biosci.* **2011**, 11, 1478–1483.
- [176] W. Song, Y. Wang, J. Qu, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9654–5.
- [177] R. Huisgen, M. Seidel, G. N. Wallbillich, *Tetrahedron* **1962**, 17, 3–29.
- [178] J. S. Clovis, A. Eckell, R. Huisgen, R. Sustmann, *Chem. Ber.* **1967**, 70, 60–70.
- [179] S.-L. Zheng, Y. Wang, Z. Yu, Q. Lin, P. Coppens, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 18036–7.
- [180] Y. Wang, C. I. R. Vera, Q. Lin, *Org. Lett.* **2007**, 6, 3–6.
- [181] K. N. Houk, J. Sims, C. R. Watts, L. J. Luskus, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 553, 7301–7315.
- [182] W. Song, Y. Wang, J. Qu, M. M. Madden, Q. Lin, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, 47, 2832–2835.
- [183] Y. Wang, W. Song, W. J. Hu, Q. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48, 5330–3.

- [184] K. N. Houk, J. Sims, C. R. Watts, L. J. Luskus, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 553, 7301–7315.
- [185] R. Huisgen, G. Szeimies, L. Möbius, *Chem. Ber.* **1967**, 100, 2494–2507.
- [186] R. Huisgen, J. M. Vernon, *Chemische Berichte* **1965**, 89, 3992–4013.
- [187] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 210–216.
- [188] J. E. Hein, V. V Fokin, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 39, 1302–1315.
- [189] V. O. Rodionov, V. V Fokin, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 2210–5.
- [190] B. F. Straub, *ChemComm* **2007**, 2007, 3868–3870.
- [191] M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2952–3015.
- [192] D. Kunz, *Chemie unserer Zeit* **2009**, 43, 224–230.
- [193] S. C. Fry, *Biochem. J.* **1998**, 332, 507–515.
- [194] D. C. Kennedy, C. S. McKay, M. C. B. Legault, D. C. Danielson, J. a Blake, A. F. Pegoraro, A. Stolor, Z. Mester, J. P. Pezacki, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 17993–8001.
- [195] W. Peters, S. Willnow, M. Duisken, H. Kleine, T. Macherey, K. E. Duncan, D. W. Litchfield, B. Lüscher, E. Weinhold, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, 49, 5170–3.
- [196] K. Islam, W. Zheng, H. Yu, H. Deng, M. Luo, *ACS Chem. Biol.* **2011**, 6, 679–684.
- [197] R. Wang, W. Zheng, H. Yu, H. Deng, M. Luo, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 7648–7651.
- [198] R. Wang, K. Islam, Y. Liu, W. Zheng, H. Tang, N. Lailier, G. Blum, H. Deng, M. Luo, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 1048–56.
- [199] S. Willnow, M. Martin, B. Lüscher, E. Weinhold, *Chembiochem* **2012**, 13, 1167–73.
- [200] Z. Yu, Y. Pan, Z. Wang, J. Wang, Q. Lin, *Angew. Chemie* **2012**, 124, 10752–10756.
- [201] C. Dalhoff, G. Lukinavicius, S. Klimasauskas, E. Weinhold, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 31–2.
- [202] O. Binda, M. Boyce, J. S. Rush, K. K. Palaniappan, C. R. Bertozzi, O. Gozani, *Chembiochem* **2011**, 12, 330–4.
- [203] G. Lukinavicius, V. Lapiene, Z. Stasevskij, C. Dalhoff, E. Weinhold, S. Klimasauskas, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 2758–9.
- [204] J. Gierlich, K. Gutsmedl, P. M. E. Gramlich, A. Schmidt, G. A. Burley, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 9486–9494.
- [205] J. Schoch, S. Ameta, A. Jäschke, *Chem. Commun. (Camb)*. **2011**, 47, 12536–7.
- [206] C. M. Dojahn, M. Hesse, C. Arenz, *Chem. Commun.* **2013**, 9, 3128–3130.
- [207] E. Paredes, S. R. Das, *Chembiochem* **2011**, 12, 125–31.

- [208] O. Zelenko, J. Gallagher, Y. Xu, D. S. Sigman, *Inorg. Chem.* **1998**, 1669, 20908–20914.
- [209] T. Ishizuka, M. Kimoto, A. Sato, I. Hirao, *Chem. Commun. (Camb)*. **2012**, 48, 10835–10837.
- [210] M.-L. Winz, A. Samanta, D. Benzinger, A. Jäschke, *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40, e78.
- [211] D. Benarroch, M. Jankowska-Anyszka, J. Stepinski, E. Darzynkiewicz, S. Shuman, *RNA* **2010**, 16, 211–220.
- [212] Y. Zhu, C. Qi, W. Q. Cao, A. V Yeldandi, M. S. Rao, J. K. Reddy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, 98, 10380–5.
- [213] J. Mouaikel, C. Verheggen, E. Bertrand, J. Tazi, R. Bordonné, *Mol. Cell* **2002**, 9, 891–901.
- [214] I. Lemm, C. Girard, A. N. Kuhn, N. J. Watkins, M. Schneider, R. Lu, *Mol. Biol. Cell* **2006**, 17, 3221–3231.
- [215] D. Bühler, V. Raker, R. Lührmann, U. Fischer, *Hum. Mol. Genet.* **1999**, 8, 2351–7.
- [216] J.-P.- Liautard, J. Sri-Widada, C. Brunel, P. Jeanteur, *J. Mol. Biol.* **1982**, 162, 623–643.
- [217] A. Krol, C. Branlant, E. Lazar, H. Gallinaro, M. Jacob, *Nucleic Acid Res.* **1981**, 9, 2699–2761.
- [218] G. Plessel, U. Fischer, R. Lührmann, *Mol. Cell. Biol.* **1994**, 14, 4160–72.
- [219] J. Mouaikel, U. Narayanan, C. Verheggen, A. G. Matera, E. Bertrand, J. Tazi, R. Bordonné, *EMBO Rep.* **2003**, 4, 616–22.
- [220] L. Pellizzoni, N. Kataoka, B. Charroux, G. Dreyfuss, *Cell* **1998**, 95, 615–24.
- [221] I. Enünlü, G. Pápai, I. Cserpán, A. Udvardy, K.-T. Jeang, I. Boros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 309, 44–51.
- [222] C. Girard, C. Verheggen, H. Neel, A. Cammas, S. Vagner, J. Soret, E. Bertrand, R. Bordonné, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 2060–9.
- [223] G. Meister, D. Bühler, R. Pillai, F. Lottspeich, U. Fischer, *Nat. Cell Biol.* **2001**, 3, 945–9.
- [224] A. H. M. Burghes, C. E. Beattie, *Nat. Publ. Gr.* **2009**, 10, 597–609.
- [225] S. Hausmann, S. Zheng, M. Costanzo, R. L. Brost, D. Garcin, C. Boone, S. Shuman, B. Schwer, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 31706–18.
- [226] T. Monecke, A. Dickmanns, A. Strasser, R. Ficner, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2009**, 65, 332–8.
- [227] T. Monecke, A. Dickmanns, R. Ficner, *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37, 3865–77.
- [228] X. Niu, T. Hartshorne, X. Y. He, N. Agabian, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1994**, 66, 49–57.
- [229] S. Hausmann, S. Shuman, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 32101–6.
- [230] L. Li, C. C. Wang, *Eukaryot. Cell* **2005**, 4, 948–959.

- [231] J. Chang, B. Schwer, S. Shuman, *RNA* **2010**, *16*, 1018–31.
- [232] D. Schulz, J. M. Holstein, A. Rentmeister, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 7874–7878.
- [233] D. Schulz, A. Rentmeister, *RNA Biol.* **2012**, *9*, 1–10.
- [234] C. Dalhoff, G. Lukinavicius, S. Klimasauskas, E. Weinhold, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1879–86.
- [235] J. M. Holstein, Untersuchung Und Erweiterung Des Substratspektrums von Trimethylguanosinsynthasen, **2012**.
- [236] M. Lo Conte, S. Pacifico, A. Chambery, A. Marra, A. Dondoni, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4644–7.
- [237] S. Ito, Y. Tanaka, A. Kakehi, K. Kondo, *Bull. Chem. Soc.* **1976**, *49*, 1920–1923.
- [238] C. L. Hendricks, J. R. Ross, E. Pichersky, J. P. Noel, Z. S. Zhou, *Anal. Biochem.* **2004**, *326*, 100–5.
- [239] J. Zhu, E. Dizin, X. Hu, A.-S. Wavreille, J. Park, D. Pei, *Biochemistry* **2003**, *42*, 4717–26.
- [240] S. Biastoff, Untersuchung Zur Strukturellen Verwandtschaft von Putrescin N - Methyltransferase Und Spermidinsynthase 1 Aus *Datura Stramonium* L ., **2010**.
- [241] J. Chang, B. Schwer, S. Shuman, *RNA* **2010**, *16*, 1018–31.
- [242] F. Ferron, E. Decroly, B. Selisko, B. Canard, *Antiviral Res.* **2012**, *96*, 21–31.
- [243] V. S. R. K. Yedavalli, K.-T. Jeang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 14787–92.
- [244] E. Darzynkiewicz, J. Stepinski, I. Ekiel, D. Haber, T. Sijuwade, S. M. Tahara, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 8953–8962.
- [245] Y. Zhou, D. Ray, Y. Zhao, H. Dong, S. Ren, Z. Li, Y. Guo, K. A. Bernard, P.-Y. Shi, H. Li, *J. Virol.* **2007**, *81*, 3891–903.
- [246] S. P. Lim, L. S. Sonntag, C. Noble, S. H. Nilar, R. H. Ng, G. Zou, P. Monaghan, K. Y. Chung, H. Dong, B. Liu, et al., *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 6233–40.
- [247] M. Z. Fang, Y. Wang, N. Ai, Z. Hou, Y. Sun, H. Lu, W. Welsh, C. S. Yang, **2003**, 7563–7570.
- [248] W. J. Lee, B. T. Zhu, *Carcinogenesis* **2006**, *27*, 269–77.
- [249] E. Collazo, J.-F. Couture, S. Bulfer, R. C. Trievel, *Anal. Biochem.* **2005**, *342*, 86–92.
- [250] J. L. Ekstrom, I. I. Mathews, B. A. Stanley, A. E. Pegg, S. E. Ealick, *Structure* **1999**, *7*, 583–95.
- [251] Z. Wieczorek, J. Stepinski, M. Jankowska, H. Lönnberg, *J. Photochem. Photobiol. B* **1995**, *28*, 57–63.
- [252] W. J. Lee, J. Shim, B. T. Zhu, *Mol. Pharmacol.* **2005**, *68*, 1018–1030.
- [253] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, *Bioinformatics* **2006**, *22*, 195–201.

- [254] F. Kiefer, K. Arnold, M. Künzli, L. Bordoli, T. Schwede, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D387–92.
- [255] M. C. Peitsch, *Nat. Biotechnol.* **1995**, *13*, 658–660.
- [256] G. Lukinavicius, A. Lapinaite, G. Urbanaviciute, R. Gerasimaite, S. Klimasauskas, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 11594–602.
- [257] S. Hausmann, A. Ramirez, S. Schneider, B. Schwer, S. Shuman, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 1411–20.
- [258] M. A. Smith, A. Rentmeister, C. D. Snow, T. Wu, M. F. Farrow, F. Mingardon, F. H. Arnold, *FEBS J.* **2012**, *279*, 4453–65.
- [259] J. D. Bloom, S. T. Labthavikul, C. R. Otey, F. H. Arnold, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 5869–74.
- [260] Y. Miura, Y. Ichikawa, T. Ishikawa, M. Ogura, R. de Fries, H. Shimada, M. Mitsunashi, *Clin. Chem.* **1996**, *42*, 1758–64.
- [261] K. Fukui, *Angew. Chemie* **1982**, *94*, 852–861.
- [262] K. Fukui, H. Fujimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1968**, *41*, 1989–1997.
- [263] R. Sustmann, *Pure Appl. Chem.* **1974**, *40*, 569–593.
- [264] L. Salem, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 543–552.
- [265] G. S. Hammond, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *77*, 334–338.
- [266] A. Ponti, G. Molteni, *New J. Chem.* **2002**, *26*, 1346–1351.
- [267] V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 1912–6.
- [268] G. T. Javor, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1983**, *24*, 860–7.
- [269] H. E. Kubitschek, *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 94–101.
- [270] F. de Ferra, C. Baglioni, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 2118–2121.
- [271] D. J. Goss, S. E. Carberry, T. E. Dever, W. C. Merrick, R. E. Rhoads, *Biochemistry* **1990**, *29*, 5008–12.
- [272] S. Shuman, J. Hurwitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78*, 187–191.
- [273] P. J. Santangelo, A. W. Lifland, P. Curt, Y. Sasaki, G. J. Bassell, M. E. Lindquist, J. E. C. Jr, N. America, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 347–349.
- [274] C. Andreassi, A. Riccio, *Trends Cell Biol.* **2009**, *19*, 465–74.
- [275] T. Lionnet, K. Czaplinski, X. Darzacq, Y. Shav-tal, L. Amber, J. A. Chao, H. Y. Park, V. De Turris, M. Lopez-jones, R. H. Singer, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 165–170.
- [276] G. Jung, A. Zumbusch, *Microsc. Res. Tech.* **2006**, *69*, 175–185.

- [277] G. Jung, J. Wiehler, B. Steipe, C. Bräuchle, A. Zumbusch, *Chemphyschem* **2001**, 2, 392–396.
- [278] K. M. Dorgan, W. L. Wooderchak, D. P. Wynn, E. L. Karschner, J. F. Alfaro, Y. Cui, Z. S. Zhou, J. M. Hevel, *Anal. Biochem.* **2006**, 350, 249–55.
- [279] T. L. Graves, Y. Zhang, J. E. Scott, *Anal. Biochem.* **2008**, 373, 296–306.
- [280] G. Ibáñez, J. L. McBean, Y. M. Astudillo, M. Luo, *Anal. Biochem.* **2010**, 401, 203–10.
- [281] W. J. Lee, J. Shim, B. T. Zhu, *Mol. Pharmacol.* **2005**, 68, 1018–1030.
- [282] C. Wang, S. Leffler, D. H. Thompson, C. A. Hrycyna, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 331, 351–6.
- [283] N. A. Palmer, S. E. Sattler, A. J. Saathoff, G. Sarath, *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 5220–6.
- [284] Z. Wieczorek, J. Stepinski, M. Jankowska, H. Lönnberg, *J. Photochem. Photobiol. B.* **1995**, 28, 57–63.
- [285] B. Thomas, A. V Akoulitchev, *Trends Biochem. Sci.* **2006**, 31, 173–81.
- [286] K. J. Wu, A. Stedingt, C. H. Becker, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, 7, 142–146.
- [287] I. Nobeli, A. D. Favia, J. M. Thornton, *Nat. Biotechnol.* **2009**, 27, 157–67.
- [288] M. T. Reetz, D. Kahakeaw, R. Lohmer, *ChemBioChem* **2008**, 9, 1797–1804.
- [289] T. Monecke, A. Dickmanns, R. Ficner, *Biospektrum* **2009**, 15, 7–10.
- [290] C. Mazza, A. Segref, I. W. Mattaj, S. Cusack, *EMBO J.* **2002**, 21, 5548–57.
- [291] S. W. Lockless, H. Cheng, A. E. Hodel, F. A. Quirocho, P. D. Gershon, *Biochemistry* **1998**, 2960, 8564–8574.
- [292] A. Niedzwiecka, J. Marcotrigiano, J. Stepinski, M. Jankowska-Anyszka, A. Wyslouch-Cieszynska, M. Dadlez, A.-C. Gingras, P. Mak, E. Darzynkiewicz, N. Sonenberg, et al., *J. Mol. Biol.* **2002**, 319, 615–35.
- [293] K. F. Wilson, P. Fortes, U. S. Singh, M. Ohno, I. W. Mattaj, R. A. Cerione, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 4166–4173.
- [294] G. Calero, K. F. Wilson, T. Ly, J. L. Rios-Steiner, J. C. Clardy, R. A. Cerione, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, 9, 912–7.
- [295] S. Hausmann, S. Shuman, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 4021–4.
- [296] J. R. Zamudio, B. Mittra, G. M. Zeiner, M. Feder, J. M. Bujnicki, N. R. Sturm, D. A. Campbell, *Eukaryot. Cell* **2006**, 5, 905–15.
- [297] G. K. Arhin, H. Li, E. Ullu, C. Tschudi, *RNA* **2006**, 12, 53–62.
- [298] J. Huber, U. Cronshagen, M. Kadokura, C. Marshallsay, T. Wada, M. Sekine, R. Lührmann, *EMBO J.* **1998**, 17, 4114–26.

- [299] K. Rurack, U. Resch-Genger, *Chem. Soc. Rev.* **2002**, 31, 116–127.
- [300] C. J. Fahrni, L. Yang, D. G. Vanderveer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3799–3812.
- [301] C. Uttamapinant, A. Tangpeerachaikul, S. Grecian, S. Clarke, U. Singh, P. Slade, K. R. Gee, A. Y. Ting, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, 51, 5852–6.
- [302] K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang, *Org. Lett.* **2010**, 6, 4603–4606.
- [303] Z. Zhou, C. J. Fahrni, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 8862–3.
- [304] T.-L. Hsu, S. R. Hanson, K. Kishikawa, S.-K. Wang, M. Sawa, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104, 2614–9.
- [305] M. Sawa, T.-L. Hsu, T. Itoh, M. Sugiyama, S. R. Hanson, P. K. Vogt, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103, 12371–6.
- [306] P. Chomczynski, N. Sacchi, *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 581–5.
- [307] J. A. Glasel, *Biotechniques* **1995**, 18, 62–63.
- [308] J. E. Lee, K. A. Cornell, M. K. Riscoe, P. L. Howell, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2001**, 57, 150–152.
- [309] M. T. Hilgers, M. L. Ludwig, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, 98, 11169–74.
- [310] R. L. Weller, S. R. Rajski, *Org. Lett.* **2005**, 7, 2141–4.

8. Anhang

8.1 Entsorgung

Alle, in dieser Arbeit verwendeten, Chemikalien wurden entsprechend ihren H- und P-Sätzen gehandhabt und nach der Gefahrgutverordnung entsorgt. Organische halogenfreie und halogenhaltige Lösungsmittel wurden getrennt in gekennzeichnete Behälter überführt. Kontaminierte Betriebsmittel wurden in dafür vorgesehenen Behältern gesammelt. Ethidiumbromid-Abfälle wurden in gesondert gekennzeichneten Behältern entsorgt. Der Umgang mit humanen Zellen wurde ausschließlich auf Laboratorien der Sicherheitsstufe S1 nach §7 GenTG beschränkt. S1-kontaminierter Abfall wurde vor der Entsorgung in einem Autoklav durch unter Druck (5 bar) stehenden Wasserdampf, 20 min bei 120 °C hitzesterilisiert.

8.2 Gefahrenstoffe und Sicherheitsdaten

Folgende Reagenzien und Lösungsmittel waren mit Gefahrenhinweisen und Sicherheitsratschlägen gemäß §6 der Gefahrstoffverordnung versehen:

Tabelle 8.1 **Gefahrstoffinformationen.**

Substanz	Piktogramme(*)	H-Sätze	P-Sätze
Acetonitril	 	225-302-312-319-332	210-305+351+338-403+235
Acrylamid	 	301-312-315-317-319-332-340-350-361f-372	201-280-302+352-305+ 351 +338
Ameisensäure	 	227-314	260-280-301+330+331-305+351+338
Ampicillin	 	315-317-319-334-335	261-280-305+351+338-342-311
Anilin	   	351-341-331-311-301-372-318-317-400	273-280-308+313-302+352-305+351+338-309+310
APS	  	272-302-315-317-319-334-335	280-305+351+338-302+352-304+341-342+311

Tabelle 8.1 Gefahrstoffinformationen, Fortsetzung.

Substanz	Piktogramme(*)	H-Sätze	P-Sätze
Benzol-sulfonsäure-hydrazid		228-242	210-220-234-280-370+378
Bisacryl-amid		302	–
Allylbromid		H225-H301-H314-H340-H350-H400	P201-P210-P273-P280-P301+P310-P305+P351+P338
Cystamin-Dihydro-chlorid		302	–
Diethylether		224-302-336-EUH019-EUH066	210-304+340-403+235
DMF		226-312+332-319-360D	201-210-302+352-305+351+338-308+313
EDTA		319	305-351-338
Eisessig		226-314	280-301+330+331-305+351+338
Ethanol		225	210
Ethidium-bromid		332-341	281-308+313
Ethylacetat		225-319-336-EUH066	210-240-305+351+338
Form-aldehyd		301-311-314-317-331-351	301+310-303+361+353-305+351+338-361-405-505
Formamid		360D	308+313
Guanidinium chlorid		302-319-315	305+351+338-302+352
Hexan		225-361f-304-373-315-336-411	210-240-273-301+310-331-302+352-403+235
Imidazol		302-314-361d	280-301+330+331-305+351+338

Tabelle 8.1 Gefahrstoffinformationen, Fortsetzung.

Substanz	Piktogramme(*)	H-Sätze	P-Sätze
Isopropanol		225-319-336	210-233-305+351+338
Kanamycin Sulfat		360	201-308+313
Methansulfonylchlorid		300-310+330-314-335	260-264-280-284-301+ 310-302+350
Methanol		225-301-311-331-370	210-233-280-302+352
p-Methoxybenzaldehyd		302	280
NaOH		314-290	280-301+330+331-305+ 351+338
Natriumazid		300-410-EUH032	273
Natriumnitrit		272-301-400	273-309+310
Nickelsulfat		350i-341360D-372-332-302-315-334-317-410	201-280-273-308+313-342+311-302+352
Ni-NTA-Agarose		226-317-373	210-233-261-272-280-302+352-333+313-363-403+235
Perchlorsäure		271-290-314	210-280-301+330+331-305+351+338
Phenol		331-301-311-314-341-373	280-302+352-301+330+331-309-310-305+351+338
Phenylmethylbromid		319-335-315	305+351+338-302+352
Salzsäure konz.		290-314-335	280-301+330+331-305+351+338
SDS		228-311-302-335-315-319	210-280-304+340-305+351+338-309+310

Tabelle 8.1 **Gefahrstoffinformationen, Fortsetzung.**

Substanz	Piktogramme(*)	H-Sätze	P-Sätze
TEMED		225-302-314-332	210-233-280- 301+330+331- 305+351+338
TFA		332-314-412	271-273-301+330+331- 305+351+338
Toluol		225-361D-304-373-315- 336	210-301+310-331- 302+352
Trichlormethan		302-315-351-373	302+352-314
TRIS		315-319-335	261-305+351+338

*Piktogramme entnommen aus: http://praevention.portal.bgn.de/9983?wc_cmt=88b2c4de5ca2deda0ed002c05a304f2a, 12.10.13

8.3 Sequenzdaten

Im Folgenden sind sowohl die DNA- als auch Aminosäuresequenzen verwendeter Trimethylguanosinsynthasen angegeben. Bereiche, die durch Punktmutationen im Vergleich zur Matrize verändert wurden, sind gelb markiert. Das Gen codierend für GlaTgs2-WT wurde durch *GENEART* synthetisiert. Sowohl dieses Gen als auch hieraus resultierende Varianten sind daher Codon-optimiert für *E. coli*. Die AdoMet- und m⁷G-Bindedomäne sind jeweils in den Wildtyp-Enzymen grau hinterlegt.

GlaTgs2-WT

atgagcacctggctgctggatagcaaagtgtgttgaaacgtatgaaatggctgttttagcgat
M S T W L L D S K C V E R M K W L F S D
ctgccggaagaaaaacgtgtgatgatcaaaatgaatgaagtggccttttttagcggttaca
L P E E K R V M I K M N E V A F F S V T
ccggcagtttatgcagatgaagttgcacgtatgatgcgtaccgttctggcactgctgggt
P A V Y A D E V A R M M R T V L A L L G
aaaccgccttatgcagttattgatggcaccgcatgtgttggtggtgatacccgctctgctg
K P P Y A V I D G T A C V G G D T R L L
gcaaaacattttgatatgaccgttgccattgaacgtgatccggaaacctatgcactgctg
A K H F D M T V A I E R D P E T Y A L L
caggataatctgaccacctgggggtgttgatgcaaaaaccattagcggtgataccgcagca
Q D N L T T W G V D A K T I S G D T A A
ctgattccgcagttttggaccctgattggtgcagttgcaaccttttagcctgtatctggac
L I P Q F W T L I G A V A T F S L Y L D
cctccttgggggtggtgttgattatcgtagccagaccgatattcagctgaccctgggtagc
P P W G G V D Y R S Q T D I Q L T L G S
ctggcagttgaagatgttggttaatcgatgcatttgaagcacatctgagcatgaaactggca
L A V E D V V N R A F E A H L S M K L A
gttctgaaactgcctcgcaactataattgcggttacctgtttcgcaactgggtaaacat
V L K L P R N Y N C G Y L F R K L G K H
gaagtgtttcgtattaccagggcaattttttgtgtttttgttgacgtcgtggtagc
E V F R I T Q G N F F V F F V A R R G S
cgtgttaaagaacatggtcgtagccgaatgctgcagctgcgtaaagcacgtgaagaagca
R V K E H G R T A M L Q L R K A R E E A
aaagcacgtagcgaagaaaccaaagaagatggcgaaacacgcggtaacggtgaataa
K A R S E E T K E D G E T R G N G E -

GlaTgs2-V34A

atgagcacctggctgctggatagcaaagtgtgttgaaacgtatgaaatggctgttttagcgat
M S T W L L D S K C V E R M K W L F S D
ctgccggaagaaaaacgtgtgatgatcaaaatgaatgaagccgccttttttagcggttaca
L P E E K R V M I K M N E A A F F S V T
ccggcagtttatgcagatgaagttgcacgtatgatgcgtaccgttctggcactgctgggt
P A V Y A D E V A R M M R T V L A L L G
aaaccgccttatgcagttattgatggcaccgcatgtgttggtggtgatacccgctctgctg
K P P Y A V I D G T A C V G G D T R L L
gcaaaacattttgatatgaccgttgccattgaacgtgatccggaaacctatgcactgctg
A K H F D M T V A I E R D P E T Y A L L
caggataatctgaccacctgggggtgttgatgcaaaaaccattagcggtgataccgcagca
Q D N L T T W G V D A K T I S G D T A A
ctgattccgcagttttggaccctgattggtgcagttgcaaccttttagcctgtatctggac
L I P Q F W T L I G A V A T F S L Y L D
cctccttgggggtggtgttgattatcgtagccagaccgatattcagctgaccctgggtagc
P P W G G V D Y R S Q T D I Q L T L G S
ctggcagttgaagatgttggttaatcgatgcatttgaagcacatctgagcatgaaactggca
L A V E D V V N R A F E A H L S M K L A
gttctgaaactgcctcgcaactataattgcggttacctgtttcgcaactgggtaaacat
V L K L P R N Y N C G Y L F R K L G K H
gaagtgtttcgtattaccagggcaattttttgtgtttttgttgacgtcgtggtagc
E V F R I T Q G N F F V F F V A R R G S
cgtgttaaagaacatggtcgtagccgaatgctgcagctgcgtaaagcacgtgaagaagca
R V K E H G R T A M L Q L R K A R E E A
aaagcacgtagcgaagaaaccaaagaagatggcgaaacacgcggtagcggtagaataa
K A R S E E T K E D G E T R G S G E -

GlaTgs2-T70A

atgagcacctggctgctggatagcaaagtgtgttgaacgtatgaaatggctgttttagcgat
M S T W L L D S K C V E R M K W L F S D
ctgccggaagaaaaacgtgtgatgatcaaaatgaatgaagtggccttttttagcggttaca
L P E E K R V M I K M N E V A F F S V T
ccggcagtttatgcagatgaagttgcacgtatgatgcgtaccgttctggcactgctgggt
P A V Y A D E V A R M M R T V L A L L G
aaaccgccttatgcagttattgatggcgccgcatgtgttgggtgggtgatacccgctctgctg
K P P Y A V I D G A A C V G G D T R L L
gcaaaacattttgatatgaccgttgccattgaacgtgatccggaacctatgcactgctg
A K H F D M T V A I E R D P E T Y A L L
caggataatctgaccacctgggggtgttgatgcaaaaaccatttagcgggtgataccgcagca
Q D N L T T W G V D A K T I S G D T A A
ctgattccgcagttttggaccctgattgggtgcagttgcaaccttttagcctgtatctggac
L I P Q F W T L I G A V A T F S L Y L D
cctccttgggggtgggtgttgattatcgtagccagaccgatattcagctgaccctgggtagc
P P W G G V D Y R S Q T D I Q L T L G S
ctggcagttgaagatgttgttaatcgtagcatttgaagcacatctgagcatgaaactggca
L A V E D V V N R A F E A H L S M K L A
gttctgaaactgcctcgcaactataattgcgggttacctgtttcgcaactgggtaaacat
V L K L P R N Y N C G Y L F R K L G K H
gaagtgtttcgtattaccaggggaattttttgtgtttttgttgcacgtcgtggtagc
E V F R I T Q G N F F V F F V A R R G S
cgtgttaaagaacatggctcgtagccgaatgctgcagctgcgtaaagcacgtgaagaagca
R V K E H G R T A M L Q L R K A R E E A
aaagcacgtagcgaagaaaccaaagaagatggcgaaacacgcggtagcgggtgaataa
K A R S E E T K E D G E T R G S G E -

GlaTgs2-C72A

atgagcacctggctgctggatagcaaagtgtgttgaacgtatgaaatggctgttttagcgat
M S T W L L D S K C V E R M K W L F S D
ctgccggaagaaaaacgtgtgatgatcaaaatgaatgaagtggccttttttagcggttaca
L P E E K R V M I K M N E V A F F S V T
ccggcagtttatgcagatgaagttgcacgtatgatgcgtaccgttctggcactgctgggt
P A V Y A D E V A R M M R T V L A L L G
aaaccgccttatgcagttattgatggcaccgcagccggttgggtgggtgatacccgctctgctg
K P P Y A V I D G T A A V G G D T R L L
gcaaaacattttgatatgaccgttgccattgaacgtgatccggaacctatgcactgctg
A K H F D M T V A I E R D P E T Y A L L
caggataatctgaccacctgggggtgttgatgcaaaaaccatttagcgggtgataccgcagca
Q D N L T T W G V D A K T I S G D T A A
ctgattccgcagttttggaccctgattgggtgcagttgcaaccttttagcctgtatctggac
L I P Q F W T L I G A V A T F S L Y L D
cctccttgggggtgggtgttgattatcgtagccagaccgatattcagctgaccctgggtagc
P P W G G V D Y R S Q T D I Q L T L G S
ctggcagttgaagatgttgttaatcgtagcatttgaagcacatctgagcatgaaactggca
L A V E D V V N R A F E A H L S M K L A
gttctgaaactgcctcgcaactataattgcgggttacctgtttcgcaactgggtaaacat
V L K L P R N Y N C G Y L F R K L G K H
gaagtgtttcgtattaccaggggaattttttgtgtttttgttgcacgtcgtggtagc
E V F R I T Q G N F F V F F V A R R G S
cgtgttaaagaacatggctcgtagccgaatgctgcagctgcgtaaagcacgtgaagaagca
R V K E H G R T A M L Q L R K A R E E A
aaagcacgtagcgaagaaaccaaagaagatggcgaaacacgcggtagcgggtgaataa
K A R S E E T K E D G E T R G S G E -

hTgs1₆₁₈₋₈₅₃-WT

```

gaagtgaaaaagaagaagaacaagaagaagaacaaaaagggtgaatgggtctgcctcctgaa
E V K K K K N K K K N K K V N G L P P E
atagctgctgttctctgagctggcaaaatactgggccagaggtacaggtctcttctccgt
I A A V P E L A K Y W A Q R Y R L F S R
tttgatgatggpattaagttggacagagagggctgggttttcagttacacccgagaagatt
F D D G I K L D R E G W F S V T P E K I
gctgaacacattgctggcgtgttagtcagtccttcaagtgtgacgttggtagtagacgca
A E H I A G R V S Q S F K C D V V V D A
ttctgtggagttggaggaaataccattcagtttgcttaacaggaatgagagtgattgcc
F C G V G G N T I Q F A L T G M R V I A
attgatatcgatcctgttaagattgcccttgctcgcaataatgcagaagtttatgggata
I D I D P V K I A L A R N N A E V Y G I
gcagataagatagagttcatctgtggagatttcttgctgctggcttcttttttaaggct
A D K I E F I C G D F L L L A S F L K A
gatgtcgtgttcctcagcccaccttggggagggccagactatgccactgcagagaccttt
D V V F L S P P W G G P D Y A T A E T F
gacattagaacaatgatgtctcctgatggctttgaaattttcagacttttctaagaagatc
D I R T M M S P D G F E I F R L S K K I
actaataatattgtttatttttctccaagaaatgctgatattgaccaggtggcatcctta
T N N I V Y F L P R N A D I D Q V A S L
gctgggcctggagggcaagtggaaatagaacagaacttcttaacaacaaattgaagaca
A G P G G Q V E I E Q N F L N N K L K T
atcactgcataatttgggtgacctaattcgaagaccagcctctgaaacctaa
I T A Y F G D L I R R P A S E T -

```

8.4 Vektorkarten

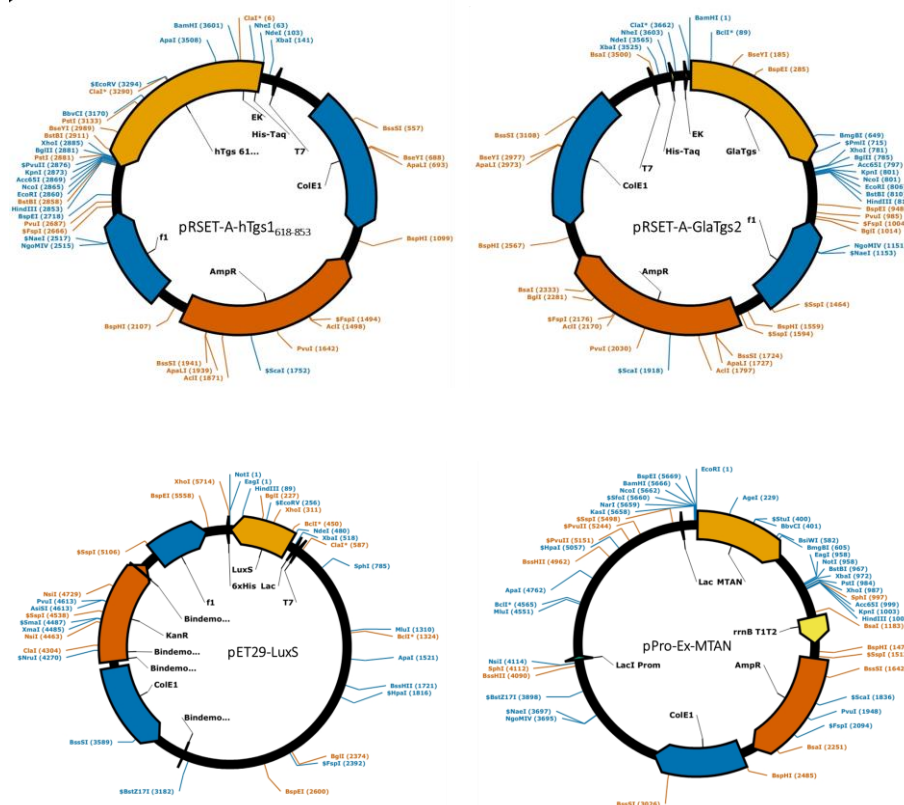


Abbildung 8.1 Vektorkarten der verwendeten Plasmide, erstellt mit Plasma-DNA 1.4.2. Die verwendeten Vektoren sind jeweils mit codiertem Gen, Resistenz sowie *ori* in Leserichtung dargestellt sind.

8.5 Charakterisierungen von Verbindungen und Reaktionen

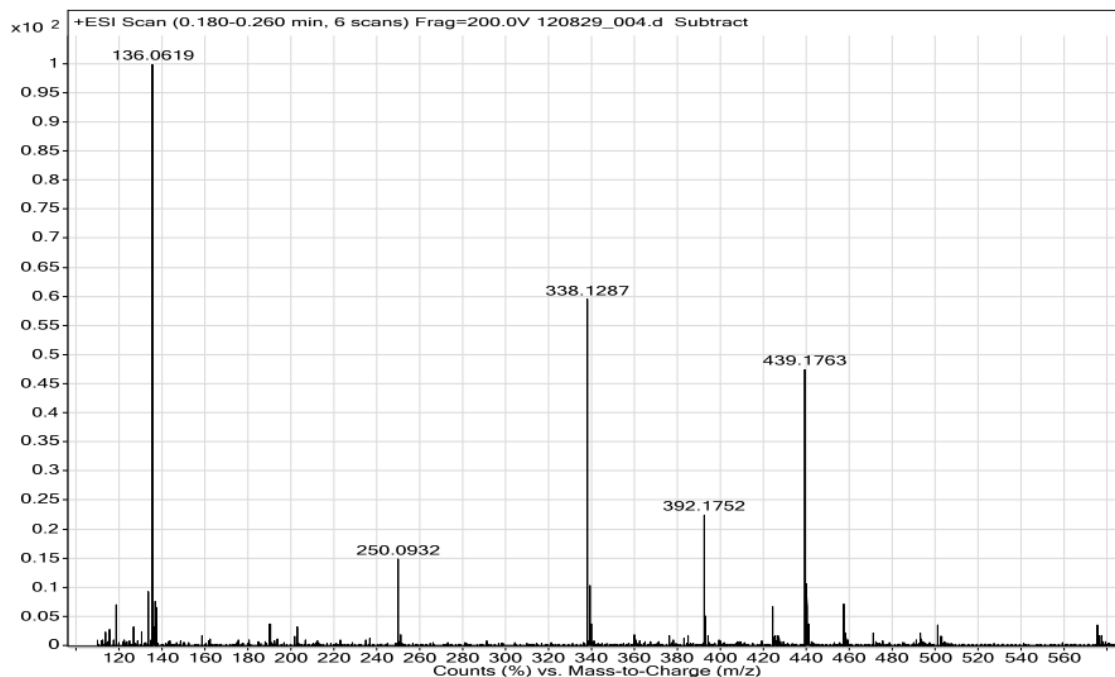


Abbildung 8.2 **Massenspektrometrische Analyse des erhaltenen Produkts aus der Synthese von 2-Me-AdoPropen.** Das erhaltene Produkt wurde mittels ESI-TOF-MS charakterisiert und die Masse von 2-Me-AdoPropen 2 (ber. $[M]^+ = 439,18$ m/z) konnte nachgewiesen werden (det. $[M]^+ = 439,18$ m/z).

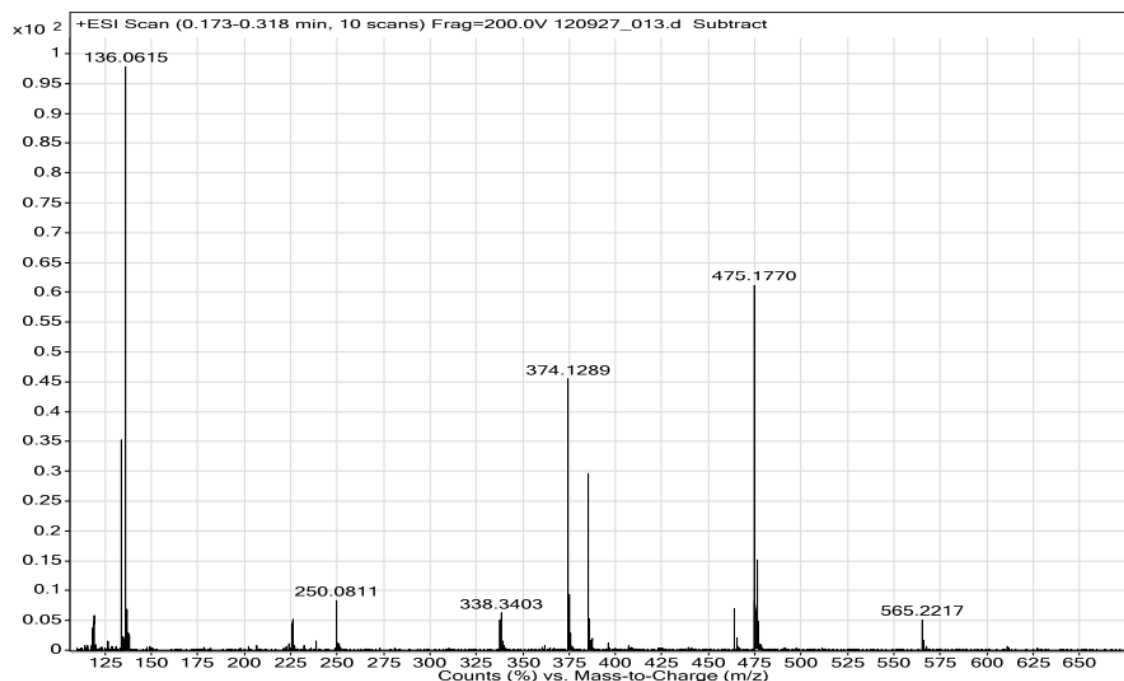


Abbildung 8.3 **Massenspektrometrische Analyse des erhaltenen Produkts aus der Synthese von AdoBenzyl.** Das erhaltene Produkt wurde mittels ESI-TOF-MS charakterisiert und die Masse von AdoBenzyl 3 (ber. $[M]^+ = 475,18$ m/z) konnte nachgewiesen werden (det. $[M]^+ = 475,18$ m/z).

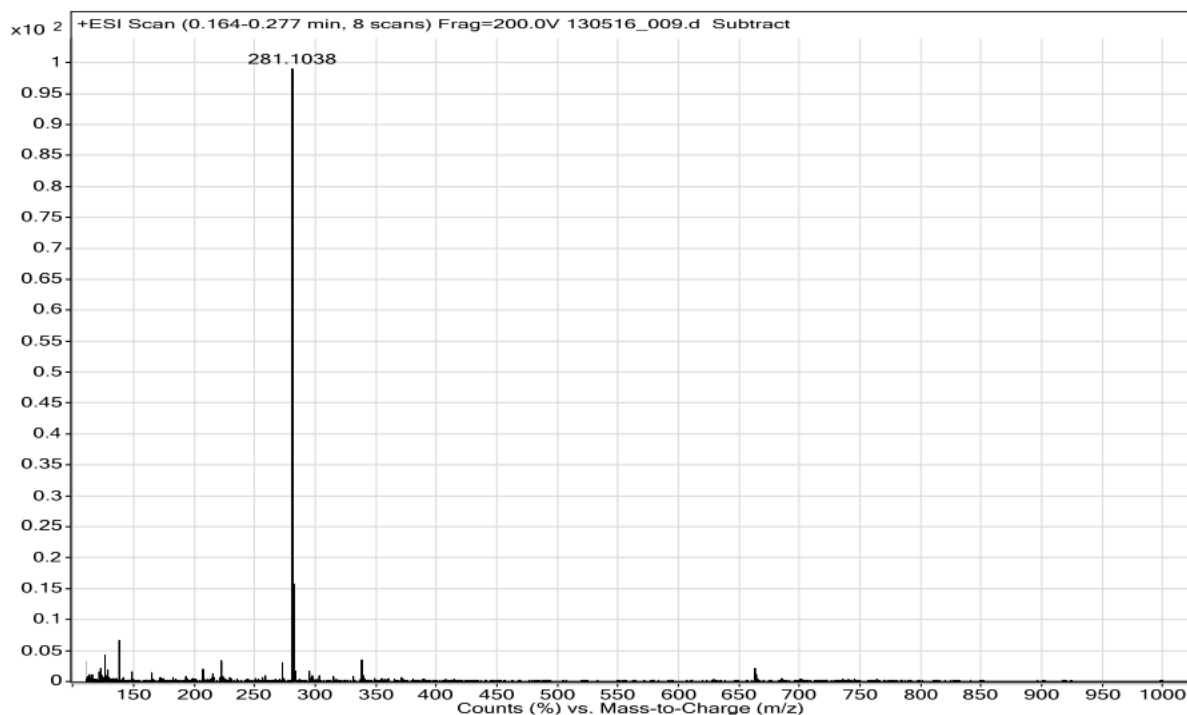


Abbildung 8.4 Massenspektrometrische Analyse des erhaltenen Produkts aus der Synthese von Benzoat-Tetrazol 7. Das erhaltene Produkt wurde mittels ESI-TOF-MS charakterisiert und die Masse von Benzoat-Tetrazol 7 (ber. $[M+H]^+ = 281,1 \text{ m/z}$) konnte nachgewiesen werden (det. $[M+H]^+ = 281,1 \text{ m/z}$).

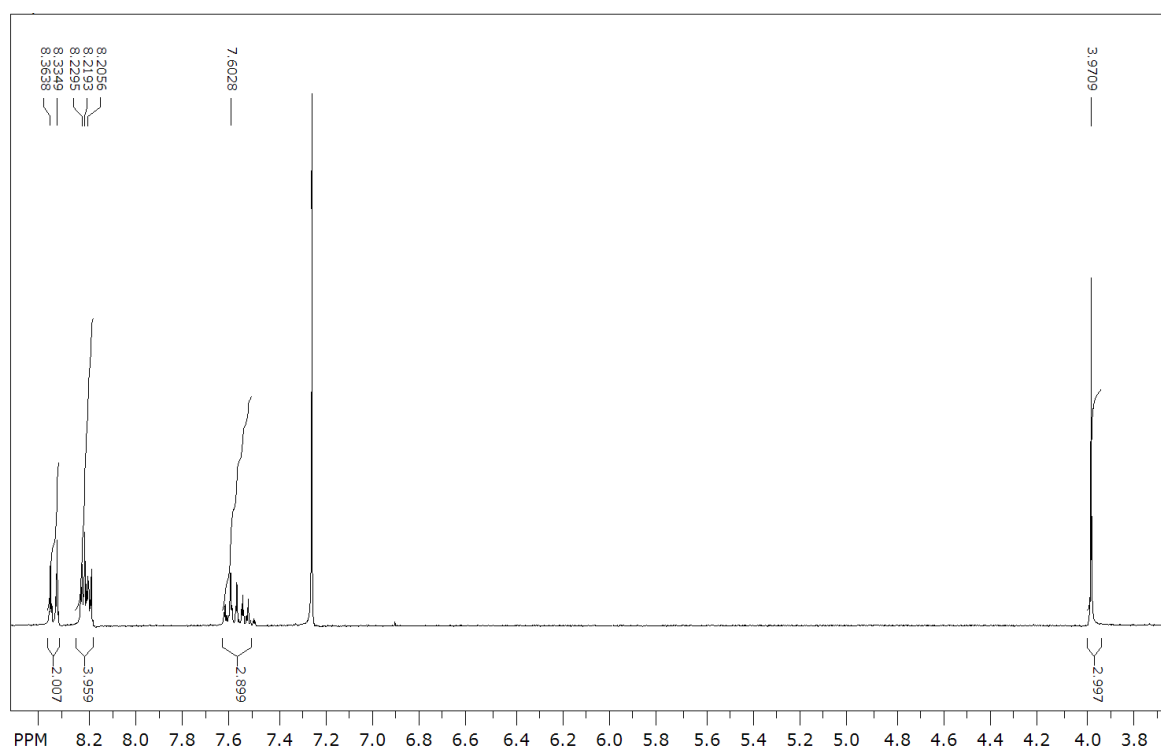


Abbildung 8.5 ^1H -NMR-Analyse des erhaltenen Produkts aus der Synthese von Benzoat-Tetrazol 7. Das erhaltene Produkt wurde mittels ^1H -NMR charakterisiert, (300 Hz, CDCl_3) δ 8,34 (d, $J=8,8 \text{ Hz}$, 2H), 8,23-8,19 (m, 4H), 7,62-7,50 (m, 3H), 3,97 (s, 3H).

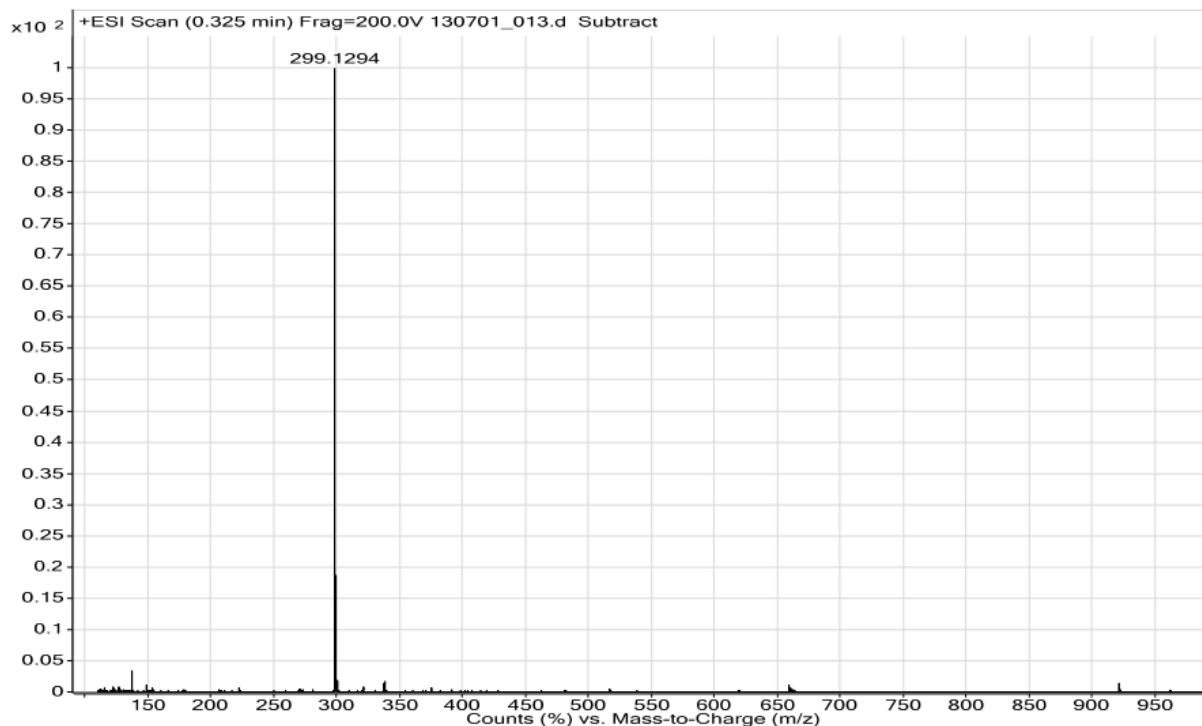


Abbildung 8.6 **Massenspektrometrische Analyse des erhaltenen Produkts aus der Synthese von Biphentetrazol 8.** Das erhaltene Produkt wurde mittels ESI-TOF-MS charakterisiert und die Masse von Biphentetrazol 8 (ber. $[M+H]^+ = 299,12 \text{ m/z}$) konnte nachgewiesen werden (det. $[M+H]^+ = 299,13 \text{ m/z}$).

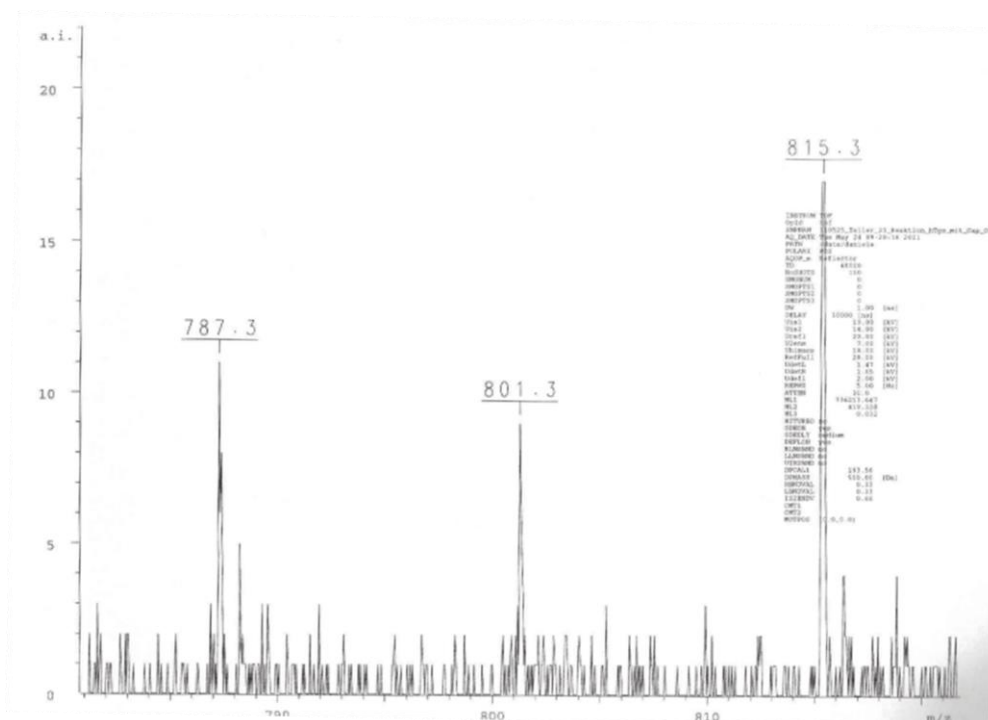


Abbildung 8.7 **Massenspektrometrische Analyse der Biokonversion von $m^7\text{GpppA}$ und AdoMet mit hTgs1.** Das Kappen-Analogon $m^7\text{GpppA}$ 9 wurde in Gegenwart von AdoMet 12 mit hTgs1 umgesetzt. Die Reaktion wurde mittels MALDI-TOF-MS analysiert und sowohl die Masse des Edukts $m^7\text{GpppA}$ 9 (ber. $[M]^+ = 787,1$; det. $[M]^+ = 787,3 \text{ m/z}$) als auch die Massen der erwarteten Produkte $m^{2,7}\text{GpppA}$ 10 (ber. $[M]^+ = 801,1$; det. $[M]^+ = 801,3 \text{ m/z}$) und $m^{2,2,7}\text{GpppA}$ 11 (ber. $[M]^+ = 815,1 \text{ m/z}$; det. $[M]^+ = 815,3 \text{ m/z}$) konnten nachgewiesen werden.

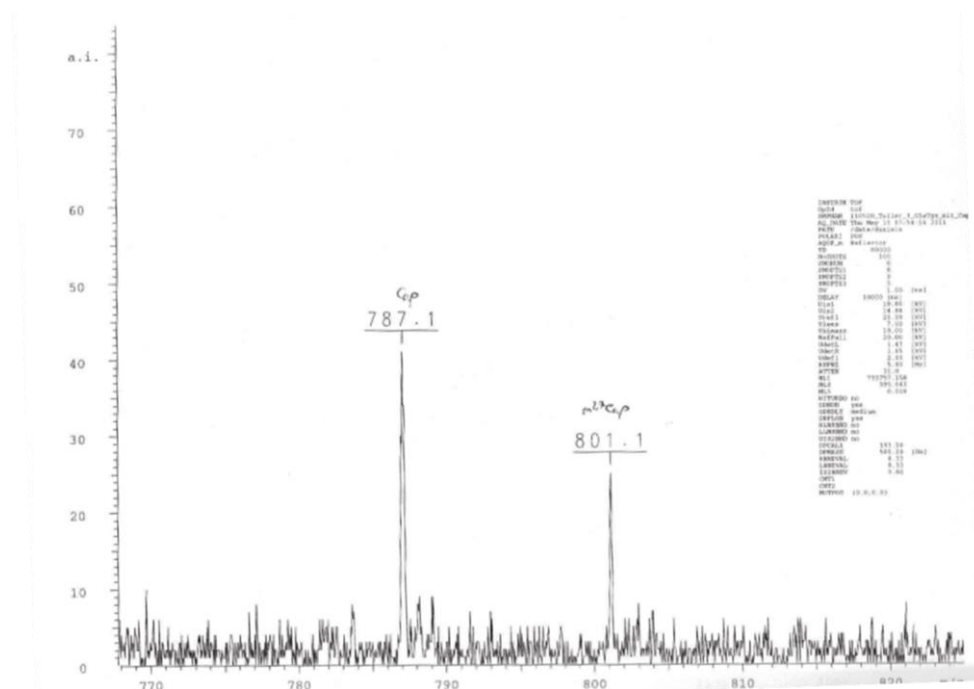


Abbildung 8.8 **Massenspektrometrische Analyse der Biokonversion von m⁷GpppA mit AdoMet durch GlaTgs2.** Das Kappen-Analogon m⁷GpppA **9** wurde in Gegenwart von AdoMet **12** mit GlaTgs2 umgesetzt. Die Reaktion wurde mittels MALDI-TOF-MS analysiert und sowohl die Masse des Edukts m⁷GpppA **9** (ber. [M]⁺=787,1; det. [M]⁺=787,1 m/z) als auch die Masse des erwarteten Produkts m^{2,7}GpppA **10** (ber. [M]⁺=801,1; det. [M]⁺=801,1 m/z) konnte nachgewiesen werden.

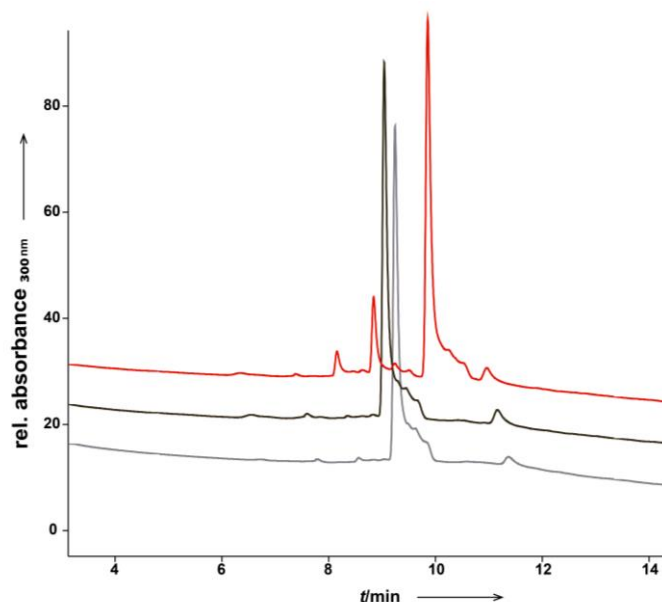


Abbildung 8.9 **Regiospezifische Modifikation der mRNA-Kappe durch GlaTgs2-V34A mit AdoPropen.** Um den Erhalt der enzymatischen Regiospezifität auch bei Verwendung der Variante GlaTgs2-V34A und des AdoMet-Analogons AdoPropen nachzuweisen, wurde zunächst das Atom N² des Kappen-Analogons m⁷GpppA **9** durch einen Methyltransfers blockiert. Hierzu wurde m⁷GpppA **9** durch GlaTgs2-V34A in Gegenwart von AdoMet **12** modifiziert. Die Bildung von m^{2,7}GpppA **10** wurde mittels RP-HPLC (Absorption 300 nm) kontrolliert (hellgrau). Die hypermethylierte Kappe **10** konnte nicht weiter modifiziert werden, wenn im Folgenden die Biokonversion in Gegenwart von AdoPropen **1** erfolgte (dunkelgrau). Hingegen war unter den gleichen Bedingungen GlaTgs2-V34A in der Lage N²-allyl-m⁷GpppA **14** zu bilden, wenn zuvor keine Methylierung erfolgt war (rot).

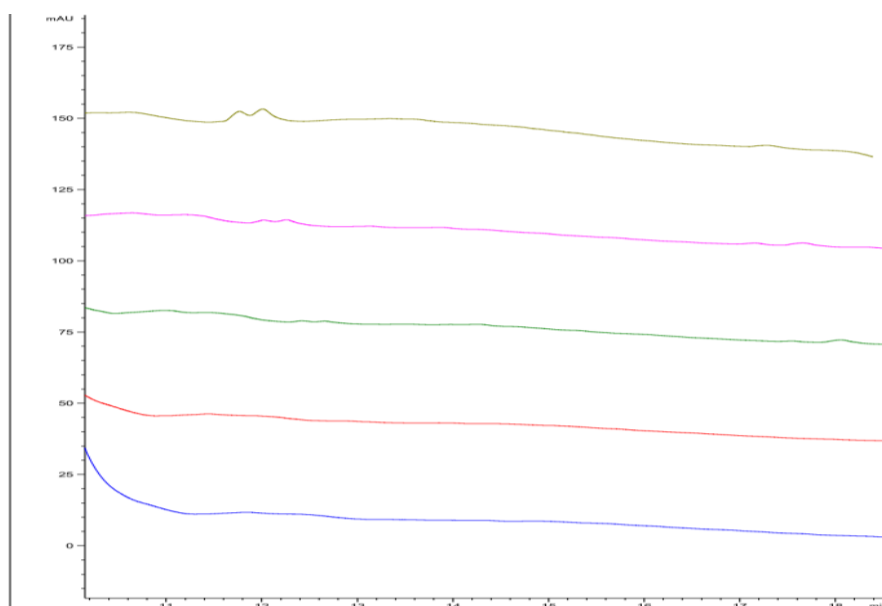


Abbildung 8.10 Einfluss der Anwesenheit von Sauerstoff auf die Ausbeute der Thiol-En-Click-Reaktion. Die Biotinylierung von N^2 -Allyl- m^7 GTP in einer Thiol-En-Click-Reaktion erfolgte in An- und Abwesenheit O_2 und die Reaktionen wurden vor und nach Inkubation bei 44 °C mittels RP-HPLC analysiert. Produktbildung konnte in Abwesenheit von O_2 nach Reaktionszeiten von 4 h (rosa) und 6 h (braun) nachgewiesen werden. Ein entsprechendes Signal wurde nicht vor der Inkubation detektiert (rot) und auch nicht in der Reaktion welche in Gegenwart von O_2 durchgeführt worden war (blau= t_0 ; grün= t_4).

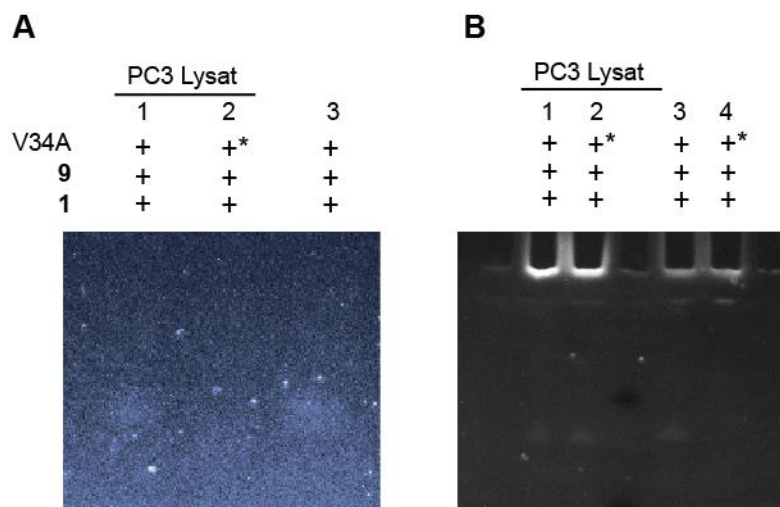


Abbildung 8.11 Analyse der Photoclick-Reaktion nach Durchführung in Lysat. **A)** Analyse der Photoclick Reaktion von **14** mit **6**, durchgeführt in Gegenwart von eukaryotischem Lysat aus 6×10^7 PC3-Zellen. Die Biokonversion von m^7 GpppA **9** zu **14** wurde in Lysat (1, 2) durchgeführt und nach Dialyse eine Photoclick-Reaktion durchgeführt. Die Proben wurden gelelektrophoretisch (20 % denat. Gel) getrennt und fluoreszierende Produkte durch Beleuchtung mit einer UV-Handlampe ($\lambda_{\text{Ex}}=365$ nm) detektiert. In Gegenwart von **14** (1, 3) konnte eine spezifische Produktbildung beobachtet werden. In der Kontrolle (2, (*)) denat. Enzym in Biokonversion) wurde kein fluoreszierendes Produkt detektiert. **B)** Analyse der Photoclick Reaktion von **14** mit **6**, durchgeführt in Gegenwart von eukaryotischem Lysat aus 1×10^8 PC3-Zellen. Die Biokonversion von m^7 GpppA **9** zu **14** wurde in Lysat durchgeführt (1, 2) und nach Dialyse eine Photoclick-Reaktion durchgeführt. Die Proben wurden gelelektrophoretisch getrennt und fluoreszierende Produkte durch Beleuchtung mit einer UV-Handlampe ($\lambda_{\text{Ex}}=365$ nm) detektiert. In Gegenwart von Puffer (3, 4) konnte spezifische Produktbildung mit **14** beobachtet werden (3). In der Kontrolle (4, (*)) denat. Enzym in Biokonversion) wurde kein fluoreszierendes Produkt detektiert. In Gegenwart von Lysat wurde in An- und Abwesenheit von **14** ein fluoreszierendes Produkt detektiert.

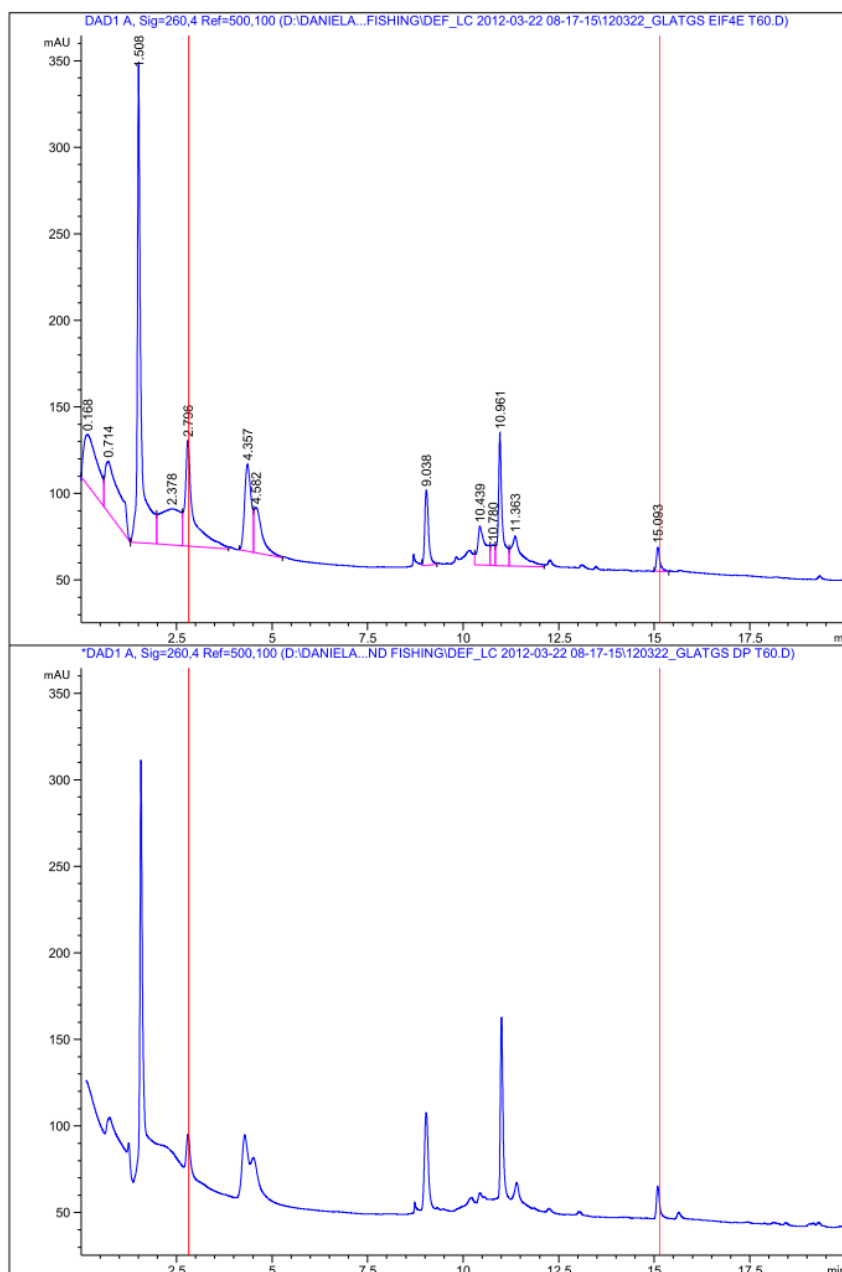


Abbildung 8.12 **Überprüfung der Zugänglichkeit von N^2 der Kappe in Gegenwart von eIF4E.** Das Kappen-Analogon m^7GTP ($9\ \mu M$) wurde in Gegenwart von Puffer (oben) bzw. eIF4E ($15\ \mu M$, unten) für eine Biokonversion zu $m^{2,7}GTP$ durch GlcTgs2-WT eingesetzt und die Reaktion mittels RP-HPLC (Abs. 260 nm) hinsichtlich der Bildung von $m^{2,7}GTP$ ($t_R=9\ min$) überprüft.

Danksagung

Zunächst möchte ich Frau Prof. Andrea Rentmeister danken, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses Thema bearbeiten und auch mit eigenen Ideen füllen zu dürfen. Ein Dankeschön aber auch dafür, dass man sich jederzeit auf Unterstützung, Vorschläge und motivierende Worte verlassen konnte. Und Danke auch für manche Herausforderung ☺

Herrn Prof. Ulrich Hahn danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und viele motivierende Worte.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an den gesamten AK Rentmeister: Anna Rath, Stephanie Besztejan, Josephin Holstein, Stefanie Kellermann, Dénes Haase und Julia Sandberg-Meinhardt für ein entspanntes Arbeitsklima mit vielen, vielen lustige Momenten und für die Gewissheit, jederzeit auf Hilfe zählen zu können. Ganz besonders danke ich dabei Josi, dass immer ein Eppi AdoEnYn im Tiefkühler zu finden war ☺. Anna und Steph möchte ich an dieser Stelle den „*Thanks-a-lot-care-bear*“ überreichen: ich danke euch für die ganze Unterstützung im Labor und dafür, dass ihr mir bei jedem Problem mit Rat und Tat zur Seite standet und jede meiner „Depri-Phase“ erfolgreich mit einer Riesenladung Zucker (in Form von Eistee, Kakao oder Schokolade) bekämpft habt. Ich danke euch für ganz viele schöne Erinnerungen (vor allem auch außerhalb der Laborwände) und dafür, dass ich sagen kann, in euch richtig gute Freunde gefunden zu haben.

Dem gesamten AK Hahn ein Dankeschön dafür, dass man jederzeit auf Hilfe zählen konnte und dass man Geräte blockieren und ab und zu auch mal eine Kleinigkeit schnorren durfte.

Frau Prof. Carmen Herrmann danke ich für die geduldige Anfertigung der vielen DFT-Kalkulationen.

Ich möchte der MS-Abteilung der Uni Hamburg und ganz besonders Dr. Maria Trusch, Dany Gellert, Christine Christ und Gaby Graack danken, für gute Tipps, für alle Messungen und vor allem für die Geduld mit meinen Proben.

Herrn JProf. Malte Brasholz, Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Wittko Francke und Herrn Felix Wojcik (Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Potsdam), danke ich

ganz besonders dafür, dass sie sich Zeit genommen haben, um mir neue Wege und Ideen aufzuzeigen. Herrn Ivo Sarac danke ich für ein offenes Ohr bei verzwickten Chemie-Fragen.

Herrn Dr. Ulf Görbig möchte ich danken, da er mich vor einigen Nervenzusammenbrüchen an der HPLC bewahrt hat. Danke, Ulf. Ohne dich hätte die HPLC die Jahre bestimmt nicht überstanden.

Herrn Prof. Ralf Ficner (Universität Göttingen) sowie Frau Prof. Birgit Dräger und Frau Dr. Yvonne Sichhardt (Universität Halle-Wittenberg) möchte ich für die Bereitstellung der Plasmide p-GEX-6P-hTgs₁₆₁₈₋₈₅₃ bzw. pProEx-MTAN und pET-29a-LuxS danken, da ich so direkt einen guten Start in die praktische Arbeit hatte. Herrn Prof. Elmar Weinhold danke ich für die Möglichkeit SeAdoYn testen zu können.

An dieser Stelle möchte ich auch den Menschen danken, die sich mit mir durch das Studium gekämpft haben und auch während der Doktorarbeit immer für mich da waren und sich jedes noch so kleine Problemchen geduldig angehört haben. Mit euch hat sogar das Essen in der Mensa geschmeckt: Sunhild, Elvira und Anne, ich danke euch für eure Unterstützung und die Freundschaft und freue mich schon euch Münster zeigen zu können ☺. Ich werde euch da vermissen...

Zum Abschluss dieser Arbeit und von ganzem, ganzem Herzen, möchte ich den wichtigsten Menschen in meinem Leben danken, die mich jeden Tag unterstützen, für mich da sind, mir zuhören und mich zum Lachen bringen. Ich werde nicht in Worte fassen können, was ihr mir bedeutet, aber ich glaube, das wisst ihr auch so.

Robert, meinem StiefPapi und der allerbesten Mama der Welt,
möchte ich an dieser Stelle einfach sagen:

Danke für eure Liebe ❤

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Verwendung anderer als der angegeben Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die wörtlich oder inhaltlich benutzten Quellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Darüber hinaus erkläre ich, dass ich keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation unternommen habe. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Zudem erkläre ich mich mit der Veröffentlichung der vorliegenden Arbeit ab dem 11. Dezember 2013 einverstanden.

Hamburg, den 30. Oktober 2013

.....

Daniela Schulz

Curriculum Vitae

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Veröffentlichungen

Publikationen

Schulz D., Holstein J. M., Rentmeister A., *A Chemo-Enzymatic Approach for Site-Specific Modification of the RNA Cap*, *Angewandte Chemie Int. Ed.* **2013**, 52, 7874-7878.

Schulz D., Rentmeister A., *An enzyme-coupled high-throughput assay for screening RNA methyltransferase activity in E. coli cell lysate*, *RNA Biology* **2012**, 9, 1-10.

Hecker J., Diethers A., Schulz D., Plum M., Mempel M., Ollert M. W., Jakob T., Blank S., Braren I., Spillner E., *An IgE epitope of Bet v 1 and fagales PR10 proteins as defined by a human monoclonal IgE*, *Allergy* **2012**, 67, 1530-1537.

Buchartikel

Schulz D., Rentmeister A., *Chemo-enzymatic strategies to modify RNA in vitro or in living cells*, *Chemical Biology of Nucleic Acids: Fundamentals and Clinical Applications*, eingereicht.

Poster

7th Meeting of the GBM Study Group RNA Biochemistry, Bonn 10/2012
„An enzyme-coupled high-throughput assay for screening RNA methyltransferase activity in *E. coli* cell lysate”

Biocat2012, Hamburg 9/2012
„An enzyme-coupled high-throughput assay for screening RNA methyltransferase activity in *E. coli* cell lysate”

Vorträge

Rabensteiner Kolleg, Pottenstein 6/2011
„Chemo-enzymatische Modifikation der mRNA-Kappe“

Patent

Deutsche Patentanwendung eingereicht
Rentmeister, A. , Schulz, D., Aktenzeichen 10 2012 222 675.3
“Mittel und Verfahren zur Modifizierung der 5’-Kappe von RNA”.

