

## RNA-Modifikationen

## Strategien zur Vermeidung von Artefakten in der massenspektrometrischen Epitranskriptomanalytik

Steffen Kaiser<sup>+</sup>, Shane R. Byrne<sup>+</sup>, Gregor Ammann, Paria Asadi Atoi, Kayla Borland, Roland Brecheisen, Michael S. DeMott, Tim Gehrke, Felix Hagelskamp, Matthias Heiss, Yasemin Yoluç, Lili Liu, Qinghua Zhang, Peter C. Dedon, Bo Cao\* und Stefanie Kellner\*

**Abstract:** In diesem Artikel führen wir eine Strukturvalidierung von RNA-Phosphorothioat (PT)-Modifikationen durch, von welchen vor Kurzem im Epitranskriptom von Bakterien und Eukaryoten, einschließlich des Menschen, berichtet wurde. Durch den Vergleich synthetischer PT-haltiger Diribonukleotide mit nativen Spezies aus RNA-Hydrolysaten mittels hochauflösender Massenspektrometrie (MS), metabolisch stabiler Isotopenmarkierung und PT-spezifischer Iodoxidation, widerlegen wir die Existenz von PTs in RNA aus *E. coli*, *S. cerevisiae*, menschlichen Zelllinien und Mausgehirn. Darüber hinaus erläutern wir, wie 2'-O-methylierte Diribonukleotide durch ein MS-Artefakt anfänglich als RNA-Phosphorothioate fehlidentifiziert wurden. Um die Strukturvalidierung neuer Nukleinsäuremodifikationen zu unterstützen, präsentieren wir einen detaillierten Leitfaden für die MS-Analyse von RNA-Hydrolysaten und betonen, wie das gewählte RNA-Verdauprotokoll ein entscheidender Faktor bei der Entdeckung und Quantifizierung von RNA-Modifikationen in biologischen Proben sein kann.

## Einleitung

Jede RNA wird zunächst aus vier kanonischen Bausteinen transkribiert, wobei in die Transkripte dann Modifikationen aus einem Pool von über 170 bekannten chemisch modifizierten Nukleotiden enzymatisch eingebracht werden. Diese Modifikationen werden als Epitranskriptom zusammengefasst.<sup>[1]</sup> Vor kurzem wurde die erste bekannte Modifikation

des Phosphatrückgrats in RNA beschrieben, welche sich durch die Substitution eines Phosphatsauerstoffs durch Schwefel auszeichnet. Diese natürlichen Phosphorothioate (PT) wurden sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten beschrieben.<sup>[2]</sup>

Während native PT erst jetzt in RNA beschrieben wurden, sind sie schon länger aus bakterieller DNA bekannt.<sup>[3]</sup> Der Schwefel des PT verursacht eine Anfälligkeit der Nukleinsäure gegenüber Oxidantien, was zu Strangbrüchen führt.<sup>[4]</sup> Diese Instabilität hat auch ursprünglich zur Identifikation schwefelhaltiger DNA mittels oxidativer Gelelektrophorese geführt,<sup>[5]</sup> lange bevor die Struktur der PT mittels Massenspektrometrie (MS) aufgeklärt werden konnte.<sup>[3]</sup> Heute wird Oxidationsempfindlichkeit ausgenutzt, um die Position von PTs in bakteriellen Genomen bei Einzelnukleotidauflösung durch iodinduzierte Spaltung und nachfolgender Sequenzierung zu bestimmen.<sup>[6]</sup> PTs werden durch einen speziellen Enzymkomplex, DndABCDE, eingeführt,<sup>[7]</sup> wobei DndA eine Cystein-Desulfurase darstellt. In *E. coli* wird DndA manchmal auch durch die Desulfurase IscS ersetzt,<sup>[8]</sup> welche für mehrere RNA Thiolierungsprozesse verantwortlich ist.<sup>[9]</sup> Ungefähr die Hälfte aller PT-haltiger Bakterien haben ein zusätzliches Set an Restriktionsenzymen, DndFGHI, als Teil eines klassischen Restriktions-Modifikations-Systems.<sup>[10]</sup> In manchen Bakterien wurde gezeigt, dass PT an der epigenetischen 6-Methyladenosin Modifikation der DNA beteiligt sind, indem sie die DNA-Methyltransferase Dam beeinflussen.<sup>[11]</sup> Die genomische Integration von PT ist für Mikroor-

[\*] Dr. S. Kaiser,<sup>[†]</sup> M. Sc. G. Ammann, P. Asadi Atoi, Dr. K. Borland, M. Sc. F. Hagelskamp, M. Sc. M. Heiss, M. Sc. Y. Yoluç, Prof. Dr. S. Kellner  
Ludwig-Maximilians Universität München  
Butenandtstr. 5–13, 81137 München (Deutschland)  
Dr. S. R. Byrne,<sup>[†]</sup> Dr. M. S. DeMott, Prof. P. C. Dedon  
Department of Biological Engineering and Center for Environmental Health Sciences, Massachusetts Institute of Technology  
Cambridge, MA 02139 (USA)  
Dr. R. Brecheisen, Dr. T. Gehrke  
Ella Biotech GmbH  
82152 München (Deutschland)  
L. Liu, Q. Zhang, Prof. B. Cao  
College of Life Sciences, Qufu Normal University  
Qufu, Shandong 273165 (China)  
E-Mail: caobo@qfnu.edu.cn  
Prof. P. C. Dedon  
Antimicrobial Resistance Interdisciplinary Research Group, Singapore-Massachusetts Institute of Technology Alliance for Research

and Technology  
138602 Singapore (Singapur)  
Dr. S. Kaiser,<sup>[†]</sup> Prof. Dr. S. Kellner  
Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt  
Max-von-Laue-Str. 9, 60438 Frankfurt (Deutschland)  
E-Mail: Kellner@pharmchem.uni-frankfurt.de

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.  
Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors sind unter:  
<https://doi.org/10.1002/ange.202106215> zu finden.

© 2021 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

ganismen von Vorteil und von daher ist eine weite Verbreitung von PT im menschlichen Mikrobiom nicht überraschend.<sup>[12]</sup>

Die Entdeckung der letzten RNA-Modifikationen, einschließlich PT in RNA, wurde durch detektionsempfindliche MS-Analyse ermöglicht. Obwohl dieser Ansatz verhältnismäßig einfach ist und regelmäßig über Fortschritte berichtet wird,<sup>[13]</sup> bietet die enorme Sensitivität der modernen MS Instrumente einige Fallstricke, welche überwunden werden müssen, um neuartige Strukturen in Nukleinsäuren aufzuklären. Jora et al. zeigten, dass nur in geringer Menge vorkommende Artefakte, die bei der enzymatischen RNA Hydrolyse entstehen, als neuartige RNA Modifikationen fehlinterpretiert werden können.<sup>[14]</sup> Das ursprüngliche RNA Hydrolyseprotokoll von Crain und ihren Kollegen,<sup>[15]</sup> nutzte eine zweistufige Hydrolyse, zuerst ein Verdau mit Nuklease P1 (NP1) und Phosphodiesterase 1 (PDE1) bei pH 5, gefolgt von einer Dephosphorylierung bei pH 8 mit alkalischer Phosphatase. Eine heute viel genutzte Alternative ist die Eintopfreaktion mit Benzoylase, PDE1 und Phosphatase bei pH 8.<sup>[16]</sup> Allerdings kann die labile, zyklische RNA Modifikation N(6)-Threonylcarbamoyladenysin (ct<sup>6</sup>A) bei pH 8 epimerisieren und zu einigen Artefakten führen.<sup>[17]</sup> Des Weiteren sind nicht alle der beim RNA Verdau verwendeten Enzyme dafür geeignet modifizierte Nukleotide zu hydrolysieren. Zum Beispiel sind Nuklease S1 oder P1 nicht in der Lage m<sup>7</sup>G der mRNA 5'-m<sup>7</sup>GpppN Kappe zu schneiden, was wiederum ausgenutzt wird, um die 5'-mRNA Kappe zu untersuchen.<sup>[18]</sup> Andere Nukleasen, wie die PDE1, können sowohl die Kappenstruktur als auch die RNA-Phosphodiesterbindung spalten, um m<sup>7</sup>G der Analyse zugänglich zu machen. Dies wurde von He und Mitarbeitern genutzt, um m<sup>7</sup>G der 5'-Kappen von internen m<sup>7</sup>G in mRNA zu unterscheiden.<sup>[19]</sup>

In Anbetracht der großen Anzahl an RNA Modifikationen und ihrer zunehmenden Bedeutung,<sup>[1]</sup> wächst der Druck auf Forschende, isobare und strukturell ähnliche Modifikationen zu unterscheiden, sowie neue Strukturen präzise aufzuklären. In dieser Arbeit präsentieren wir einen Leitfaden für die Entdeckung und strukturelle Validierung neuer Modifikationskandidaten in Nukleinsäuren. Wir haben diesen Ansatz auf die kürzlich beschriebene RNA-Phosphorothioat-Modifikation angewandt<sup>[2]</sup> und belegen hier, dass es sich bei der Modifikation um die Nuklease-resistenten Diribonukleotid-Spezies der 2'-O-methylierten Ribose handelt. Unser systematischer Vergleich von RNA-Hydrolyseprotokollen unterstreicht die zentrale Bedeutung des Hydrolyseschritts und der strukturellen Validierung durch hochauflösende MS und anderen Methoden, sowohl bei Experimenten zur Entdeckung von neuartigen RNA-Modifikationen als auch bei der absoluten Quantifizierung von modifizierten Nukleosiden.

## Ergebnisse und Diskussion

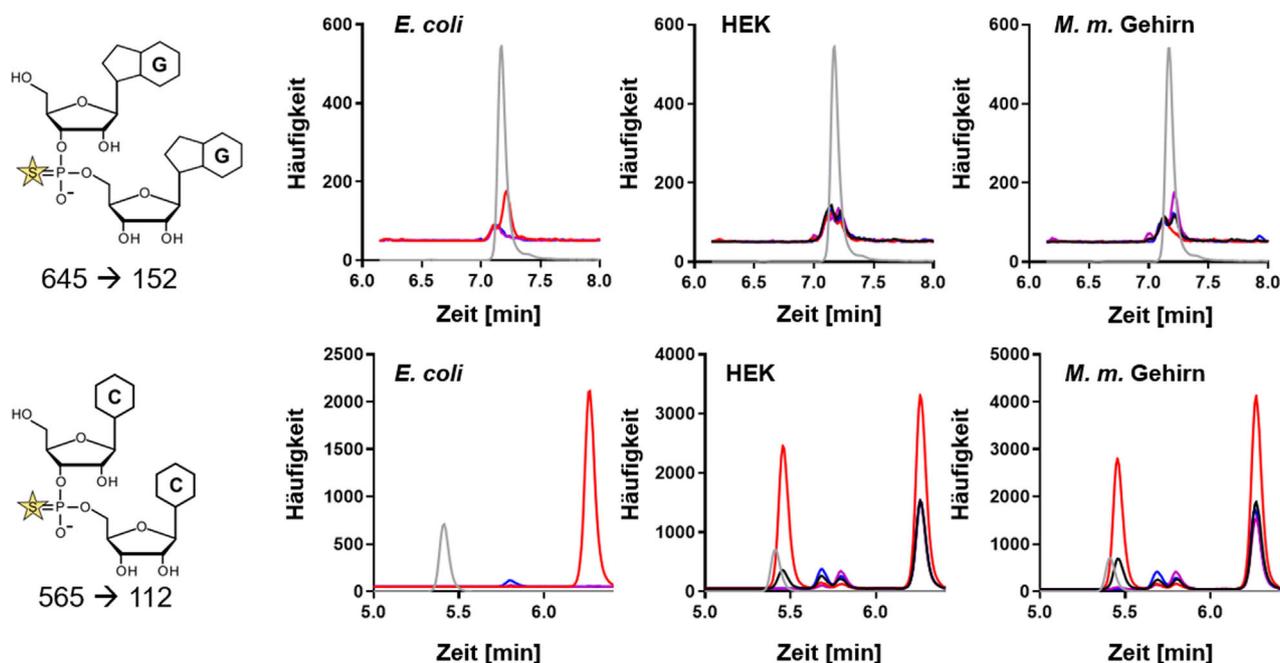
Die massenspektrometrische Analyse von DNA-Phosphorothiolierungen beruht auf der Hydrolysebeständigkeit des PTs gegenüber mehreren Nukleasen, einschließlich Nuklease P1 (NP1). Der Nukleaseverdau setzt PT-verknüpfte Dinukleotide aus der DNA frei und wird genutzt, um den

Dinukleotidkontext durch LC-MS zu quantifizieren und zu charakterisieren.<sup>[3,4]</sup> Wir beobachten die gleiche Stabilität gegenüber NP1 für synthetische PT-haltige RNA (Abbildung S1) und somit ist eine LC-MS-Analyse von PT durch NP1-Hydrolyse mit anschließendem Nachweis des PT-verknüpften Diribonukleotids möglich.<sup>[2]</sup> Unter der Annahme, dass PTs innerhalb aller möglichen Kombination von kanonischen Nukleosiden auftreten können, müssen bei der Methodenentwicklung 16 mögliche PT-Diribonukleotidstrukturen berücksichtigt werden. Zusätzlich führt die Thiolierung des Phosphatrückgrats zu einem Stereozentrum und es sind somit Rp- und Sp-Isomere jedes Dinukleotids mit einzubeziehen. Mit dem Ziel, eine schnelle und zuverlässige Methode zur absoluten Quantifizierung nativer PTs in RNA zu entwickeln, wurden alle 32 möglichen Rp- und Sp PT-Dinukleotide wie berichtet hergestellt<sup>[2]</sup> und ihre HPLC-Retentionszeiten und MS-Charakteristiken mittels LC-MS/MS bestimmt (Abbildung S2). Anschließend analysierten wir die totale RNA aus *E. coli* K12- und B7A-Stämmen, menschlichen Zelllinien (HEK 293) und Mausgehirngewebe auf das Vorhandensein von PT-haltigen Diribonukleotiden. Die totale RNA wurde zunächst durch Größenausschlusschromatographie nach etablierten Protokollen fraktioniert,<sup>[20]</sup> um die tRNA, die 16S/18S kleine ribosomale RNA und die 23S/28S große ribosomale RNA zu erhalten. Jede der Fraktionen wurde dann mit NP1 hydrolysiert und mit der entwickelten LC-MS-Methode analysiert.

Wir beobachteten die Signale von GpsG und CpsC, die den synthetischen PT Molekül- und Fragmentionen ähnelten, in allen Hydrolysaten mit variabler Häufigkeit, abhängig von der Identität der jeweiligen RNA-Fraktion (Abbildung 1). Während sich das Signal für natives GpsG und das synthetische Rp-GpsG überlappten, bemerkten wir bei den verschiedenen RNA Spezies mehrere Signale für CpsC, von denen nur eines mit dem synthetischen Rp-CpsC Standard übereinstimmte.

Die Ergebnisse von CpsC verlangten nach einer detaillierteren Analyse der nativen PT Dinukleotid-Signale durch orthogonale UHPLC-MS/MS-Analyse mittels hochauflösender Massenspektrometrie (HRMS) und metabolischer Isotopenmarkierung. Die UHPLC-HRMS-Analyse mit geeignetem Lösungsmittelgradienten, der aus *E. coli* B7A und *S. cerevisiae* isolierten RNA, ergab eine Diskrepanz in den Retentionszeiten der Dinukleotide im Vergleich zu den synthetischen Standards für CpsC- und GpsG PT-Dinukleotide (Abbildung 2). Das mutmaßliche CpsC-Dinukleotid eluierte 30 s später als der synthetische Rp PT-Standard, während das mutmaßliche GpsG-Dinukleotid 60 s später eluierte als der GpsG PT-Standard. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass es sich bei den aus *E. coli* und *S. cerevisiae* isolierten Dinukleotiden um keine PT-haltigen Dinukleotide handelt.

Um die Identität der betrachteten Dinukleotide zu ermitteln, wurde totale RNA, sowohl aus *E. coli* B7A als auch aus *S. cerevisiae*, extrahiert und zu einer Mischung aus Ribonukleotiden und Diribonukleotiden verdaut, die die PTs enthalten sollten. Die mutmaßlichen PT-haltigen Diribonukleotide wurden mittels präparativer HPLC für die HRMS-Analyse isoliert. Hochauflösende Massenspektren wurden durch Orbitrap-Massenspektrometrie sowohl für die synthe-



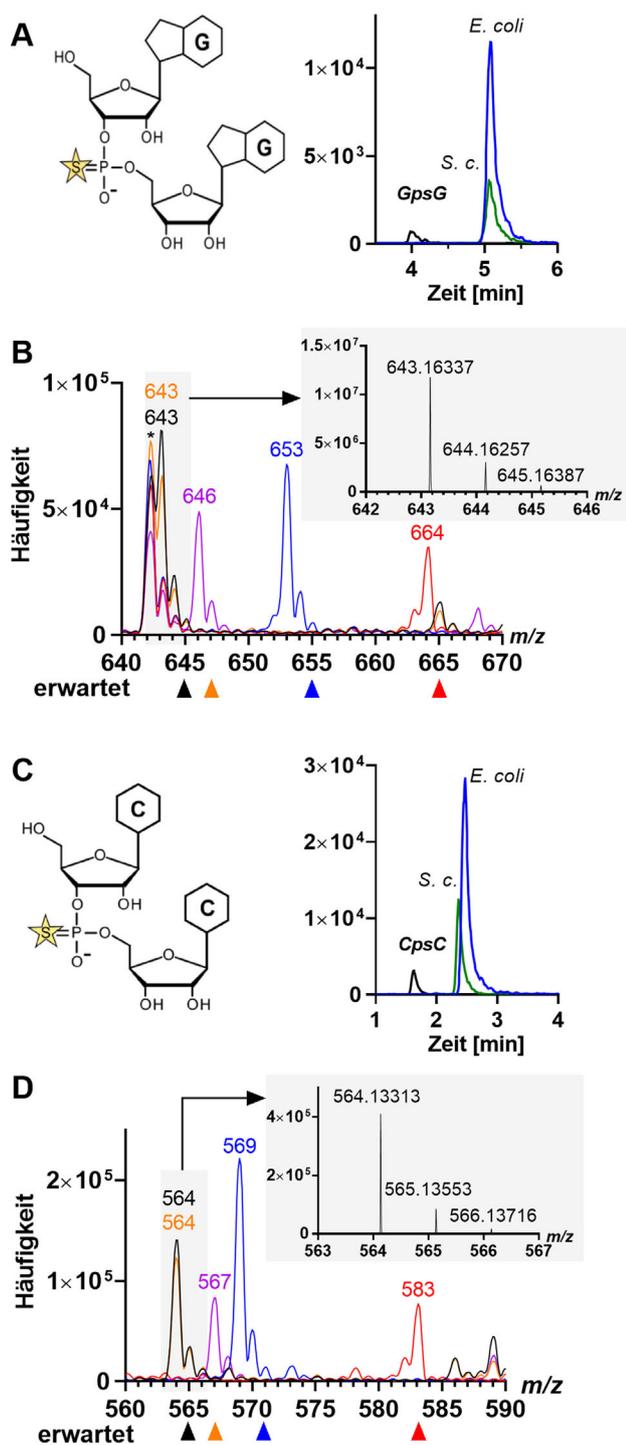
**Abbildung 1.** Signale für RNA-Phosphorothioate unter Verwendung von Molekülion-zu-Fragmention-Detektion bei der gezielten MS/MS-Analyse von RNAs aus *E. coli* K12, HEK-Zellen und Maus-Gehirngewebe. Obere Reihe: GpsG-Analyse; untere Reihe: CpsC-Analyse. Die Struktur auf der linken Seite zeigt den MS/MS-Übergang, der verwendet wurde, um das PT-enhaltende Diribonukleotid nachzuweisen. LC-MS-Chromatogramme: grau, synthetische Standards für Rp-Isomere von GpsG und CpsC; schwarz, totale-RNA; rot, tRNA; lila, kleine rRNA Untereinheit (16S oder 18S); blau, große rRNA Untereinheit (23S oder 28S).

tischen PT-Diribonukleotid-Standards, als auch für die aus biologischen Proben isolierten Diribonukleotide erhalten. Hierbei entdeckten wir eine Diskrepanz von 2 Da (Abbildung 2). Unerwarteterweise ist die exakte Masse, die für das native GpsG-Signal gefunden wurde, im Vergleich zu der exakten Masse, die für synthetisches GpsG beobachtet wurde, um 1.96017 Da leichter (Abbildungen 2B und S3A). Darüber hinaus zeigte synthetisches GpsG das natürliche  $^{34}\text{S}$ -Signal (4% bei  $M+2$ ), während das native GpsG dies nicht tat.

Die metabolische stabile Isotopenmarkierung aller Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Schwefelatome wurde in *E. coli* K12 unter Verwendung des M9 Minimalmediums durchgeführt, welches nur eine einzige Quelle für  $^{34}\text{S}$ ,  $^{13}\text{C}$  bzw.  $^{15}\text{N}$  enthielt. Anschließend wurde die RNA, wie bereits beschrieben, aufgereinigt und analysiert.<sup>[4,13b,21]</sup> Menschliche Zellen wurden, wie kürzlich beschrieben,<sup>[22]</sup> durch die Zufuhr von stabil Isotopen-markiertem  $^{15}\text{N}_5$ -Adenin und/oder  $^{15}\text{N}_2^{13}\text{C}_5$ -Uridin isotopenmarkiert. Die MS-Analyse von  $^{34}\text{S}$ -markierter *E. coli*-RNA zeigte eine Abwesenheit von Schwefel im nativen Analyten, was ein starker Hinweis gegen eine PT-Diribonukleotidstruktur ist. Nachdem die Zellen in Anwesenheit von L-Methionin- $[\text{}^2\text{H}_3]$ -methyl wachsen gelassen wurden, zeigte außerdem ein Signal bei  $m/z$  646 das Vorhandensein einer Methylgruppe im Diribonukleotid an (Abbildung 2B).<sup>[13b]</sup> Eine vollständige  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Markierung in *E. coli*<sup>[13b]</sup> liefert ebenfalls keinen Beleg für die mutmaßliche GpsG-Struktur. Ähnliche Ergebnisse wurden für stabile Isotopen-markierte HEK-Zellen erhalten (Abbildung S3A), wo wir eine Methylierungsmarkierung nach Fütterung von L-Methionin- $[\text{}^2\text{H}_3]$ -methyl ( $m/z$  646) beobachteten. Der Massenanstieg von  $m/z$  643 auf 651 (+ 8 Da) weist auf das Vorhandensein von zwei

$^{15}\text{N}_4$ -markierten Guaninbasen hin, was die Art des Moleküls als kanonisches, phosphatgebundenes GG-Dinukleotid in HEK-Zellen bestätigt. Das Vorhandensein von zwei Guaninbasen wird zusätzlich durch die Analyse der aus *E. coli* extrahierten  $^{15}\text{N}$ -RNA unterstützt, die 10 Da schwerer ist, als das Ausgangsmaterial, da hier die exozyklische Aminogruppe zusätzlich mit  $^{15}\text{N}$  markiert ist. Wir schließen aus diesen Daten, dass es keine Anhaltspunkte für GpsG in *E. coli*, *S. cerevisiae*, menschlichen Zellen oder Gehirngewebe von Mäusen gibt. In Abbildung 2C konzentrierten wir uns auf die multiplen Signale für CpsC, die durch gezielte LC-MS-Analyse nativer RNA erhalten wurden. HRMS von synthetischem CpsC und nativem mutmaßlichem CpsC zeigten eine Massendiskrepanz von 0.97811 Da (Abbildungen 2D und S3B). Auch hier lieferte die stabile Isotopenmarkierung Hinweise auf eine Methylgruppe anstelle eines Schwefels im Analyten. Darüber hinaus weist die Massendifferenz zwischen unmarkierten und  $^{15}\text{N}$ -markierten Signalen auf das Vorhandensein von nur fünf Stickstoffatomen hin, während CpsC sechs hat.

Wir analysierten den entsprechenden Peak aus isotopenmarkierter HEK-RNA und bestätigten das Vorhandensein einer Methylgruppe und zweier Pyrimidin-Ribonukleoside (aufgrund der Massenzunahme von + 14, Abbildung S3B). In der Mensch- und Maus-RNA wurden jeweils fünf Signale in der CpsC-MS-Analyse mit dem chromatographischen Verfahren aus Abbildung 1 (Abbildung S3) gefunden. Das erste Signal co-eluiert mit synthetischem Rp-CpsC, aber die HRMS-Analyse dieses Signals ergab ein  $m/z$  von 564 und damit die gleiche Massendiskrepanz von  $\approx 1$  u, wie bei *E. coli* und bei Peak 4 der HEK-Zellen in Abbildung S3. In ähnlicher Weise verschwindet das Signal in Gegenwart von L-Methio-



**Abbildung 2.** Vergleich von synthetischen GpsG- und CpsC-, sowie nativen Diribonukleotid Signalen. UHPLC-MS/MS von synthetischem (schwarz) GpsG (A) und CpsC (C) und nativen RNA Hydrolysaten von *E. coli* B7A (blau) und *S. cerevisiae* (grün). Massenspektren stabil Isotopen-markierter RNA aus *E. coli* K12 der PT-Diribonukleotid-Kandidaten GpsG (B) und CpsC (D). Farbcode zu den Isotopenmarkierungen: schwarz – unmarkiert; orange— $^{34}\text{S}$ ; blau— $^{15}\text{N}$ ; rot— $^{13}\text{C}$ ; und lila—L-Methionin- $^{2}\text{H}_3$ -methyl. \*Koeluiierende Verunreinigung. Grauer Einschub: Hochauflösende Massenspektren (HRMS).

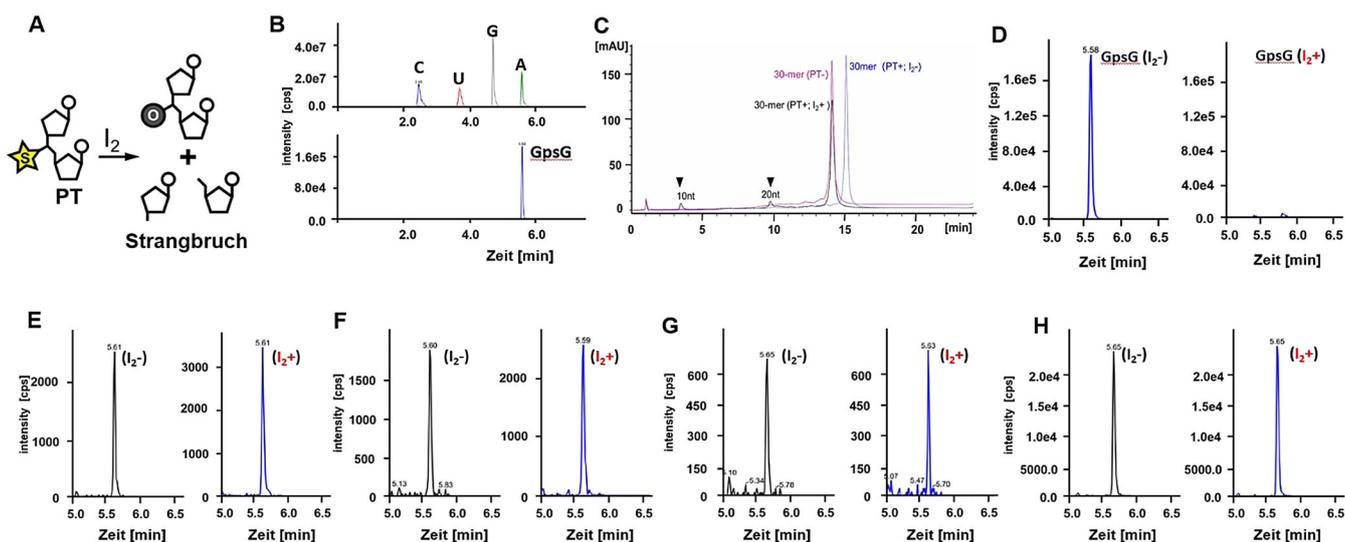
min- $^{2}\text{H}_3$ -methyl und es erscheint bei  $m/z$  567 ein um 3 Da schwereres Signal, was auf das Vorhandensein einer Methyl-

gruppe hindeutet. Die MS-Spektren aller anderen Peaks aus der CpsC-Analyse zeigten nicht das erwartete  $m/z$  von 565 für unmarkierte RNA, aber stattdessen das Signal für eine schwere Methylgruppe (Abbildung S3C).

Die mit mehreren massenspektrometrischen Ansätzen erzielten Ergebnisse zeigen deutlich, dass es keine PT-haltigen Diribonukleotide in der RNA der vier betrachteten Modellorganismen gibt, wobei es sich mit höchster Wahrscheinlichkeit bei den modifizierten Spezies um 2'-O-methylierte Dinukleotide handelt. Um ganz stringent die Anwesenheit von PTs in RNA zu überprüfen, haben wir die Sensitivität von PTs gegenüber der Oxidation durch Iod ausgenutzt. (Abbildung 3A). Dies wurde bereits für die PT-spezifische Spaltung und anschließende Kartierung von PT-Stellen in mikrobieller DNA bei der Next-Generation-Sequenzierung verwendet.<sup>[6a]</sup> Um eine iodinduzierte Spaltung von RNA-PTs nachzuweisen, synthetisierten wir ein 30-mer RNA-Oligoribonukleotid mit einem genau definierten GpsG PT und verifizierten zunächst das Vorhandensein des GpsG durch NP1-Verdau und UPLC-MS/MS-Analyse (Abbildung 3B). Anschließend wurde die RNA mit Iod behandelt und das Reaktionsgemisch mittels HPLC analysiert. Wie in Abbildung 3C gezeigt, führte die Iodbehandlung zur Bildung von zwei kürzeren Fragmenten von 10 nt und 20 nt Länge, was mit einer Spaltung durch Iod an der GpsG-Stelle übereinstimmt.

Wie bereits für DNA gezeigt,<sup>[3]</sup> finden wir auch in RNA eine  $\approx 80\%$  Umwandlung der RNA in ein schneller eluierendes 30-mer, welches mit einem synthetischem 30-mer ohne PT koeluiert und 20% Strangbrüche (Abbildung 3C). Dies steht im Einklang mit der iodinduzierten Desulfurisierung von PT zu Phosphat.<sup>[3]</sup> Um den Verlust von GpsG in der iodoxidierten RNA festzustellen, analysierten wir die Proben nach Hydrolyse mittels UPLC-MS/MS, was den Verlust von GpsG PT-haltigem Diribonukleotid bestätigte (Abbildung 3D). Dieses Vorgehen wurde dann auf die totale RNA aus *E. coli* B7A angewendet, welches Dnd-Gene für das Einbringen von PT-Modifikationen in DNA besitzt, sowie auf eine *E. coli* B7A-Mutante ohne Dnd-Gene ( $\Delta\text{dnd BCDE}$ ), *S. cerevisiae* BY4741 und humane A549-Zellen. Nach der Iodoxidation wurde die hydrolysierte totale RNA mittels UPLC-MS/MS analysiert. Wie in den Abbildungen 3E–H zu sehen ist, war das erwartete MS-Signal des mutmaßlichen GpsG-Diribonukleotids gegenüber der Iodbehandlung chemisch beständig (Abbildung 3E–H). Des Weiteren beobachteten wir auch keine iodinduzierte RNA-Spaltung, wenn die totale RNA mit einem Bioanalyzer untersucht wurde, was wiederum auf das Nichtvorhandensein von PTs in RNA hindeutet (Abbildung S4). Zusammenfassend zeigen unsere orthogonalen Ansätze keine Anhaltspunkte für das Vorhandensein von PTs in der RNA aus *E. coli*, *S. cerevisiae*, Mäusen oder Menschen.

Die Ergebnisse unserer Studie lassen daran zweifeln, dass es natürlich-vorkommende PT verbundene Dinukleotide gibt. Aber wie kam es zu dieser Annahme? Diese Frage führte zu einem Prozess des Vorhersagens und des Nachweises der wahren Struktur. Hier beziehen wir uns auf den in Schema 1 dargestellten Arbeitsablauf, der mit einer Vorhersage der Struktur beginnt. Dies kann sofort zu einer meta-



**Abbildung 3.** Nachweis der RNA-Phosphorothiolierung durch Iodspaltung. (A) Schema der iodinduzierten Oxidation einer mutmaßlichen RNA-PT-Modifikation. (B) UPLC-MS/MS-Identifizierung des GpsG-Diribonucleotids in einer synthetischen RNA (30mer). (C) HPLC-Analyse der mit Iod behandelten 30-mer RNA zeigt  $\approx 20\%$  Spaltung in 10 nt und 20 nt Fragmente und  $\approx 80\%$  Desulfurisierung zu Phosphat an der GpsG-Stelle. Blau: 30-mer GpsG RNA; rot: 30-mer RNA ohne PT; schwarz: mit Iod behandeltes 30-mer PT enthaltende RNA. (D–H) UPLC-MS/MS-Analyse der mit Iod behandelten 30-mer RNA zeigt einen nahezu vollständigen Verlust des GpsG-Diribonucleotids (D), während das co-eluierende mutmaßliche „GpsG“ in der totalen RNA aus *E. coli* B7A (E), *E. coli* B7A ( $\Delta dnd$  BCDE) DNA-PT-defiziente Mutante (F), *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (G) und menschlichen A549-Zellen (H) gegenüber Iod stabil ist.



**Schema 1.** Ansatz zur Validierung der Strukturen von DNA- und RNA-Modifikationen.

bolischen Isotopenmarkierungsstudie oder, wenn ein Biosyntheseweg vorausgesagt werden kann, zu einer Knockout- oder Knockdown-Studie führen, um den Modifikationsgrad festzustellen.<sup>[13,23]</sup> In jedem Fall muss die Struktur als Standard synthetisiert und ihr Verhalten bei der LC-MS-Analyse mit dem der nativen Verbindung verglichen werden. Auch NMR-Studien sind wertvoll, falls genügend biologischer Analyt isoliert werden kann. Die LC-Retentionszeit stellt ein erstes Maß der Identifizierung dar und idealerweise wird mehr als nur ein stationäres/mobiles Phasenpaar verwendet, um die Co-Elution der synthetischen und nativen Verbindung zu bestätigen. Als zweite Maßgröße ist ein vollständiges Massenspektrum der Verbindung auf einem hochauflösenden Massenspektrometer erforderlich, um das exakte Molekulargewicht, MS/MS-Fragmentierungsmuster und Isotopenmuster zu bestimmen. Die chemische Struktur wird bestätigt, wenn sich die native und synthetische Version identisch verhalten.

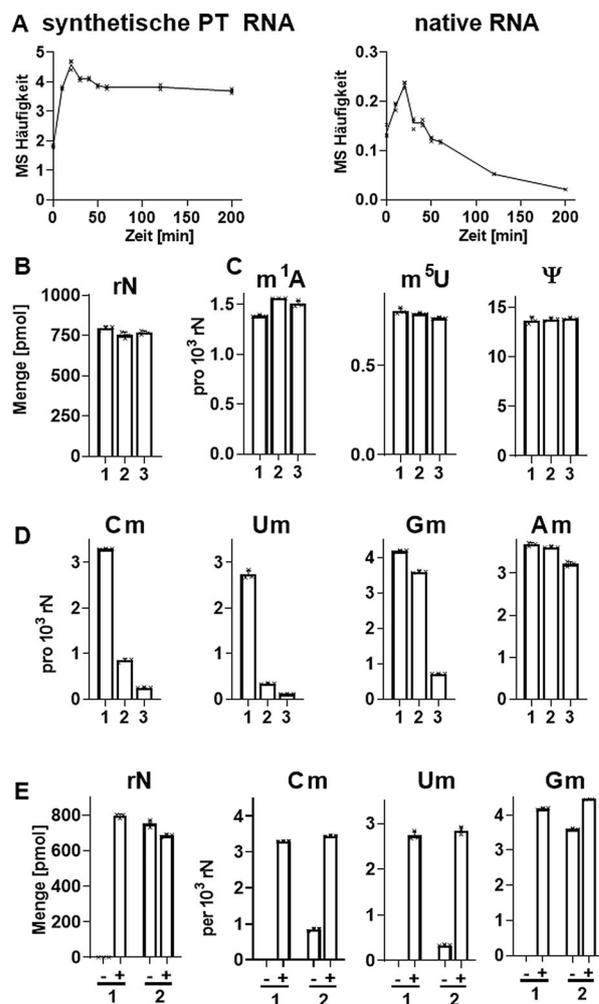
Man muss jedoch auch die Möglichkeit in Betracht ziehen, dass das beobachtete Molekül ein Artefakt ist, das durch zufällige enzymatische oder chemische Reaktionen, während der Zelllyse, RNA Aufreinigung, RNA Weiterverarbeitung oder sogar durch Ionisierung im Massenspektrometer, verursacht wird. Solche Artefakte werden am besten durch die Analyse stabil Isotopen-markierter Nucleinsäuren ausgeschlossen. So werden zum Beispiel Aminierungen, die während einiger RNA-Hydrolyseprotokolle auftreten, in  $^{15}\text{N}$ -markierter RNA durch das Fehlen eines  $^{15}\text{N}$  identifiziert.<sup>[14]</sup> Darüber hinaus sind stabil Isotopen-markierte Nucleinsäuren ideal für die Co-Injektion mit dem synthetischen Standard geeignet. Nur Verbindungen, die diesen letzten Schritt der Strukturvalidierung bestehen, sollten in biologischen Tests

weiter untersucht werden, einschließlich Experimenten zur Biosynthese, Lokalisation, Verteilung oder zur Menge der Verbindung.

Diese Strategie wurde hier für eine strukturelle Vorhersage benutzt, die zunächst berücksichtigt, dass die MS-Analyse ein Signal bei  $m/z$  643 detektierte, also 2 Da weniger als das vorhergesagte GpsG, welches ein Signal bei  $m/z$  645 hätte haben sollen. Wenn man bedenkt, dass die vorhergesagte Struktur 21 C-Atome hat, würde die natürliche Häufigkeit von  $^{13}\text{C}$  (1.1%) ein M + 1-Signal ( $m/z$  644) erzeugen, welches 23% der Intensität des Moleküls (M) entspricht und ein M + 2-Signal ( $m/z$  645), das 2% von M entspricht. Die hohe Empfindlichkeit von Triple-Quadrupol Instrumenten kann zu einer falschen Identifizierung von M + 1- oder M + 2-Signalen als M führen. Die naheliegendsten Dinukleotidstruktur-Kandidaten, die diesen 2 Da-Unterschied erklären könnten, sind 2'-O-methylierte Dinukleotide, da auch 2'-O-methylierte Ribonukleoside in den meisten Formen von RNA häufig vorkommen. Wir haben diese Vorhersage in einer Reihe von Studien, der Checkliste in Schema 1 folgend, getestet.

Wir überprüften zunächst die 2'-O-Methylidinukleotid-Hypothese als Probenvorbereitungsartefakt: Können 2'-O-Methylidinukleotide aus der unvollständigen Hydrolyse von RNA entstehen? Tatsächlich verringert eine umfassende Hydrolyse der nativen RNA mit NP1 für länger als 30 Minuten das native PT-Dinukleotidsignal. Im Gegensatz dazu sind Dinukleotid-Signale von synthetischer PT-RNA selbst nach 3 Stunden NP1-Hydrolyse stabil (Abbildung 4A). Dies brachte uns dazu, gängige enzymatische RNA-Hydrolyseprotokolle auf die Vollständigkeit der Reaktionen zu vergleichen. Wir verwendeten dafür native RNA aus HEK-Zellen, die entweder mit (1) Benzonase + Phosphodiesterase I (PDE1) + Alkalischer Phosphatase (CIP) (Protokoll 1),<sup>[16]</sup> (2) NP1 + CIP<sup>[15]</sup> (Protokoll 2; wie in Abbildungen 1 und 3) oder (3) einem kommerziellen RNA-Hydrolyse-Kit (NEB, Nucleoside Digestion Mix) verdaut wurden, gefolgt von der Quantifizierung der freigesetzten Nucleoside durch Isotopenverdünnungs LC-MS/MS.

Wie in Abbildung 4B gezeigt, setzen alle drei Ansätze eine ähnliche Menge an kanonischen Nucleosiden frei. In ähnlicher Weise werden einige Modifikationen wie 1-Methyladenosin ( $m^1\text{A}$ ), 5-Methyluridin ( $m^5\text{U}$ ) und Pseudouridin ( $\Psi$ ) in vergleichbarer Häufigkeit freigesetzt (Abbildung 4C). Andere Modifikationen, insbesondere die 2'-O-methylierten Ribonukleoside Cm, Um und Gm, wurden jedoch nur in niedrigeren Konzentrationen unter Verwendung von Protokoll 2 oder dem Kit (Abbildung 4D) detektiert, wobei letzteres auch nicht in der Lage war andere modifizierte Nucleoside, wie 5-Methylcytidin ( $m^5\text{C}$ ), freizusetzen (Abbildung S5). Um zu verstehen, warum Protokoll 1 dem Protokoll 2 überlegen war, wiederholten wir das Experiment mit Benzonase + CIP und NP1 + CIP in Gegenwart und Abwesenheit von PDE1. Wie in der ersten Grafik von Abbildung 4E zu sehen ist, hydrolysiert Benzonase alleine die RNA nicht vollständig zu den Monoribonucleotiden, wie es für die anschließende Dephosphorylierung durch CIP benötigt wird. Im Gegensatz dazu erzeugt NP1 eine umfangreichere RNA-Hydrolyse, selbst in Abwesenheit von PDE1, aber die voll-

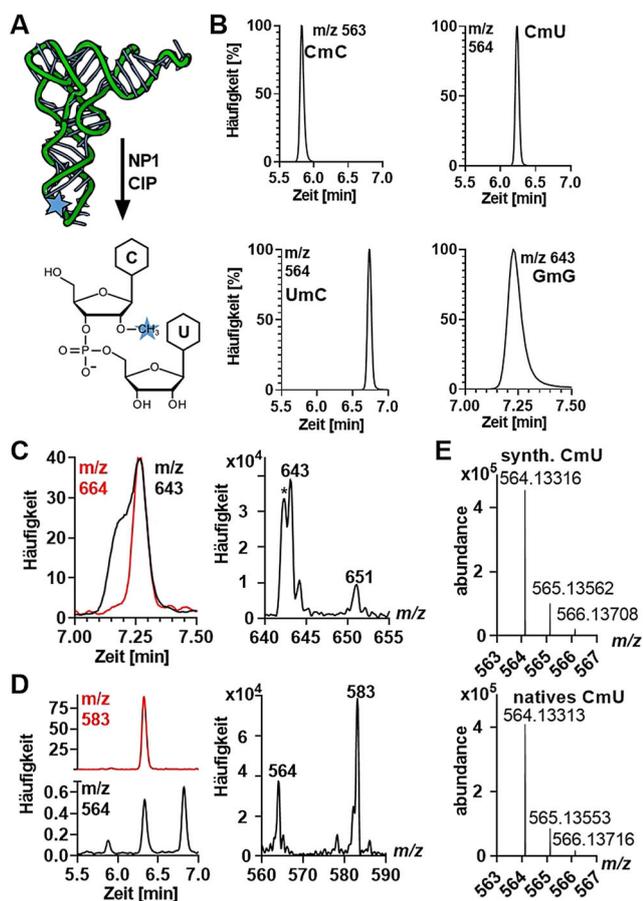


**Abbildung 4.** Einfluss der RNA-Hydrolysebedingungen auf die Detektion von RNA-Modifikationen. (A) Häufigkeit des Peaks für den GpsG-Massenübergang der synthetischen GpsG-enthaltenden RNA und der nativen RNA aus HEK-Zellen, verdaut mit Nuklease P1 (NP1) und Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) bei 37°C und verschiedene Inkubationszeiten. (B–D) Häufigkeit der kanonischen Nucleoside (rN) und verschiedener modifizierter Nucleoside aus HEK totaler RNA, verdaut mit: 1, Benzonase/PDE1/CIP,<sup>[16]</sup> 2, NP1/CIP,<sup>[15]</sup> oder 3 ein kommerzielles RNA Hydrolyse Kit (NEB, Nucleosid Digestion Mix). (E) Häufigkeit von ribosomethylierten Nucleosiden aus HEK totaler RNA, verdaut in Abwesenheit (–) und Anwesenheit (+) von Phosphodiesterase 1 (PDE1) unter Verwendung von entweder: 1, Benzonase + CIP<sup>[16]</sup> oder 2, NP1 + CIP.<sup>[15]</sup> Alle Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SD für 3 experimentelle Replikate.

ständige Freisetzung von Cm, Um und Gm ist nur mit dem Zusatz von PDE1 möglich.

Diese Ergebnisse zeigen, dass 2'-O-Methylribonucleoside nur schwierig während der Hydrolyse aus RNA freizusetzen sind, was die Frage aufwirft, ob es sich bei den scheinbaren PT-Signalen um 2'-O-methylierte Dinukleotide handelt, die durch unvollständige RNA-Hydrolyse entstehen. Um die vorhergesagte Struktur zu bestätigen, synthetisierten wir die 2'-O-methylierten Dinukleotide CmC, CmU, UmC und GmG (Beispiel in Abbildung 5A), mit denen wir den Workflow nach Schema 1 starteten, indem wir zuerst die HPLC-Retentionszeit synthetischer und nativer PT-Nachahmer bestä-



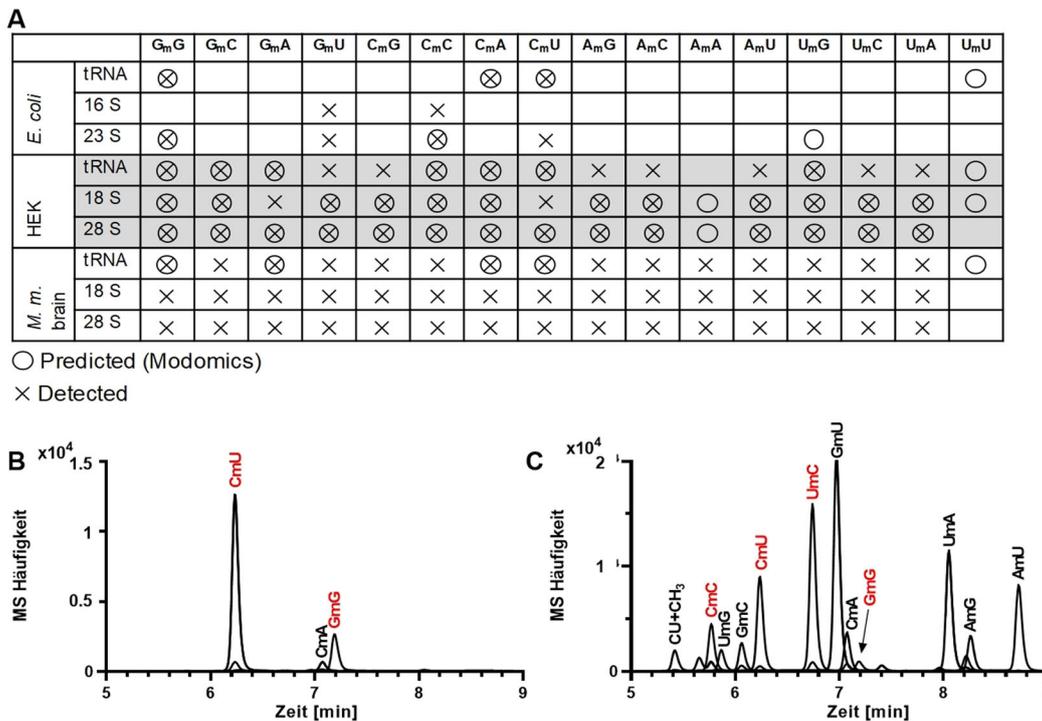


**Abbildung 5.** Verifizierung von Dinucleotidstrukturen, die in nativer RNA aus *E. coli*- und HEK-Zellen gefunden wurden. (A) Vorhersage der Dinucleotidstruktur durch unvollständige RNA-Hydrolyse. (B) Retentionszeit und  $m/z$  von synthetischen 2'-O-methylierten Dinucleotiden. (C) LC-MS/MS Co-Elution von co-injiziertem synthetischem GmG (schwarz;  $m/z$  643) und hydrolysiertes  $^{13}\text{C}$ -markierter RNA aus *E. coli* (rot;  $m/z$  664). Das aus dem angegebenen Bereich entnommene MS-Spektrum zeigt die Signale der erwarteten Isotopomere. (D) Co-Injektion von synthetischem (schwarz) CmU, CmC und UmC, sowie hydrolysiertes  $^{13}\text{C}$ -markierter *E. coli* RNA (rot) zeigt die Co-Elution einer Verbindung. (E) Hochauflösendes Massenspektrum von synthetischem und nativem CmC.

tigten (Abbildung 5B). Die synthetischen CmC, CmU, UmC und GmG Dinucleotide wurden zusammen mit vollständig hydrolysiertes (NP1 + PDE1 + CIP),  $^{13}\text{C}$ -markierter *E. coli* RNA für die LC-MS/MS Analyse co-injiziert, was eine Co-Elution des GmG ( $m/z$  643) mit einem Molekül mit  $m/z$  664 (Abbildung 5C) erkennen ließ, und eine Co-Elution von CmU ( $m/z$  564) mit einem Molekül mit  $m/z$  583 (Abbildung 5D, S6). Die Massenunterschiede zwischen nativen und isotope markierten Molekülen entsprechen der Anzahl der Kohlenstoffe in vollständig mit  $^{13}\text{C}$  markierten CmC, CmU, UmC und GmG Dinucleotiden. Hochauflösende Fragmentierungsspektren synthetischer und mutmaßlich nativer CmU in Abbildung 5E zeigen ein Molekülion ( $m/z$  564.133) und Fragmente, die sich um weniger als 1 ppm unterscheiden (Tabelle S1). Ähnliche Ergebnisse wurden durch Co-Injektion mit stabilen Isotopen-markierter RNA aus HEK-Zellen erzielt (Abbildung S6).

Um die Identität der 2'-O-methylierten Dinucleotide weiter zu bestätigen, verglichen wir die MS/MS-Signalintensitäten, die mit den Massenübergängen, die PT und 2'-O-methylierten Dinucleotiden entsprechen, assoziiert sind. Die aus *E. coli*-, *S. cerevisiae*- und HeLa-Zellen isolierten CmU- und GmG-Dinucleotide zeigten eine  $\approx 25$ -fache Häufigkeitszunahme, wenn sie mit den Massenübergängen für die 2'-O-methylierten Dinucleotide, anstelle derer der PTs, nachgewiesen wurden (Abbildung S7). Diese Beobachtung legt nahe, dass die mit den PT-Übergängen detektierten Signale wahrscheinlich mit geringer Häufigkeit vorkommende Isotopomere der Dinucleotide darstellen, mit einer Masse, die mit der des jeweiligen PT-Dinucleotids übereinstimmt. Diese Ergebnisse beweisen, dass 2'-O-methylierte Dinucleotide für die von Wu et al. beschriebenen Signale verantwortlich sind.<sup>[2]</sup>

Die 2'-O-Methylierung ist eine häufig vorkommende Modifikation, sowohl in ribosomaler RNA (rRNA) als auch in tRNA.<sup>[1]</sup> Angesichts ihrer Hydrolyseresistenz und unseres Fokus auf 4 der 16 möglichen Dinucleotide, haben wir uns gefragt, wie sich die Häufigkeit der 2'-O-methylierten Dinucleotide in verschiedenen Organismen und verschiedenen Arten von RNA verändert. Die Literatur lieferte Hinweise zu bekannten Dinucleotiden in tRNA und den großen und kleinen rRNAs, wie durch Kreise in Abbildung 6A dargestellt. Optimale Hydrolysebedingungen führten nur zum Nachweis von 3 der 16 möglichen Dinucleotidkontexte in tRNA aus *E. coli* (GmG, CmA und CmU; Abbildung 6A,B), dem 14 nachgewiesenen 2'-O-methylierten Dinucleotiden in tRNA aus HEK-Zellen gegenüberstehen, einschließlich 7 bisher nicht beschriebener Dinucleotid-Sequenzkontexte (Abbildung 6A,C). Für *E. coli* 16S und 23S rRNA haben wir die berichteten GmG- und CmC-Dinucleotide, sowie die bisher nicht beschriebenen GmU- und CmU-Kontexte nachgewiesen. Wir haben diese Studien auf RNAs aus Mäusegehirnen ausgeweitet, für die es nur wenige Informationen über 2'-O-methylierte Dinucleotide gibt. Wie in Abbildung 6A gezeigt, besitzen Maus tRNA, 18S und 28S rRNAs jeden möglichen Dinucleotid-Sequenzkontext, einschließlich den des AmA, welches in menschlicher tRNA nicht nachweisbar ist. Diese Ergebnisse deuten auf die Leistungsfähigkeit genau durchgeführter LC-MS Experimente hin um neue Modifikationen und deren Sequenzkontexte zu entdecken. Es gibt jedoch auch ernsthafte Einschränkungen, was die Interpretation der mit LC-MS gemachten Beobachtungen für deren biologische Bedeutung angeht. Während UmU beispielsweise in publizierten Studien beobachtet wurde,<sup>[1]</sup> konnten wir es in keiner RNA aus den von uns getesteten Organismen nachweisen (Abbildung 6A). War es uns wegen der begrenzten Empfindlichkeit unseres Messinstrumentes für seltene Dinucleotidmotive, sowie wegen des Potenzials für eine ineffiziente Freisetzung während der Hydrolyse, nicht möglich UmU und andere publizierte 2'-O-methylierte Dinucleotid Kontexte nachzuweisen? Wir vertrauen der präzisen Identifizierung und Quantifizierung jener Modifikationen, die wir detektieren können, aber die von uns nicht detektierbaren Modifikationen können nicht ausgeschlossen werden und wir müssen orthogonale Methoden wie RibomethSeq und andere Techniken verwenden, die die bio-



**Abbildung 6.** Screening nach 2'-O-methylierten Diribonucleotiden in verschiedenen Organismen und RNA-Typen. (A) 2'-O-methylierte Dinucleotide, die laut Literatur existieren sollten<sup>[1]</sup> und hier durch LC-MS/MS nachgewiesen wurden. Überlagerte LC-MS-Chromatogramme von 2'-O-methylierten Dinucleotiden in (A) *E. coli* tRNA und (B) HEK totaler RNA. 2'-O-methylierte Dinucleotide, die mit synthetischen Standards bestätigt wurden, sind mit roter Schrift gekennzeichnet. Kleine Signale unterhalb des CmU Peaks, stammen aus dem M + 1-Signal von CmC.

chemischen Eigenschaften von 2'-O-Methylierungsmodifikationen in RNA ausnutzen.<sup>[24]</sup>

## Fazit

Die Suche nach neuen posttranskriptionellen RNA-Modifikationen ist ein wichtiger Aspekt der modernen Epitranskriptomforschung und die Massenspektrometrie ist das Instrument erster Wahl für diese Herausforderung. Einem etablierten Weg zur Bestimmung und Validierung molekularer Strukturen folgend (Schema 1), entdeckten wir, dass die mutmaßlichen PT-haltigen Dinucleotide, die in der RNA von verschiedenen Organismen beobachtet wurden<sup>[2]</sup> in Wahrheit 2'-O-methylierte Dinucleotide waren. Dies ist nicht der erste Fall von Fehlidentifizierung von RNA-Modifikationen.<sup>[14,17]</sup> Die Hauptursachen, die wahrscheinlich zu der Fehlidentifizierung geführt haben, scheinen die unvollständige Hydrolyse von RNA und das Vertrauen in niedrig auflösende Massenspektrometrie zu sein. In Bezug auf die Hydrolyse fanden wir heraus, dass eine Kombination von PDE1 mit entweder Benzonase oder NP1 erforderlich ist, wobei auch eine längere Inkubation mit hohen Nukleasekonzentrationen eine akzeptable Hydrolyse der RNA zu den Mononucleotiden liefert. Angesichts der veröffentlichten Studien<sup>[18c,19]</sup> und unserer Beobachtungen kann es trotz dieser Vorsichtsmaßnahmen Modifikationen geben, die im teilweise resistent gegen die Hydrolyse und Freisetzung durch Nukleasen sind, nur in geringen Mengen freigesetzt werden oder die durch Massenspektrometrie nur schlecht detektiert werden können. Diese

Limitierungen erfordern Vorsicht bei der Interpretation massenspektrometrischer Studien des Epitranskriptoms, denn die Abwesenheit eines Signals bedeutet nicht gleich die Abwesenheit des Analyten.

In Bezug auf die Verwirrungen durch Isotopomere ist das M + 2-Signal der reichlich vorhandenen 2'-O-methylierten Dinucleotide relativ stark und könnte leicht mit dem Molekül M eines anderen Moleküls verwechselt werden. Wie in Abbildung 5E dargestellt ist, zeigt das HRMS von CmU eine Isotopenverteilung von M von 564, M + 1 von 565 und M + 2 von 566, wobei die ganzzahlige Differenz im *m/z*-Wert die erwartete Ionenladung von +1 bestätigt. Als wir 7-Deazaguaninderivate in DNA entdeckten, sahen wir uns das erste Mal mit dieser Herausforderung konfrontiert. Zunächst sagten wir die Struktur von 2'-Deoxy-5-carboxy-7-deazaguanosin mit einem *m/z* von 311 vorher, welches sich dann aber bei genaueren Untersuchungen als das M + 1 Isotopomer der wahren Struktur, 2'-Deoxy-7-amido-7-deazaguanosin entpuppte.<sup>[23]</sup> Der Fall von GmG verdeutlicht erneut, was unserer Meinung nach zur Fehlinterpretation von PT geführt hat. Das Isotopenmuster des häufigen GmG umfasst ein M von 643, M + 1 von 644, und M + 2 von 645, während das mögliche GpsG ein M von 645 hätte. Das warnende Fazit lautet, dass zur gründlichen Identifikation neuer Molekülstrukturen mittels Massenspektrometrie eine systematische Betrachtung aller benachbarter Signale mittels Vollspektrenanalyse oder sogar hochauflösender Massenspektrometrie notwendig ist, um das wahre Molekülion zu finden. Trotz unserer detaillierten Studie, wollen wir nicht ausschließen, dass es PT in RNA gewisser Organismen geben kann. Seit wir PT als na-

türliche Modifikation der DNA entdeckten,<sup>[3]</sup> hoffen wir, dass die Suche auch in RNA fortgesetzt wird.

### Danksagung

Diese Arbeit wurde unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) 255344185-SPP 1784, 325871075-SFB 1309, und KE1943/3-1 (SK), US NIH NIEHS Core Center Grant ES0002109 (CEHS Bioanalytical Core), einer Förderung von der National Research Foundation of Singapore mit Unterstützung der Antimicrobial Resistance Interdisciplinary Research Group (PD), und von der National Natural Science Foundation of China Förderung 32070629 (CB). Shane Byrne erhielt Unterstützung durch den NIEHS Training Grant in Environmental Toxicology T32-ES007020. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

### Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

**Stichwörter:** Verdauungsartefakte · Massenspektrometrie · Nukleosidanalyse · RNA-Modifikationen · RNA-PT

- [1] P. Boccaletto, M. A. Machnicka, E. Purta, P. Piatkowski, B. Baginski, T. K. Wirecki, V. de Crecy-Lagard, R. Ross, P. A. Limbach, A. Kotter, M. Helm, J. M. Bujnicki, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D303–D307.
- [2] Y. Wu, Y. Tang, X. Dong, Y. Y. Zheng, P. Haruehanroengra, S. Mao, Q. Lin, J. Sheng, *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 1301–1305.
- [3] L. Wang, S. Chen, T. Xu, K. Taghizadeh, J. S. Wishnok, X. Zhou, D. You, Z. Deng, P. C. Dedon, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 709–710.
- [4] S. Kellner, M. S. DeMott, C. P. Cheng, B. S. Russell, B. Cao, D. You, P. C. Dedon, *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 888–894.
- [5] X. Zhou, Z. Deng, J. L. Firmin, D. A. Hopwood, T. Kieser, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 4341–4352.
- [6] a) B. Cao, C. Chen, M. S. DeMott, Q. Cheng, T. A. Clark, X. Xiong, X. Zheng, V. Butty, S. S. Levine, G. Yuan, M. Boitano, K. Luong, Y. Song, X. Zhou, Z. Deng, S. W. Turner, J. Korfach, D. You, L. Wang, S. Chen, P. C. Dedon, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3951; b) B. Cao, X. Wu, J. Zhou, H. Wu, L. Liu, Q. Zhang, M. S. DeMott, C. Gu, L. Wang, D. You, P. C. Dedon, *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 6715–6725; c) S. Zhu, T. Zheng, L. Kong, J. Li, B. Cao, M. S. DeMott, Y. Sun, Y. Chen, Z. Deng, P. C. Dedon, D. You, *Biomolecules* **2020**, *10*, 1491.
- [7] T. Xu, F. Yao, X. Zhou, Z. Deng, D. You, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 7133–7141.
- [8] X. An, W. Xiong, Y. Yang, F. Li, X. Zhou, Z. Wang, Z. Deng, J. Liang, *PLoS One* **2012**, *7*, e51265.
- [9] K. Nilsson, H. K. Lundgren, T. G. Hagervall, G. R. Bjork, *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 6830–6835.
- [10] S. T. Howard, K. L. Newman, S. McNulty, B. A. Brown-Elliott, R. Vasireddy, L. Bridge, R. J. Wallace, *Microbiology* **2013**, *159*, 2323–2332.
- [11] X. Wu, B. Cao, P. Aquino, T. P. Chiu, C. Chen, S. Jiang, Z. Deng, S. Chen, R. Rohs, L. Wang, J. E. Galagan, P. C. Dedon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 14322–14330.
- [12] Y. Sun, L. Kong, G. Wu, B. Cao, X. Pang, Z. Deng, P. C. Dedon, C. Zhang, D. You, *Biomolecules* **2020**, *10*, 1175.
- [13] a) C. Dal Magro, P. Keller, A. Kotter, S. Werner, V. Duarte, V. Marchand, M. Ignarski, A. Freiwald, R. U. Muller, C. Dieterich, Y. Motorin, F. Butter, M. Atta, M. Helm, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 7893–7897; b) V. F. Reichle, D. P. Petrov, V. Weber, K. Jung, S. Kellner, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 5600.
- [14] M. Jora, K. Borland, S. Abernathy, R. Zhao, M. Kelley, S. Kellner, B. Addepalli, P. A. Limbach, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 3961–3966; *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 4007–4012.
- [15] P. F. Crain, *Methods Enzymol.* **1990**, *193*, 782–790.
- [16] W. M. Cai, Y. H. Chionh, F. Hia, C. Gu, S. Kellner, M. E. McBee, C. S. Ng, Y. L. Pang, E. G. Prestwich, K. S. Lim, I. R. Babu, T. J. Begley, P. C. Dedon, *Methods Enzymol.* **2015**, *560*, 29–71.
- [17] M. Matuszewski, J. Wojciechowski, K. Miyauchi, Z. Gdaniec, W. M. Wolf, T. Suzuki, E. Sochacka, *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 2137–2149.
- [18] a) Y. Furuichi, M. Morgan, S. Muthukrishnan, A. J. Shatkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 362–366; b) T. Fujimura, R. Esteban, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 17667–17671; c) J. Wang, B. L. Alvin Chew, Y. Lai, H. Dong, L. Xu, S. Balamkundu, W. M. Cai, L. Cui, C. F. Liu, X. Y. Fu, Z. Lin, P. Y. Shi, T. K. Lu, D. Luo, S. R. Jaffrey, P. C. Dedon, *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, e130.
- [19] L. S. Zhang, C. Liu, H. Ma, Q. Dai, H. L. Sun, G. Luo, Z. Zhang, L. Zhang, L. Hu, X. Dong, C. He, *Mol. Cell* **2019**, *74*, 1304–1316.
- [20] a) Y. H. Chionh, C. H. Ho, D. P. Pruskakorn, I. Ramesh Babu, C. S. Ng, F. Hia, M. E. McBee, D. Su, Y. L. Pang, C. Gu, H. Dong, E. G. Prestwich, P. Y. Shi, P. R. Preiser, S. Alonso, P. C. Dedon, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, e168; b) F. Hagelskamp, K. Borland, J. Ramos, A. G. Hendrick, D. Fu, S. Kellner, *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, e41.
- [21] S. Kellner, A. Ochel, K. Thuring, F. Spenkuch, J. Neumann, S. Sharma, K. D. Entian, D. Schneider, M. Helm, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, e142.
- [22] M. Heiss, F. Hagelskamp, V. Marchand, Y. Motorin, S. Kellner, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 389.
- [23] J. J. Thiaville, S. M. Kellner, Y. Yuan, G. Hutinet, P. C. Thiaville, W. Jumpathong, S. Mohapatra, C. Brochier-Armanet, A. V. Letarov, R. Hillebrand, C. K. Malik, C. J. Rizzo, P. C. Dedon, V. de Crecy-Lagard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E1452–E1459.
- [24] B. E. Maden, *Methods* **2001**, *25*, 374–382.

Manuskript erhalten: 8. Mai 2021

Akzeptierte Fassung online: 2. August 2021

Endgültige Fassung online: ■■ ■■ ■■■■

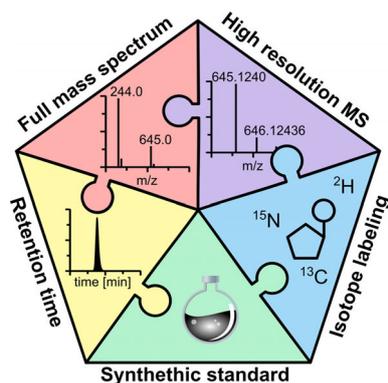
## Forschungsartikel



## RNA-Modifikationen

S. Kaiser, S. R. Byrne, G. Ammann,  
P. Asadi Atoi, K. Borland, R. Brecheisen,  
M. S. DeMott, T. Gehrke, F. Hagelskamp,  
M. Heiss, Y. Yoluç, L. Liu, Q. Zhang,  
P. C. Dedon, B. Cao,\*  
S. Kellner\*    

Strategien zur Vermeidung von  
Artefakten in der  
massenspektrometrischen  
Epitranskriptomanalytik



Für die Entdeckung neuartiger RNA-Modifikationen ist ein strenger Arbeitsablauf zur Strukturvalidierung erforderlich, um Fehlinterpretationen von Artefakten zu vermeiden. Der Vergleich des synthetischen Standards mit der Retentionszeit der nativen Verbindung, dem vollständigen Massenspektrum, dem hochauflösenden Massenspektrum und der metabolischen Isotopenmarkierung ermöglicht eine sichere Identifizierung von RNA-Modifikationen.