

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Studie zu seltenen RNA-Modifikationen

Timm Taylan Ensfelder

aus

Braunschweig, Deutschland

2020

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 12.06.2020

.....
Timm Taylan Ensfelder

Dissertation eingereicht am:

16.03.2020

1. Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Carell

2. Gutachterin:

Dr. Stefanie Kellner

Mündliche Prüfung am:

18.05.2020

„We must strive to be more than we are [...]. It does not matter that we will not reach our ultimate goal. The effort itself yields its own reward“

Data

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Personen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater *Prof. Dr. Thomas Carell* für all die spannenden Themen sowie die wunderbare Betreuung während dieser Zeit sehr herzlich bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei *Dr. Stefanie Kellner* für die Übernahme des Koreferats und allen weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission.

Dr. Markus Müller gilt mein Dank für die zahlreichen interessanten Diskussionen während dieser Zeit sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Ich möchte mich auch herzlich bei *Helge Ernst, Eva Korytiaková, Markus Hillmeier, Leander Runtsch* und *Franziska Traube* bedanken, welche diese Arbeit ebenfalls korrekturgelesen haben.

Ich bedanke mich herzlich bei meinen Laborkollegen, deren Humor und Gesellschaft diese Zeit zu einer unvergesslichen gemacht haben. Hier möchte ich mich insbesondere bei *Samuele Stazzoni, Eva Korytiaková, Angie Kirchner, Leander Runtsch, Franziska Traube, Michael Stadlmeier, Dilara Özdemir* danken.

Ein besonders großer Dank geht an meine Familie, sowie langjährigen Freunden die mich durch Höhen und Tiefen begleitet haben und mir ein Fels in der Brandung sind.

Ein nicht ermessbarer Dank geht an meine Eltern.

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen

Timm T. Ensfelder,[‡] Matthias Q. Kurz,[‡] Katharina Iwan,[‡] Simon Geiger, Sarah Matheisl, Markus Müller, Roland Beckmann, Thomas Carell*, ALKBH5-induced demethylation of mono- and dimethylated adenosine. *Chem. Commun.*, **2018**, 54, 8591-8593, DOI: 10.1039/c8cc03980a

Peter Thumbs,[‡] Timm T. Ensfelder,[‡] Markus Hillmeier,[‡] Mirko Wagner,[‡] Matthias Heiss, Constanze Scheel, Alexander Schön, Markus Müller, Stylianos Michalakis, Stefanie Kellner, Thomas Carell*, Synthesis of Galactosyl-Queuosine and Distribution of Hypermodified Q-Nucleosides in Mouse Tissues. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 54, 8591-8593, DOI: 10.1002/anie.202002295

([‡] Beitrag der Autoren zu gleichen Teilen.)

Inhaltsverzeichnis

Abstract	VII
Zusammenfassung	IX
1 Einleitung	1
1.1 Ribonukleinsäure	1
1.2 Familie der N^6 -methyl-Adenosinderivate	3
1.2.1 N^6,N^6 -Dimethyladenosin	3
1.2.2 N^6 -Methyladenosin, eine mRNA-Modifikation	5
1.3 ALKBH5	6
1.4 Transfer RNA	9
1.5 Thiomethylierte Adenosinderivate	11
1.5.1 Biosynthese von 2-Methylthio- N^6 -isopentenyl-adenosin	12
1.5.2 Biosynthese von 2-Methylthioadenosin	12
1.6 Queuosin	13
1.6.1 Queuosin-Derivate	14
1.6.2 <i>De novo</i> Biosynthese	15
1.6.3 Queuosin in Eukaryoten	17
1.6.4 Biologische Funktion	18
1.7 Aufgabenstellung	22
1.7.1 Studie zur Substratspezifität von ALKBH5	22
1.7.2 Biosyntheseweg von 2-Methylthioadenosin	22
1.7.3 Queuosin	23
2 Ergebnisse und Publikation	25
2.1 2-Methylthioadenosin	25
2.1.1 <i>E. coli</i> Einzelknockoutstudien	25
2.1.2 <i>E. coli</i> Multiple Knockouts	26
2.2 Queuosin	29
2.2.1 Isotopenfütterungsstudien	29

2.2.2	Koinjektionsstudien	34
2.2.3	Enzymatische Studien	37
2.2.4	Organ- und altersabhängige Queuosinlevel	39
2.3	Ausblick	45
2.3.1	Syntheseweg von 2-Methylthioadenosin	45
2.3.2	Queuosin	45
2.4	Publikation	48
3	Material und Methoden	52
3.1	Material	52
3.1.1	Geräteliste	52
3.1.2	Medien, Puffer und Lösungen	54
3.1.3	Größenstandards	56
3.1.4	Stämme und Zelllinien	57
3.2	Mikrobiologische und Zellkulturmethoden	57
3.2.1	Vorkulturen	57
3.2.2	Hauptkulturen	58
3.2.3	Stammerhaltung	58
3.2.4	Zellkultur	58
3.3	Biochemische Methoden	59
3.3.1	Mäuse für Organstudien	59
3.3.2	RNA Isolation	60
3.3.3	RNA Fällung	61
3.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	62
3.3.5	TBE-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	62
3.4	Proteinschemische Methoden	62
3.4.1	Organentnahme und -aufschluss	62
3.4.2	Abtrennen der Zelltrümmer und Dialyse	63
3.4.3	Proteinreinigung	63
3.4.4	Enzym Assay	63
3.4.5	RNA Extraktion	64
3.5	Methoden der Veröffentlichung	64
Anhang		76
	Ergänzende Abbildungen	76
	Liste der im LD-1-Stamm ausgeschalteten Gene	78

Abstract

Ribonucleic acid (RNA) is based on the four canonical nucleic acids. In the cell, those four nucleic acids can be further functionalised. The first modification was already discovered in 1957 and is today known as pseudouridin. Currently there are 163 modifications registered in the Modomics database. Beside the steadily rising number of known RNA-modifications, we today now that some of them are not static, but that some of them are affected by dynamic regulatory processes of the cell. One of these dynamically regulated RNA-modifications is m^6A . The methyl group, located at the N^6 , of the N^6 -methyladenosine can be removed in an oxidative process by the *Eraser*-enzymes FTO and ALKBH5. Beside m^6A , FTO is also able to remove the methyl group of modifications such as m^6A_m , m^1A . Apart from m^6A there are no known other substrates for ALKBH5. This work presents data showing, that ALKBH5₆₆₋₂₉₂ is able, to fully demethylate the ribosomal modification N^6, N^6 -dimethyladenosine (m_2^6A).

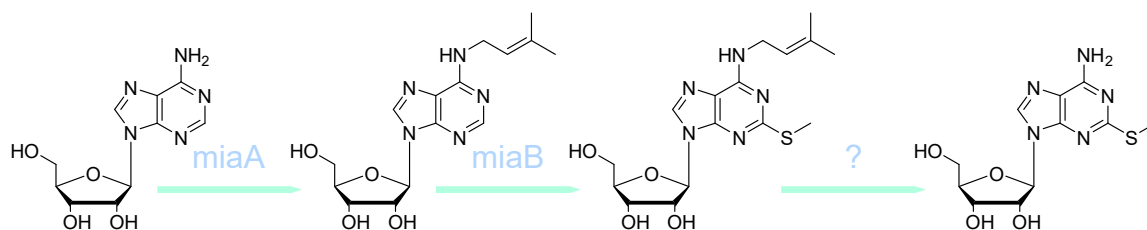


Figure 0.1: Schematic illustration of the ms^2A biosynthesis pathway based on the data presented in this thesis.

2-Methylthioadenosine (ms^2A) is a RNA-modification that, unlike m^6A , is not well studied. Literature suggests, that it is present in tRNAs. In the organism *Escherichia coli* (*E.coli*), there is beside 2-methylthio- N^6 -isopentenyl-adenosine (ms^2i^6A), only ms^2i^6A , which is thiomethylated at the C2 position. ms^2i^6A is synthesized by the thiomethyltransferase MiaB. In contrast to ms^2A , it is modified with a prenyl group at the nitrogen at position six. In this thesis it was studied, if ms^2A is the product of an enzymatic removal of the prenyl group. The results indicate that this is probably the case (Fig. 0.1). The enzyme responsible for the removal of ms^2i^6A 's prenyl group, was not identified, but the number of candidates was reduced to less than 99 gene products by studying *E.coli* knockout strains.

Queuosine is a long known and well-studied tRNA modification. Interestingly it can only be synthesized by procaryotes but it is also found in eucaryotes. In the latter case, the queuosine of the tyrosine and aspartic acid tRNA can be further modified to β -galactosyl- and β -mannosyl-queuosine, respectively. The structure of the derivates was published in 1976, but the structure of β -mannosyl-queuosine, was falsified by *Thumbs*. In this thesis, experiments with mannose- $^{13}\text{C}_6$ in cells show, that the queuosine in tRNA^{ASP} is indeed mannosyl-queuosine. Furthermore, a series of experiments where conducted with different synthetic mannosyl-queuosin standards, which where coinjected with total RNA isolated from mice. The series of experiments is currently not complete for a final conclusion. The results of the already conducted experiments indicate that there is probability, that the mannsyl-queuosine of the tRNA^{ASP} is α -homo-allyl-mannosyl-queuosine.

While the *de novo* synthesis of queuosine and its derivates is thouroughly studied in pro-caryotes, that is not the case for eucaryotes. The enzyme which synthesizes α -mannosyl-queuosine is not known. A publication from 1976 reported an enzymatic activity in rat liver extract, which specifically mannosylated queuosine in *E.coli* tRNA^{ASP}. In this thesis I conducted experiments based upon this publication. The reported actvity, however was not observed.

I therefore continued to investigate the modification levels of queuosine, mannosyl- and galactosyl-queuosine quantitatively in mice at to different ages and in six different organs. The age points were one day after birth and three months and five days after birth. The obtained data show, that mannosyl- and galactosyl-queuosine levels change less with age than queuosine. This strong change of queuosine seems to be correlating with the amount of mitochondrial tRNA. In mitochondria, different to the cytosol, queuosine is not further derivatised. All the modifications levels do differ more across organs than over time. The levels are generally higher in the cerebrum, cerebellum and heart than in the kidney, liver and spleen. According to literature the latter three organs have a higher fractional protein synthesis rate. It seems likely that the Q-tRNAs in these organs are undermodified. Lower levels of modification might be correlating with a higher fractional protein synthesis rate.

Zusammenfassung

Die Ribonukleinsäure (RNA) basiert auf vier kanonischen Nucleinsäuren. Diese vier Nucleinbasen können in der Zelle enzymatisch weiter funktionalisiert werden. Bereits 1957 wurde die erste RNA-Modifikation, welche heute als Pseudouridin bekannt ist, entdeckt. Heute sind 163 Modifikationen in die Datenbank *Modomics* eingetragen. Neben der stetig wachsenden Anzahl an bekannten RNA-Modifikationen, wissen wir heute auch, dass diese nicht statisch sind, sondern einige von ihnen dynamischen Regulationsprozessen der Zelle unterliegen. Eine dieser dynamisch regulierten RNA-Modifikationen ist das m^6A . Die Methylgruppe am N^6 des N^6 -Methyladenosins kann durch die *Eraser*-Enzyme FTO und ALKBH5 oxidativ entfernt werden. Neben m^6A kann FTO aber auch die Methylgruppe an Modifikationen wie dem m^6A_m , m^1A entfernen. Bei ALKBH5 hingegen sind über das m^6A hinaus, keine weiteren Substrate bekannt. In dieser Arbeit wurde gezeigt das ALKBH5₆₆₋₂₉₂ neben m^6A auch die ribosomale Modifikation N^6,N^6 -Dimethyladenosin (m^2A) vollständig demethylieren kann.

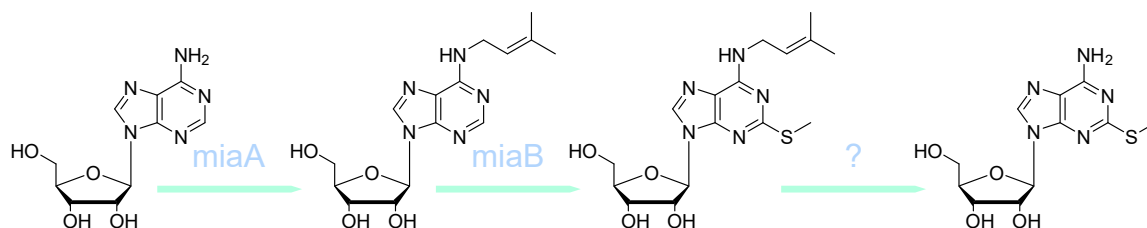


Abbildung 0.2: Schematische Darstellung der Biosynthese von ms^2A , auf Grundlage der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse.

2-Methylthioadenosin (ms^2A) ist eine RNA-Modifikation, welche anders als m^6A , bisher nicht ausgiebig studiert wurde. Die Literatur lässt darauf schließen, dass die Verbindung in tRNAs vorkommt. In dem Organismus *Escherichia coli* (*E. coli*), ist neben ms^2A mit dem 2-Methylthio- N^6 -isopentenyladenosine (ms^2i^6A), nur eine weitere tRNA-Modifikation bekannt, welche an der C2-Position thiomethyliert ist. Das ms^2i^6A wird durch die Thiomethyltransferase MiaB dargestellt und unterscheidet sich von ms^2A durch eine Prenylgruppe an dem exozyklischen Stickstoff an Position sechs. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das ms^2A das Produkt einer enzymatischen Entfernung dieser Prenylgruppe ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass dies wahrscheinlich der Fall ist (Abb. 0.2). Das Enzym, welches die Prenylgruppe des ms^2i^6A entfernen kann, wurde in dieser Arbeit nicht

gefunden. Allerdings konnte die Liste infrage kommender Genprodukte, durch die Untersuchung von *E. coli* Knockoutstämmen, auf unter 99 reduziert werden.

Queuosin ist eine lang bekannte und gut studierte tRNA-Modifikation. Interessanterweise kann sie ausschließlich von Prokaryoten dargestellt werden, kommt aber auch in Eukaryoten vor. In letzteren kann das Queuosin der Tyrosin- und Asparaginsäure-tRNA weiter zu β -Galaktosyl- bzw. β -Mannosylqueuosin derivatisiert werden. Die Strukturen beider Derivate wurde 1976 veröffentlicht, jedoch wurde die Struktur des β -Mannosylqueuosins von *Thumbs* falsifiziert. In der hier vorliegenden Arbeit konnte in Zellexperimenten, über Mannose- $^{13}\text{C}_6$ gezeigt werden, dass es sich bei dem Queuosinderivat in der tRNA^{Asp} tatsächlich um Mannosylqueuosin handelt. Infolgedessen wurden Koinjektionsversuche durchgeführt, bei denen verschiedene synthetische Mannosylqueuosinstandards zusammen mit Gesamt-RNA aus Maus auf ein Massenspektrometer injiziert wurden. Die Versuchsreihen waren zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht vollständig abgeschlossen. Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass es sich bei dem Mannosylqueuosin in der tRNA^{Asp} wahrscheinlich um α -Homo-allyl-mannosylqueuosin handelt.

Während die *de novo* Synthese von Queuosin und seinen Derivaten in Prokaryoten vollständig aufgeklärt ist, ist dies in Eukaryoten nicht der Fall. So ist das Enzym, welches α -Mannosylqueuosin darstellt, nicht bekannt. In einer Veröffentlichung von 1976 wurde von einer enzymatischen Aktivität in Rattenleberextrakt berichtet, welche spezifisch das Queuosin der *E. coli* tRNA^{Asp} mannosylieren kann. In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein Experiment auf der Grundlage dieser Veröffentlichung durchgeführt. Jedoch konnte die enzymatische Aktivität in diesen Experimenten nicht beobachtet werden.

In dieser Arbeit wurden die Queuosin-, Mannosylqueuosin- und Galaktosylqueuosin-Level zum ersten Mal in sechs verschiedenen Mäuseorganen zu zwei verschiedenen Alterszeitpunkten quantifiziert. Die Alterszeitpunkte sind ein Tag nach der Geburt und drei Monate und fünf Tage nach der Geburt. Hier hat sich gezeigt, dass die Level des Mannosyl- und Galaktosylqueuosins sich mit dem Alter moderater verändern als die des Queuosins. Dieser stärkere Anstieg des Queuosins scheint dabei mit dem Anteil an mitochondrialer tRNA zusammenzuhängen. In Mitochondrien wird das Queuosin, anders als im Zytosol, nicht weiter derivatisiert. Bei allen drei Modifikationen hat sich allerdings gezeigt, dass der Unterschied zwischen Organen größer ist als die Veränderung über das Alter hinweg. So sind die Level in Groß-, Kleinhirn und Herz in der Tendenz höher als in der Niere, Leber

und Milz. Die Literatur zeigt, dass die letzten drei Organe eine höhere Proteinsyntheserate haben. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass die Q-tRNAs in diesen Organen untermodifiziert sind. Der Modifikationsgrad dieser tRNAs scheint mit einer höheren Proteinsyntheserate tendenziell abzunehmen.

1 Einleitung

1.1 Ribonukleinsäure

1970 publizierte *Crick* die finalisierte Version des zentralen Dogmas der molekularen Biologie,¹ dessen Kernaussage auch heute gültig ist. Es besagt, dass Desoxyribonukleinsäure (DNA) in Ribonukleinsäure (RNA) transkribiert wird, welche wiederum als Vorlage für die Translation von Proteinen dient. In diesem Dogma spielt die RNA eine zentrale Rolle. Sie transportiert die genetische Information in Form der messenger RNA (mRNA),^{2,3} welche dann zusammen mit der transfer-⁴⁻⁶ und ribosomalen RNA in dem katalytischen Prozess der Proteinbiosynthese teilnimmt.⁷ Die RNA basiert auf den vier kanonischen Basen Adenin (A), Uracil (U), Cytosin (C) und Guanin (G) und einem Ribose-Phosphat-Rückgrat. Sie unterscheidet sich von der DNA in der Verwendung von Uracil statt Thymin (T) und Ribose statt Desoxyribose (Abb. 1.1 A). Darüber hinaus kann dieses Set an kanonischen Basen durch Veränderung des Purin-, Pyrimidin- oder Ribosegerüsts erweitert werden (Abb. 1.1 B und C). Diese Erweiterung des Sets ist notwendig, um RNAs an ihre jeweilige funktionale Aufgabe besser anzupassen. Die erste RNA-Modifikation wurde 1957 zunächst als *fifth Base* bezeichnet,⁸ bevor sie mit Pseudouridin (Ψ) einen eindeutigen Namen erhielt.^{9,10} Aktuell sind 163 verschiedene RNA-Modifikationen bekannt.¹¹ Diese dienen als Marker für Proteine, verändern die Basenpaarungseigenschaften und beeinflussen oder stabilisieren die räumliche Struktur eines RNA-Strangs.¹² Letztere Eigenschaften sind besonders wichtig für funktionelle RNA, wie der tRNA und rRNA, welche den größten Anteil an der RNA in einer Zelle haben.^{13,14} Die Abundanz der ribosomalen RNA, in der Zelle, ist insgesamt am höchsten und wird deshalb im folgenden genauer erläutert.^{13,14}

Das eukaryotische Ribosom ist ein Verbund aus Proteinen und RNA. Es besteht aus einer kleinen (40S) und einer großen Untereinheit (60S). Die große Untereinheit beherbergt zwei (5.8S und 28S) und die kleine eine ribosomale RNA (18S).¹⁵ Etwa 2 % der rRNA sind modifiziert.^{16,17} Der größte Anteil sind 2'-O-Methylierungen aller kanonischen Basen (N_m) und Pseudouridine. Beide lassen sich im menschlichen Ribosom jeweils unge-

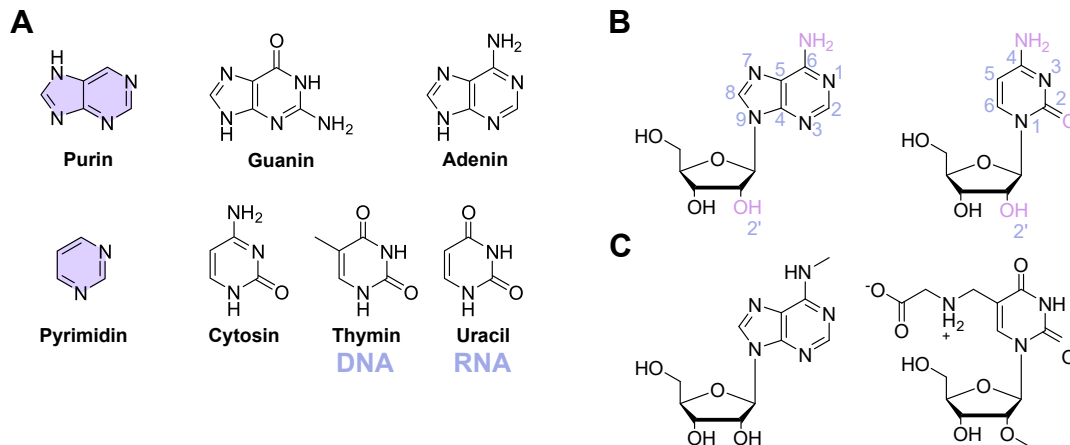


Abbildung 1.1: **A** Die fünf Basen leiten sich jeweils von dem Purin- bzw. Pyrimidingerüst ab. **B** Nummerierungsschema von RNA-Modifikationen. Neben der Base selbst kann auch die Hydroxylgruppe an der zweiten Position der Ribose methyliert werden. **C** Rechts: 6-Methyladenosin (m^6A), als ein Beispiel für eine einfache Purinmodifikation. Links: 5-Carboxymethylaminomethyl- 2'-O-methyluridine (ncm^5U_m) als ein Beispiel für eine komplexe Pyrimidinmodifikation (Hypermodifikation).

fähr 95 Mal finden.¹⁶ Weitere 10 Modifikationen kommen über Methylierungen des Purin- oder Pyrimidingerüsts hinzu.¹⁸ Die Modifizierungen werden auf zwei verschiedenen Wegen eingeführt. Entweder über Enzyme, die direkt an die jeweilige Region binden und modifizieren^{19–21} oder über einen Verbund aus Protein und einer kleinen nukleolären RNA (snoRNA *small nucleolar RNA*). Dieser Verbund wird snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*) genannt. Bei den snRNPs führt die RNA das Enzym über die Basenpaarung an die richtige Stelle.¹⁷ Es wird angenommen, dass einige dieser Enzyme als eine Art Qualitätsmarker dienen, da ihr Fehlen unter Umständen letale Folgen hat.^{22,23} Die meisten der ribosomalen Modifikationen haben vermutlich eine strukturstabilisierende Wirkung.^{12,17} Diese stabilisierenden Effekte können über verschiedene Wege erreicht werden. Methylierungen können Wasserstoffbrückenbindungen unterbinden²⁴ oder eine Interaktionsfläche für Van-der-Waals-Wechselwirkungen bieten.^{12,17} Pseudouridin kann gegenüber Uridin eine weitere Wasserstoffbrückenbindung bilden²⁵ Diese Base trägt dadurch ebenfalls zur Stabilisierung der Sekundärstruktur bei.¹⁷

1.2 Familie der N^6 -methyl-Adenosinderivate

1.2.1 N^6,N^6 -Dimethyladenosin

Vorkommen

Eine besondere Modifikation welche für die Sekundärstruktur des Ribosoms von Relevanz ist, ist das N^6,N^6 -Dimethyladenosin (m_2^6A).²⁴ m_2^6A ist ein zweifach methyliertes Adenosinderivat, welches ausschließlich in der kleinen ribosomalen Untereinheit vorkommt.^{11,26} Zwei aufeinander folgende m_2^6A , werden während des ribosomalen Maturierungsprozesses durch DIMT1 (*Dimethyladenosine transferase 1*; vormals DIMT1L) in die Helix 45 (h45) der 18S rRNA eingeführt.²³ Die Dimethyltransferase ist in allen drei Domänen des Lebens konserviert und war vermutlich ein Teil von LUCA (englisch *Last Universal Common Ancestor*).²⁷ Der Sequenzkontext von m_2^6A ist in einem starken Maß konserviert und zeigt nur eine geringe Varianz.^{26,28–30} In Menschen sind das die Adenosine an der Position 1850 und 1851.²⁶

Biosynthese und biologische Funktion

Zorbas hat in einer Veröffentlichung von 2015 gezeigt, dass DIMT1 stark in den Maturierungsprozess des humanen Ribosoms involviert ist. Die zweifache Methylierung der beiden Adenosin-Basen findet in humanen Zellen bereits im Nukleus statt. Das Fehlen des Enzyms führt zu der Akkumulation verschiedener Vorläufer rRNAs. Bei der Expression einer katalytisch inaktiven Mutante des Enzyms konnte diese Akkumulation hingegen nicht beobachtet werden.²³ In *Saccharomyces cerevisiae* ist das Fehlen von DIM1 sogar letal.²² Es wurde jedoch gezeigt, dass es das Fehlen der Dimethyltransferase ist, welches letale Folgen hat und nicht das der Modifikation selbst.³¹ Dennoch zeigt die Kristallstruktur der ribosomalen 30S Untereinheit von *Thermus thermophilus*, dass die Abwesenheit der Methylierungen eine veränderte räumliche Struktur der rRNA zur Folge hat. Mit den beiden m_2^6A kommt es zu Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Helixes 44 und 45. Ohne sie kommt es jedoch zu Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Helix 45. Die Veränderung des Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerkes führt zu einer veränderten Position von A_{1492} , A_{1493} und C_{1054} , drei Nukleobasen, die direkt an dem Dekodierungsprozess beteiligt sind.²⁴ Über die Einführung der zwei methylierten Adenosinderivate wird also ein komplexes Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen reguliert, welches einen direkten Einfluss auf die Translation selbst hat.

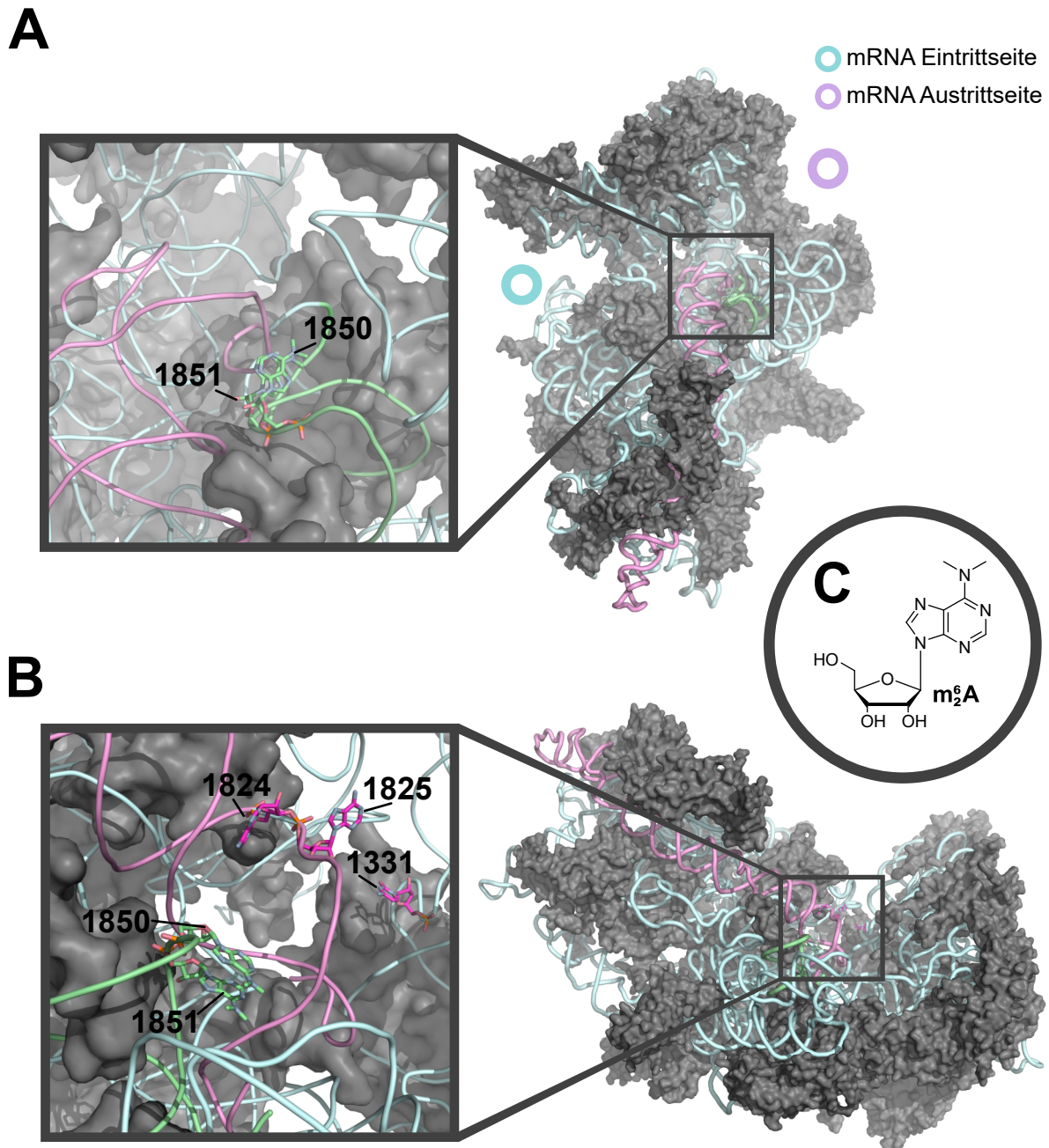


Abbildung 1.2: Darstellung der humanen kleinen ribosomalen Untereinheit (PDB: 6QZP). Die Helix 44 ist in Altrosa und die Helix 45 in Grün dargestellt. **A** Ansicht von oben. Auf der linken Abbildung sind A₁₈₅₀, A₁₈₅₁ dargestellt. Die Information für die Abbildung wurden teilweise der Veröffentlichung von *Zorbas* entnommen.²³ **B** Seitliche Ansicht. Des Weiteren sind A₁₈₂₄, A₁₈₂₅ und C₁₃₃₁ dargestellt. Sie entsprechen A₁₄₉₂, A₁₄₉₃ und C₁₀₅₄ in den PDB-Einträgen (1J5E, 3OTO) aus der Publikation von *Demicri*.²⁴ Eine Referenzabbildung befindet sich im Anhang. **C** Struktur von N^6,N^6 -Dimethyladenosin.

1.2.2 *N*⁶-Methyladenosin, eine mRNA-Modifikation

Im Laufe dieses Jahrzehnts sind Modifikationen in der mRNA zunehmend in den Fokus gerückt. Zu dieser Gruppe modifizierter Nucleoside gehören unter anderem das m⁵C, m¹A, Pseudouridin, 2'-OH methylierte Derivate aller Basen, sowie das m⁶A.³²⁻³⁴ m⁶A wurde bereits 1974 in mRNA nachgewiesen und ist in dieser sehr abundant.³⁵ Eine weitere Studie konnte zeigen, dass die Mehrheit der analysierten mRNAs mehr als ein m⁶A pro Transkript tragen.³⁶ Darüber hinaus wurde eine Konsensussequenz RRACH (R=A/G, H=U/A/C) identifiziert und gezeigt, dass m⁶A verstärkt im 3'-UTR Bereich in der Nähe des Stoppkodons vorkommt.^{36,37} m⁶A beeinflusst die Stabilität der mRNA,³⁸⁻⁴² deren Export aus dem Nucleus,^{43,44} die Translation^{38,45-48} sowie die Prozessierung (*splicing*)⁴⁹⁻⁵⁷ der Transkripte. An der Regulation der RNA-Modifikation selbst, sind drei Enzymklassen beteiligt. *Writer* führen die Modifikation ein, *Reader* erkennen diese und *Eraser* können die chemische Veränderung wieder rückgängig machen.⁵⁸ Zunächst konnte METTL3, ein SAM-abhängiges Enzym, identifiziert werden, welches Adenosin zu m⁶A methylieren kann.^{59,60} Der vollständige *Writer*-Komplex wurde erstmals 1994 charakterisiert. Bei diesen Studien konnte gezeigt werden, dass er eine zunehmende Größe von 1105 kDa hat.⁶¹ Neben METTL3 (*Methyltransferase-like protein 3*; auch MT-A70 genannt)⁶² sind heute ein Vielzahl weiterer Komponenten des *Writer*-Komplexes bekannt,^{40,49,63-73} deren Funktion zum Teil nicht vollständig nachvollzogen ist.^{74,75} Die *Reader* von m⁶A gehören größtenteils zur YTH-Familie.^{38,39,41,44,46,48,52}

Mit FTO (*Fat mass and obesity-associated protein*) wurde 2011 das erste *Eraser*-Enzym gefunden, welches *N*⁶-Methyladenosin (m⁶A) zu Adenosin demethyliert.⁷⁶ Eine Veröffentlichung von *Mauer* zeigt jedoch, dass FTO *in-vitro* m⁶A_m mit einer wesentlich höheren katalytischen Effizienz demethyliert.⁷⁷ Zwei neuere Studien zeigen, dass FTO sowohl m⁶A als auch m⁶A_m in mRNA effizient demethyliert.^{78,79} FTO zeigt generell ein breiteres Substratspektrum und kann neben m⁶A_m und m⁶A auch m¹A in tRNA demethylieren.⁷⁸ Es kann auch m³T (in ssDNA) und m³U (in ssRNA) demethylieren, dies aber nur mit einer geringen katalytischen Effizienz.⁸⁰⁻⁸²

1.3 ALKBH5

2013 wurde mit ALKBH5 ein zweiter *Eraser* für m⁶A gefunden.⁴³ Im Gegensatz zu FTO, akzeptiert ALKBH5 ausschließlich m⁶A als Substrat. Das Fehlen von ALKBH5 führt zu einer Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit bei Mäusen.⁴³ Der Namensgeber von ALKBH5, ist das prokaryotische DNA-Reparaturenzym AlkB (*Alkylated DNA repair protein*) aus *E.coli*.^{83,84} Anders als es der Name vermuten lässt, akzeptiert AlkB sowohl DNA- als auch RNA-Substrate.⁸⁵ Sowohl FTO als auch ALKBH5 gehören zu der AlkB-Gruppe,^{80,86} eine Untergruppe der Fe(II)/ α -Ketoglutarat (α KG) abhängigen Dioxygenasen, welche überwiegend Nukleobasen als Substrate haben.^{43,76,83-85,87-91} In Eukaryoten zählen zu der AlkB-Gruppe das FTO und die AlkB Homologe 1-8.^{80,85,86,92} Die Funktion von ALKBH6 ist nicht bekannt.⁹³ Eine Kristallstruktur von ALKBH7 lässt vermuten, dass es keine Nukleobase als Substrat hat.⁹⁰ ALKBH4 demetyliert das Lysin (K78Me1) in Actin und hat somit ebenfalls keine Nukleobase als Substrat.⁸⁸

Struktur und katalytischer Mechanismus Fe(II)/ α KG abhängiger Dioxygenasen

Ein gemeinsames Merkmal aller Fe(II)/ α KG abhängigen Dioxygenasen ist die DSBH-Faltung.⁹⁴ Eine Sequenz von acht aufeinander folgenden antiparallelen β -Faltblättern,⁹⁴ welche über Schleifen verbunden sind.^{95,96} Die DSBH-Faltung bildet eine deformierte, sich zu einer Seite verjüngende Fassetstruktur, welche das Grundgerüst für die katalytische Tasche bildet.^{95,96} Ein weiteres charakteristisches Merkmal dieser Enzymgruppe ist das HXD/E...H-Motiv, eine katalytische Triade, die das für die Reaktion notwendige Eisen(II) koordiniert.^{95,96} Diese Triade wird bei humanem ALKBH5 durch His₂₀₄, Asp₂₀₆ und His₂₆₆ gebildet.^{97,98} Im substrat- und kofaktorfreen Zustand, sind an dem Fe(II) drei Wassermoleküle gebunden (Abb.1.3 1). Durch die Bindung des Kofaktors werden zwei von ihnen verdrängt (Abb.1.3 2). Die Bindung des Substrats verdrängt auch das dritte Wassermolekül (Abb.1.3 3), wodurch unter der Bildung von Fe(III) molekularer Sauerstoff gebunden werden kann (Abb.1.3 4). Infolgedessen kommt es zu einer Umlagerungsreaktion wobei das α -Ketoglutarat decarboxyliert wird und sich ein Oxoferryintermediat bildet (Abb.1.3 5 und 6). Danach kommt es zunächst zu einer radikalischen Aktivierung des Substrats gefolgt von einer Hydroxylierung (Abb.1.3 7). Anschließend kann das Produkt freigesetzt werden (Abb.1.3 8).⁹⁴

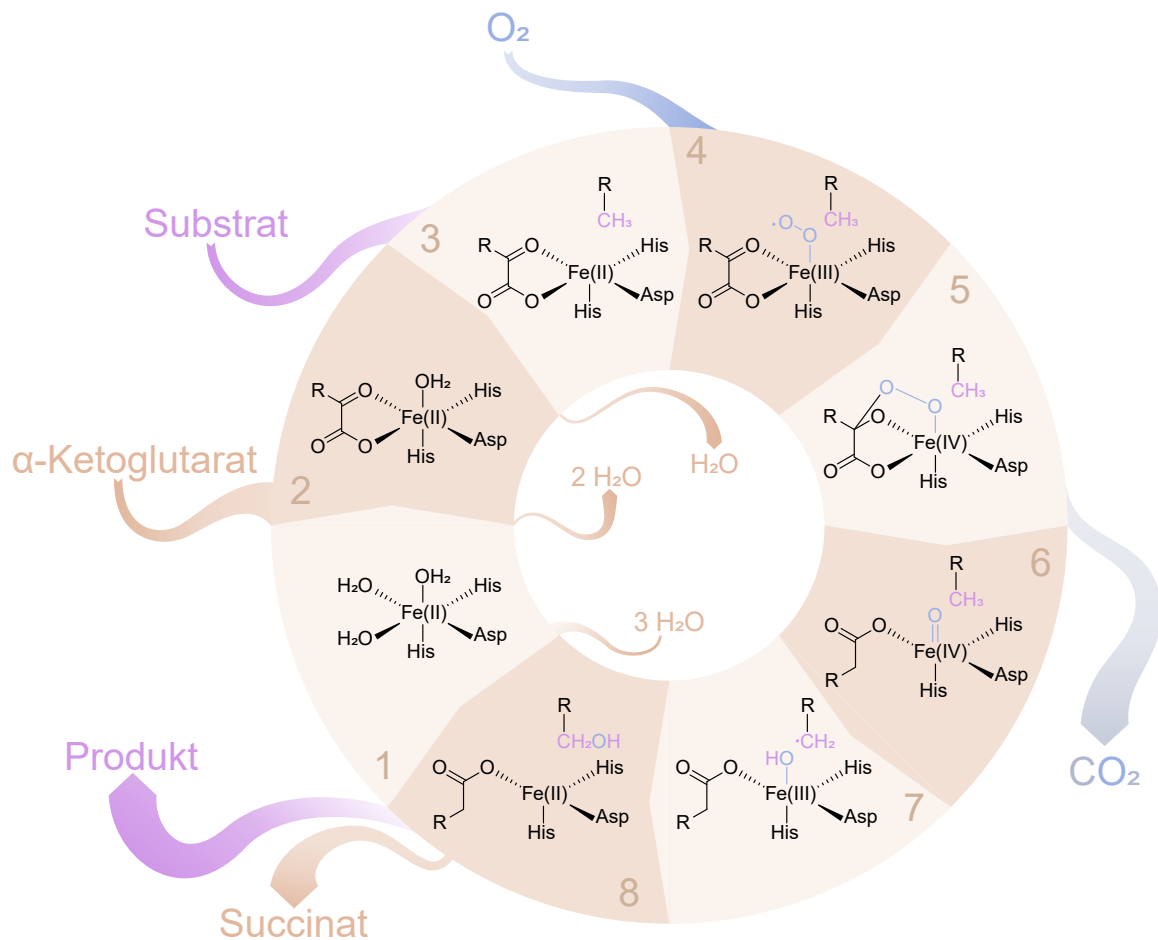


Abbildung 1.3: Generelles Reaktionsschema einer Fe(II)/ α KG abhängigen Dioxygenase.

Während der Demethylierung von m^6A durch FTO können die hm^6A und f^6A beobachtet werden. Diese haben unter physiologischen Bedingungen eine Halbwertszeit etwa von drei Stunden. f^6A wird durch eine erneute Oxidation von hm^6A erzeugt.⁹⁹ Gleiches konnte für ALKBH5 nicht gezeigt werden und es wird angenommen, dass ALKBH5 die Demethylierung vollständig katalysiert.^{82, 100}

Substrat- und α -KG-Erkennung bei ALKBH5

Die aktive Tasche der AlkB-Familie weist konservierte Reste auf, die sich auch bei ALKBH5 erkennen lassen. Das α KG, welches tief in der Tasche liegt wird von Tyr₁₉₅, Arg₂₇₇ und Asn₁₉₃ gebunden. Tyr₁₉₅ und Arg₂₇₇, binden das C5-Ende des α KGs und Asn₁₉₃ und Arg₂₈₃ das C1-Ende.^{97, 98}

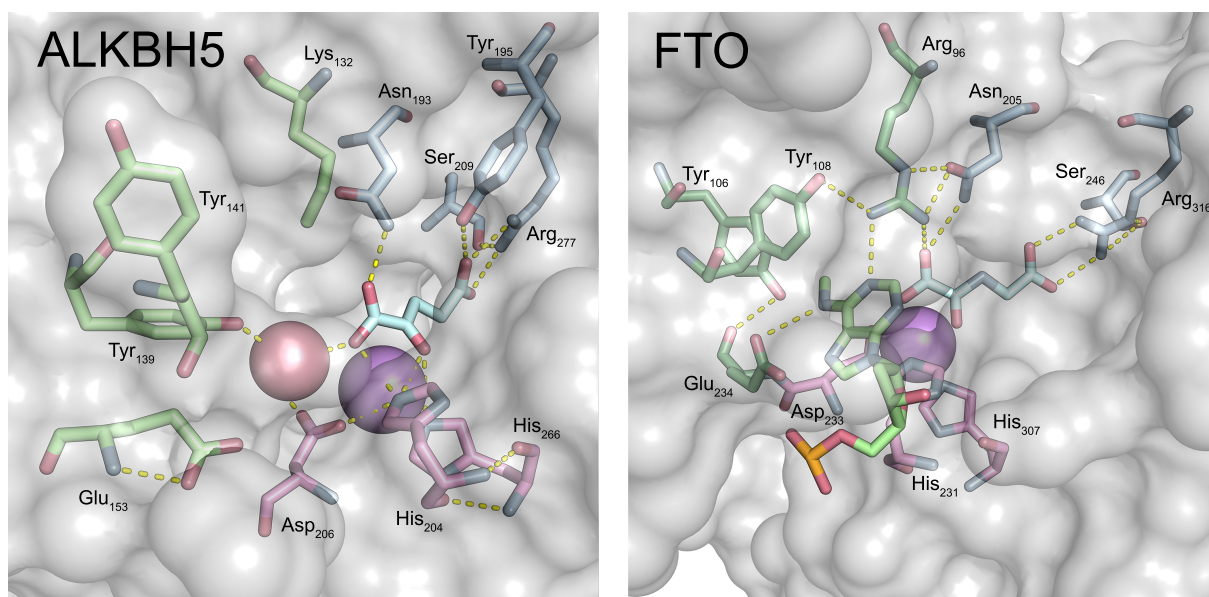


Abbildung 1.4: Darstellung der aktiven Taschen von ALKBH5 und FTO. Die Triade und das Mangan(II) sind in Rosa und Violett dargestellt. Das Mangan(II) ist ein Kristallisationsersatz für Eisen(II). Das m⁶A und die mit ihm wechselwirkenden Aminosäuren sind in grün. Das α-Ketoglutarat und die mit ihm wechselwirkenden Aminosäuren sind blau dargestellt. **Links:** Aktive Tasche von ALKBH5 mit α-Ketoglutarat (PDB: 4NRO). **Rechts:** Aktive Tasche von FTO mit m⁶A und N-Oxalylglycin (PDB: 5ZMD).

Die Substraterkennung erfordert spezifische Reste. Doch auch hier gibt es Merkmale, die einige oder alle AlkB-Mitglieder teilen. Ein Element, das alle gemeinsam haben, ist ein saurer Rest in der Nähe der Substratdomäne.⁹⁸ In einer Studie von 2019 konnte *Zhang* eine Mutante von FTO, die auch dsDNA bindet, mit m⁶A-DNA kristallisieren. Anhand dieser Struktur lässt sich erkennen, dass Glu₂₃₄ eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem N⁶ des m⁶As ausbildet und stabilisiert.⁷⁹ In ALKBH5 lässt sich dieser saure Rest (hier Glu₁₅₃) auch finden.⁹⁸ Eine ALKBH5-Glu153Gly-Mutante hat jedoch keine Aktivitätsminderung beobachten lassen.⁹⁷ In FTO führt eine Mutation (Glu234Ala) dieser Position hingegen zu einer erhöhten Demethylierungsaktivität gegenüber m⁶A, aber auch zu einer wesentlich höheren Aktivität gegenüber m³T. Darüber hinaus bindet FTO m⁶A über eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem N¹ und Arg₉₆.⁷⁹ ALKBH5 besitzt an dieser Position ebenfalls einen basischen Rest (Lys₁₃₂).^{98,100} Eine Mutation des Lysins¹ zu Arginin in Zebrafisch ALKBH5, führt zu einem fast vollständigen Aktivitätsverlust.¹⁰⁰ AlkB, ALKBH2, FTO und ALKBH5 teilen ein konserviertes YXY/F-Motiv. Die dritte Position dieses Motivs stabilisiert das Substrat durch π-π-Wechselwirkungen.^{97,98} In ALKBH5

¹In dieser Studie Lys₁₀₀ in Zebrafisch ALKBH5, äquivalent zu Lys₁₃₂ in humanem ALKBH5

wird dies vermutlich durch Tyr₁₃₉ erreicht.⁹⁷

1.4 Transfer RNA

tRNAs sind mit einer durchschnittlichen Modifikationsrate von 10-15 % die am stärksten modifizierte RNA-Spezies.¹⁰¹ Gleichzeitig weisen sie auch die größte Diversität an Modifikationen auf.¹⁰² Interessanterweise scheinen einige tRNA-Modifikation, unter ihnen vor allem Methylierungen, einer gewissen Dynamik zu unterliegen. *Brandmayr* hat gezeigt, dass der Modifizierungsgrad einer tRNA vom jeweiligen Organ abhängt. Dies könnte eine Anpassung an die gewebespezifische Translation sein.¹⁰³ Eine Studie mit HEK293T-Zellen (*Human Embryonic Kidney 293T*) hat gezeigt, dass manche Positionen nicht vollständig methyliert sind. *Clark* vermutet, dass der Grad der Methylierung dynamisch ist und vom jeweiligen Zelltyp und Zellzyklus abhängen könnte.¹⁰⁴ Untersuchungen mit Hefe zeigen, dass sich der Grad einiger Modifikationen unter oxidativen Stressbedingungen verändert.^{105,106} *Liu* hat gezeigt, dass ALKBH1 in der Lage ist, m¹A in tRNAs zu demethylieren.⁸⁷ Wenn ALKBH1 ausgeschaltet ist, steigt der m¹A-Modifikationsgrad der mitochondrialen tRNA^{Arg,Lys}.¹⁰⁷

Die tRNAs sind 76 – 93 Nukleotide (nt) lang^{108,110} und bestehen aus fünf verschiedenen Regionen. Dem Akzeptorstamm, dem D- und TΨC-Stamm, der variablen Schleife, sowie dem Antikodonstamm. Die variable Schleife ist nicht bei allen tRNAs vorhanden. Der Akzeptorstamm beinhaltet die CCA-Sequenz über welche die tRNA mit der jeweiligen Aminosäure beladen wird.^{108,110} Der Einfachheit halber wird der Antikodonstamm in dieser Arbeit weiter unterteilt. Der untere Teil des Antikodonstamm bildet eine Schleife und wird in dieser Arbeit als Antikodonschleife bezeichnet. Der gesamte Antikodonstamm besteht aus 17 nt, von denen sieben die Antikodonschleife (Positionen 32 bis 39) bilden.³⁰ Innerhalb der tRNA ist die Häufigkeit sowie die Diversität von Modifikationen nicht uniform verteilt. Die Positionen 34 und 37 weisen mit Abstand die größte Diversität an Modifikationen auf.¹⁰² Die Auswirkungen der Modifikationen an Position 34 sind vielfältig und sehr tRNA spezifisch. Es ist die erste Stelle des drei Basen umfassenden Antikodons, welche mit der letzten Position des Kodontripletts interagiert. Nach einer von *Crick* aufgestellten Theorie sind an dieser Stelle auch Nicht-Watson-Crick-Basenpaarungen (Wobble-Basenpaarung) möglich.¹¹¹ Dadurch ist es möglich 61 verschiedene Kodons mit weniger tRNAs zu dekodieren.¹¹² Der Komplexitätsgrad einer Modifikation, an dieser Stelle, reicht von einfachen Methylierungen der Base, bis hin zu hypermodifizierten Basen wie

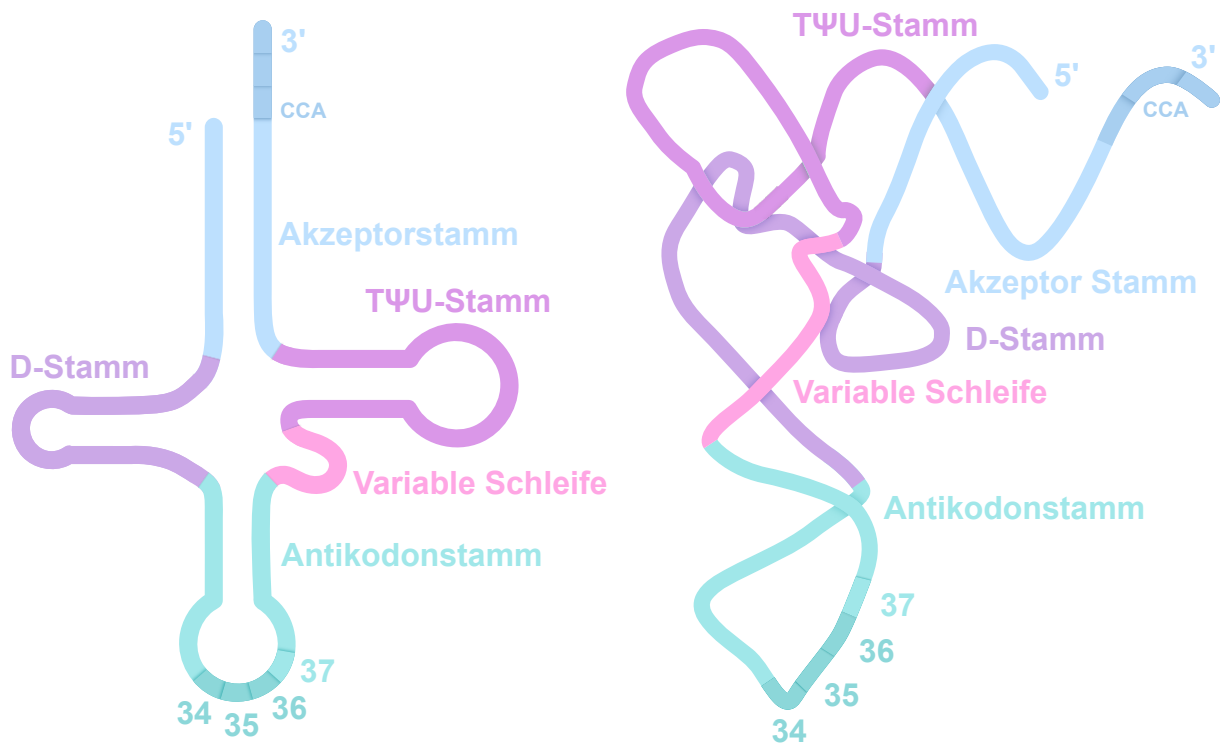


Abbildung 1.5: Links: Die generalisierte Sekundärstruktur der tRNA. **Rechts:** Eine schematische Darstellung der tRNA Tertiärstruktur. Beide Abbildungen wurden basierend auf Abbildungen in der Literatur erstellt.^{108,109}

dem Queuosin.^{101,113} Eine Modifikation an Position 34 kann die Anzahl der ablesbaren Kodons beschränken oder erweitern.¹⁰² Die Base Uridin ist ein gutes Beispiel, wie über die Modifikation der Base selbst, aber auch durch Modifikationen in unmittelbarer Nähe, die Spezifität einer tRNA reguliert werden kann. Die Leucin tRNAs von *E.coli* und *S.cerevisiae* sind mit $\text{cmnm}^5\text{U}_{\text{m}34}$ bzw. $\text{ncm}^5\text{U}_{\text{m}34}$ modifiziert. Diese schränken die Flexibilität der Position 34 ein.^{114,115} Die modifizierte tRNA^{Leu} in *E.coli* kann dadurch nur die beiden Leucin-Kodons UUA und UUG dekodieren, nicht aber die Phenylalanin-Kodons UUU und UUC.¹¹⁴ Die tRNA^{Leu} von *S.cerevisiae* kann sogar nur noch das Leucin-Kodon UUA lesen.¹¹⁵ Einige tRNAs mit einem unmodifizierten Uridin₃₄ können alle vier Basen an der dritten Stelle des jeweiligen Kodons entschlüsseln.^{116,117} Dadurch werden weniger tRNA-Isoakzeptoren benötigt, um alle Kodons zu lesen, was jedoch zu Lasten der Translationseffizienz geht.¹¹⁶

Die Position 37 ist eine semi-invariante Stelle an der ausschließlich Purin-Basen vorkom-

men welche häufig modifiziert sind. Diese Veränderungen des Puringerüsts können mitunter so weiterreichend sein, dass sie als Hypermodifikation bezeichnet werden.^{101,102,110} Modifikationen, die neben anderen an der Position 37 vorkommen, sind das Wybutosin, ms^2i^6A und t^6A . Ersteres ist ein Guanosin- und letztere Adeninderivate.^{11,118–126} Modifikationen an dieser Position unterbinden beispielsweise Interaktionen zwischen den sich gegenüberliegenden N_{33} und N_{37} , wodurch die Schleife nicht verjüngt wird, sondern die für tRNAs typische U-Wende annimmt.^{30,127–130} Des Weiteren können sie durch zusätzliche Basenstapelungseffekte mit der ersten Base des Kodontripletts die Kodon-Antikodon-Interaktion stabilisieren.^{127,128}

1.5 Thiomethylierte Adenosinderivate

Eine für die tRNA wichtige Gruppe der RNA-Modifikation, ist die der thiomethylierten Adenosine (Abb. 1.6).^{11,118,119,131–133} In der tRNA kommen sie ausschließlich an der Position 37 vor.^{11,126} 2-Methylthioadenosin (ms^2A) wurde in tRNA nachgewiesen, jedoch ohne weitere Hinweise auf die genaue Position.^{131,134}

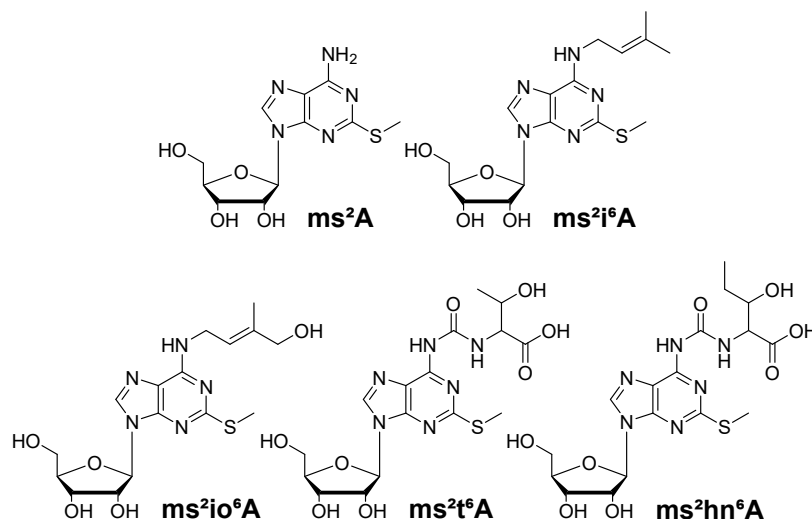


Abbildung 1.6: Gruppe der ms^2A -Modifikationen.

Die Gruppe der thiomethylierten Adenosine sind alle an der zweiten Position Thiomethyliert und bis auf ms^2A , am exozyklischen Stickstoffatom an Position sechs zusätzlich derivatisiert. Zunächst wurde ms^2A ausschließlich in Prokaryoten nachgewiesen.^{131,134} Kellner hat 2014 gezeigt, dass die Modifikation auch im Schwein und im Menschen vorkommt.¹³⁵

ms^2i^6A ist in Eukaryoten auf mitochondriale tRNAs beschränkt.^{126,136} Somit sind alle Mitglieder dieser Gruppe, bis auf ms^2io^6A ^{133,137} und ms^2hn^6A ,¹³² sowohl in Pro- als auch Eukaryoten zu finden.^{126,138,139}

1.5.1 Biosynthese von 2-Methylthio- N^6 -isopentenyl-adenosin

Bei der Darstellung von ms^2i^6A , wird zunächst i^6A aus Adenosin gebildet. Die Isopentenylgruppe wird durch MiaA (*Methylthio-isopentenyladenosine synthesis enzyme A*) übertragen, als Kosubstrat für diese Reaktion dient das Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP).^{140,141} In dem darauffolgenden Schritt wird i^6A durch das MiaB (*Methylthio-isopentenyladenosine synthesis enzyme B*) an der zweiten Position thiomethyliert. Bei MiaB handelt es sich um ein Radikal-SAM-Enzym, welches über zwei [4Fe-4S]-Cluster verfügt.^{139,142–145} Die humanen Analoga zu MiaA und MiaB sind Trit1 (*tRNA isopentenytransferase 1*, in der Publikation IPT)¹⁴⁶ und CDK5RAP1 (*CDK5 regulatory subunit-associated protein 1*).^{137,147,148}

1.5.2 Biosynthese von 2-Methylthioadenosin

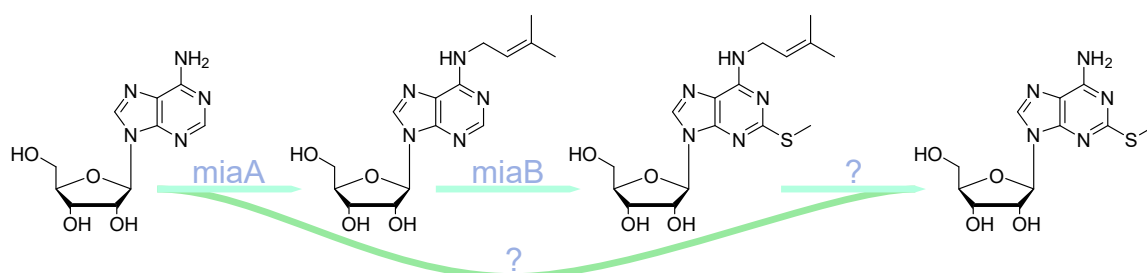


Abbildung 1.7: Möglicher Syntheseweg von ms^2A . **Oben:** Indirekter Weg über i^6A und ms^2i^6A . **Unten:** Direkter Weg aus Adenosin.

Die Biosynthese von ms^2A ist nicht untersucht. Prinzipiell ist eine direkte Darstellung aus Adenosin oder ein indirekter Weg über ein anderes thiomethyliertes Derivat denkbar.¹⁴⁹ *E.coli* verfügt lediglich über ms^2i^6A , wodurch die in Abb. 1.7 dargestellten Wege in Frage kommen.^{11,138} Pierrel konnte beobachten, dass ohne MiaA weder i^6A noch, ms^2i^6A vorhanden sind.¹³⁹ Jedoch wurde nicht untersucht, ob ms^2A zu sehen ist. Vold war in der Lage, ms^2A sowohl in einem Wildtyp *E.coli*, als auch in einem MiaA (in dieser Studie als *trpX* bezeichnet) defizienten Stamm nachzuweisen.¹³¹ Allerdings lag der gemessene Durchschnittswert im defizienten Stamm bei 0,042 und die Standardabweichung bei 0,052,

sodass das Vorhandensein in diesem Stamm in Frage gestellt werden sollte. *Anton* berichtet, dass ohne MiaA kein ms²A vorhanden ist.¹⁵⁰ Jedoch macht er nicht klar, ob diese Beobachtung aus dieser Veröffentlichung hervorgeht oder aus anderen Studien, weshalb diese Aussage skeptisch zu betrachten ist. Der Ursprung von ms²A wird also bis heute kontrovers diskutiert und ist nicht untersucht. In einer 1975 veröffentlichten Studie von *McLennan* konnte eine enzymatische Aktivität beobachtet werden, welche in der Lage ist, die Isopentenylgruppe des in tRNA eingebauten i⁶As zu entfernen. Diese Aktivität wurde in einem Extrakt aus Rinderleber beobachtet,¹⁵¹ doch das Enzym konnte bis heute nicht identifiziert werden. Jedoch zeigt die beobachtete enzymatische Aktivität am i⁶A, dass eine Entfernung der Prenylgruppe am ms²i⁶A prinzipiell denkbar wäre.

1.6 Queuosin

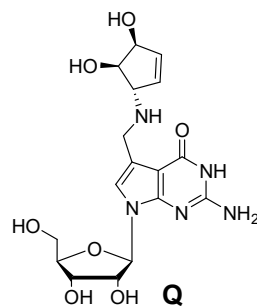


Abbildung 1.8: Struktur von Queuosin.

Queuosin (Q) gehört mit seiner stark modifizierten Struktur, welche auf der kanonischen Base Guanin basiert, ebenfalls zu der Gruppe der Hypermodifikationen.¹⁰¹ Es kommt ausschließlich an der Wobble Position (34) von tRNAs mit einem GUN-Antikodon vor.¹¹³ Zu dieser Gruppe gehören die tRNAs, welche Asparagin (Asn), Asparaginsäure (Asp), Histidin (His) und Tyrosin (Tyr) dekodieren.¹¹³ Queuosin kommt sowohl in den meisten Prokaryoten als auch Eukaryoten vor.^{103,126,152–154} Bemerkenswerterweise kann es jedoch nur von ersteren *de novo* synthetisiert werden.^{155,156} Eukaryoten sind darauf angewiesen die Base über ihre Nahrung^{156,157} und das Mikrobiom¹⁵⁵ aufzunehmen, weshalb man Queuosin als Vitamin betrachten kann.¹⁵⁸

Nach der Entdeckung von Queuosin 1968 und 1969 in *E. coli*,^{113,159–161} konnte die Struktur 1975 aufgeklärt werden (Abb. 1.8).¹⁶² Bei Queuosin handelt es sich um ein 7-Deazagua-

nosinderivat, welches über eine Aminomethylgruppe an der C7-Position mit einem Cyclopentendioldderivat verbunden ist.

1.6.1 Queuosin-Derivate

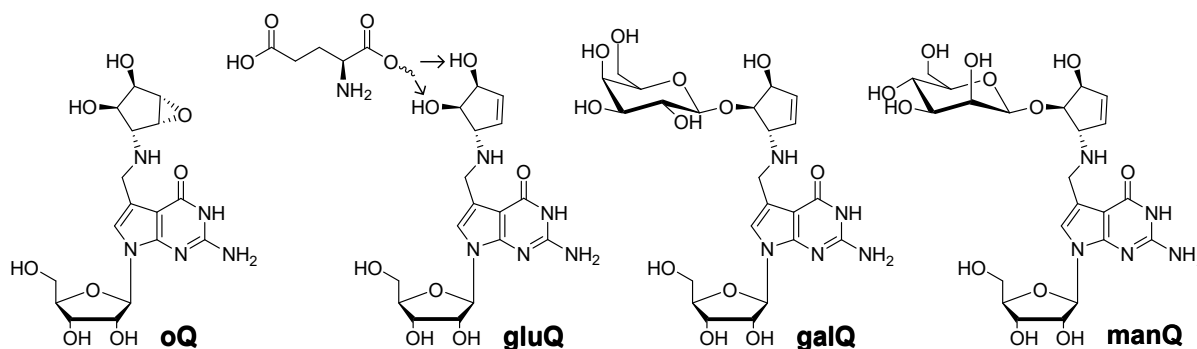


Abbildung 1.9: Struktur der Queuosinderivate.

Queuosin kann im Organismus weiter modifiziert werden. Bisher sind vier Queuosinderivate in der Literatur beschrieben. Während β -Galaktosyl- (galQ) und Mannosyl-Queuosin (manQ) ausschließlich eukaryotische Modifikationen sind,^{152,163} wurden das Epoxy-Queuosin (oQ) und Glutamyl-Queuosin (gluQ) bisher nur in Prokaryoten beschrieben.^{164,165} Die Derivate sind, genau wie Queuosin, strikt an eine definierte tRNA gebunden. Das oQ wurde durch *Phillipson* in der tRNA^{Tyr} von *E.coli* beschrieben.¹⁶⁴ Es ist der direkte Vorläufer des Qs in der *de novo* Synthese.^{166,167} Mannosyl- und Glutamyl-Queuosin kommen ausschließlich in der tRNA^{Asp} vor, während β -Galaktosylqueuosin nur in der tRNA^{Tyr} zu finden ist.^{152,163,168} Die Derivatisierung des Queuosins kann über eine der beiden Hydroxygruppen im Cyclopentendiolderivat stattfinden. In *E.coli* wird das Queuosin mit einem Glutamylrest verestert. Welche der beiden Hydroxygruppen in dieser Reaktion verestert wird, ist jedoch nicht bekannt. Die Modifikation wurde erstmals 2004 durch *Salazar* beschrieben. Die späte Entdeckung mag auch dem Fakt geschuldet sein, dass die Veresterung alkalilabil ist,¹⁶⁵ sodass die Bindung bei der Isolation schnell gespalten werden kann.

Bei der Glykosylierung von Queuosin mit Mannose und Galaktose in Eukaryoten gibt es theoretisch ebenfalls die Möglichkeit entweder die homoallylische oder die allylische Hydroxygruppe zu glykosylieren. Darüber hinaus können die Hexosen über eine α - oder

β -glykosidische Bindung mit Queuosin verknüpft werden, wodurch sich vier Möglichkeiten für jedes Monosaccharid ergeben. *Kasai* hat in einer Veröffentlichung von 1976 postuliert, dass sowohl die Galaktose als auch die Mannose über eine β -glykosidische Bindung mit der homoallylischen Hydroxygruppe des Queuosins verknüpft sein müssen.¹⁶³ Diese Strukturen konnten in der Dissertation von *Thumbs* nur für das β -Galaktosyl-Queuosin bestätigt werden. Die Struktur von β -Mannosyl-Queuosin wurde hingegen von ihm falsifiziert.¹⁶⁹

Ott beschreibt ein weiteres Queuosin-Derivat (Q^n) in der tRNA^{ASP} von *Dictyostelium discoideum*. Der Ankündigung, dass es eine Folgeveröffentlichung geben würde, welches die Identität von Q^n aufklärt, ist jedoch keine Publikation gefolgt. Somit ist nicht klar, ob es sich tatsächlich um ein neues Queuosin-Derivat handelt, oder möglicherweise doch um manQ.¹⁷⁰

1.6.2 De novo Biosynthese

Seit der Entdeckung von *QueG* 2011 sind alle Enzyme des Biosynthese-Wegs von Queuosin bekannt.¹⁶⁶ In einem achtstufigen Prozess wird Guanosintriphosphat (GTP) zu Queuosin umgewandelt und während dessen in die jeweilige tRNA eingebaut.

Im ersten Schritt wird das GTP von der *GTP-Cyclohydrolase I* zu Dihydroneopterintriphosphat (H_2NTP) umgesetzt.¹⁷² H_2NTP ist nicht nur das Edukt für die weitere Queuosin-Synthese, sondern auch für den Folat-, sowie den Biopterin-Stoffwechsel.¹⁷² Durch drei weitere enzymatische Schritte wird das H_2NTP zu PreQ₀ metabolisiert,^{173–175} einem gemeinsamen Vorläufermolekül für die Archaeosin-Synthese in Archaea.¹⁷⁶ Durch eine NADPH-abhängige Reduktion wird die Nitrilgruppe des PreQ₀ zum Amin reduziert.^{173,177} Das daraus hervorgehende PreQ₁ dient als Substrat für die bakterielle *Queuine tRNA-ribosyltransferase* (bTGT). Diese tauscht das Guanin an der Position 34 der tRNA^{Asn, His, Asp, Tyr} gegen das PreQ₁ aus.^{178–180}

In zwei weiteren tRNA abhängigen Schritten wird der Cyclopentendiolrest angefügt. Zunächst katalysiert QueA die Übertragung der Ribose des S-Adenosylmethionin (SAM) auf das PreQ₁.^{181,182} Das daraus hervorgehende Epoxyqueuosin (oQ) wird in einem finalen Cobalamin-abhängigen Schritt durch QueG zu Queuosin reduziert.¹⁶⁶ Durch eine vergleichende genomische Analyse wurde 2017 eine weitere Epoxyreduktase (QueH) gefunden, welche Cobalamin unabhängig und zu QueG nicht ortholog ist. Die Studie hat gezeigt, dass

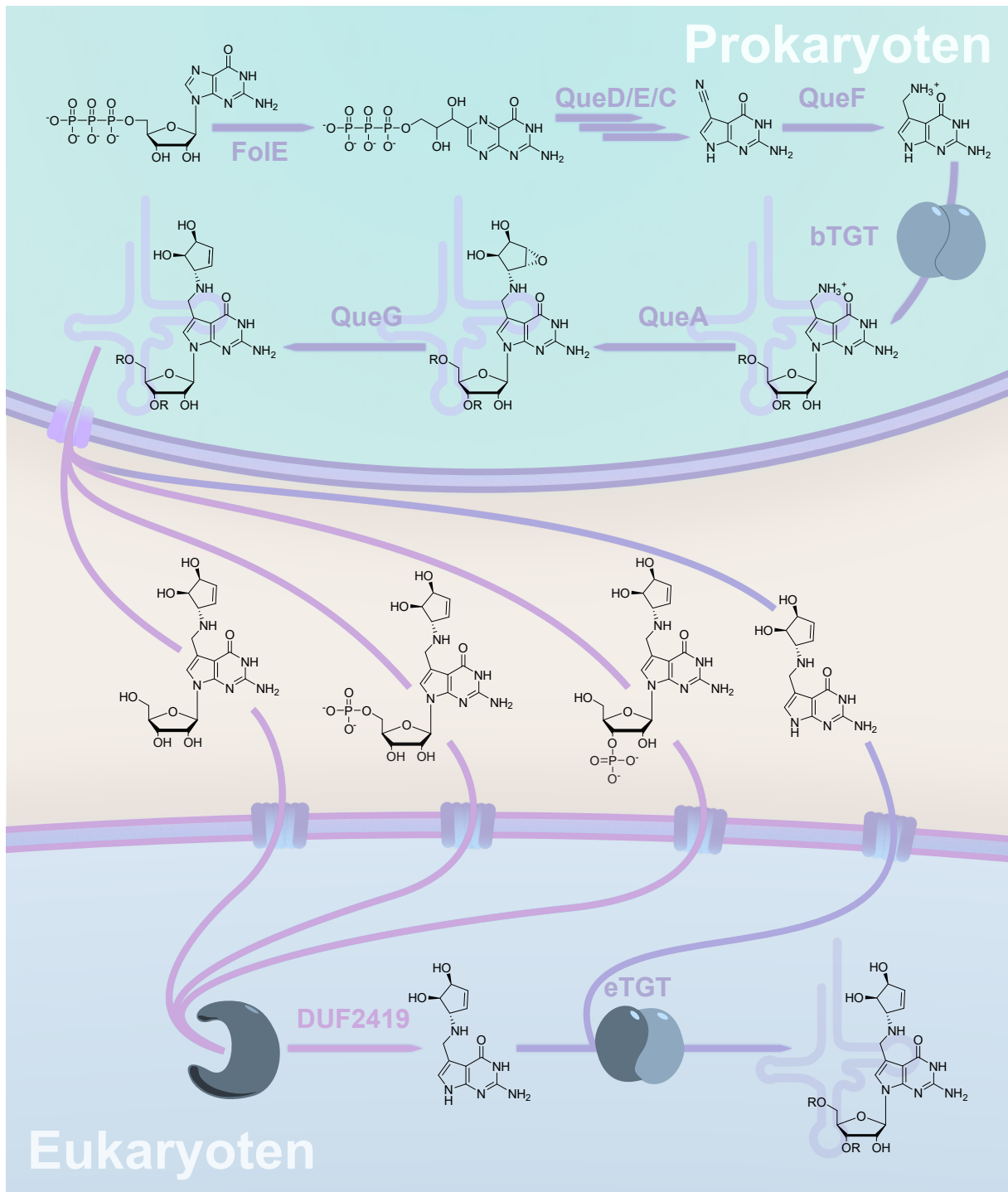


Abbildung 1.10: **Oben:** Verkürzt dargestellte *de novo* Synthese in Prokaryoten. **Mitte:** Mögliche Substrate welche von Eukaryoten in die Zelle transportiert werden. Zellkulturexperimente haben gezeigt, dass Zellen in der Lage sind die freie Base Queuine aufzunehmen. **Unten:** Bisher bekannter Weg in Eukaryoten. Transporter sind nicht bekannt. Die Rolle von DUF2412 ist vermutet,¹⁷¹ aber nicht experimentell bestätigt. Wege die theoretisch möglich sind, aber Experimentell nicht gezeigt wurden sind in hellem violett gehalten.

somit wesentlich mehr Prokaryoten über einen vollständigen Queuosin-Biosyntheseweg verfügen, als vorher angenommen.¹⁶⁷

In *E. coli* wird das Queuosin der tRNA^{Asp} mit einem Glutamylrest verestert. Diese Veresterung wird durch die Glutamyl-Queuosin-tRNA^{Asp}-synthetase (Glu-Q-RS), einem verkürzten Paralog der Glutamyl-tRNA-synthetase (GluRS), katalysiert. Diese verkürzte Variante hat mit K_M 7,5 mM eine wesentlich geringe Affinität zu Glutaminsäure als sein Paralog (K_M 0,66 mM). *Salazar* spekuliert, dass die Veresterung nur bei hohen Glutaminsäurekonzentrationen stattfindet und nicht strikt notwendig ist.¹⁶⁵

1.6.3 Queuosin in Eukaryoten

Der Stoffwechselweg in Eukaryoten ist, anders als in Prokaryoten, nicht vollständig aufgeklärt. Zellkulturexperimente zeigen, dass der Modifizierungsgrad der tRNA^{His} durch zugesetztes Queuine im Medium gesteigert werden kann.¹⁸³ Theoretisch ist aber auch die Aufnahme in Form von freiem Queuosin, Queuosin-5'-phosphat bzw. Queuosin-3'-phosphat möglich. Ein klarer experimenteller Beweis für die Aufnahme dieser drei Substrate fehlt allerdings. 2014 wurde mit DUF2419 in *Schizosaccharomyces pombe*, ein weiteres Enzym gefunden, welches auf eine bisher nicht geklärte Weise in den eukaryotischen Queuosin-Stoffwechsel involviert ist.^{171,184} Eine Homologie basierte Modellierung lässt vermuten, dass es sich um eine Ribonukleosidhydrolase handeln könnte.¹⁷¹ Diese Einordnung stützt sich allerdings ausschließlich, auf diese Modellierung und bedarf einer experimentellen Untersuchung.

Queuine tRNA-ribosyltransferase: Bereits Anfang der Siebzigerjahre konnte eine Aktivität beobachtet werden, welche auf eine eukaryotische *Queuine tRNA-ribosyltransferase* (eTGT) schließen lässt.^{185,186} Die zwei Enzyme, welche für die Aktivität notwendig sind, wurden jedoch erst 2009 identifiziert.¹⁸⁷ Es handelt sich um eine katalytisch aktive (QTRT1, *Queuine tRNA-ribosyltransferase catalytic subunit 1*) und eine inaktive (QTRT2) Untereinheit. Die beiden Enzyme bilden ein Heterodimer, welches dann Queuin in die tRNA einbaut. Damit unterscheidet sie sich von der bTGT. Diese bildet ein Homodimer um Queuin in die tRNA einzubauen.¹⁸⁸ Sowohl bei der bakteriellen als auch bei der eukaryotischen Variante konnte gezeigt werden, dass das Dimer für die enzymatische Aktivität

notwendig ist.^{187,188} Obwohl bei der bTGT beide Untereinheiten aktiv sind, wird dennoch nur eine tRNA pro Zyklus mit Queuosin modifiziert.¹⁸⁸ Über einen Inhibitor konnte bei der bTGT eine um 130° verdrehte Konformation erzeugt werden, welche zu der Inaktivität des Enzyms führt.¹⁸⁹ *Ehrmann* vermutet, dass die bTGT auch ohne einen Inhibitor über eine aktive und inaktive Konformation in ihrer Aktivität reguliert werden könnte.¹⁸⁹ Über zwei Punktmutationen (Cys158Gly und Val233Gly) kann die Bindungstasche der bTGT von *Zymomonas mobilis* vergrößert werden, sodass das Enzym Queuin binden kann. Allerdings ist die mutierte Variante nicht in der Lage Queuin in eine tRNA einzubauen.¹⁹⁰

Die Lokalisation der eTGT in der Zelle scheint vom jeweiligen Organismus abhängig zu sein. Während sie in Affennierenzellen (COS-7) mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert ist,¹⁸⁷ ist sie in *Trypanosoma brucei* ausschließlich im Nukleus lokalisiert.¹⁹¹ Dies erfordert einen Reimport der tRNA^{Tyr} in den Nukleus, um mit Queuosin modifiziert zu werden.¹⁹¹ Studien mit keimfreien Mäusen haben gezeigt, dass die tRNA^{Asp} im Vergleich mit der tRNA^{His} schneller mit Queuosin modifiziert wird. Wodurch diese Substratdiskriminierung stattfindet, oder ob die eTGT daran beteiligt ist, ist nicht untersucht.¹⁵⁶ Mikroinjektionsstudien haben gezeigt, dass die Positionen 36, 37 und 38 sowohl einen Einfluss auf die Modifikation mit Queuosin als auch dessen Glykosylierung zu Galaktosyl- bzw. Mannosyl-Queuosin haben.¹⁹²

Glykosyltransferasen: Anders als bei gluQ in *E. coli* sind die Enzyme, welche das Queuosin zu Galaktosyl- bzw. Mannosylqueuosin glykosylieren, nicht bekannt. Jedoch konnte *Okada* 1977 eine enzymatische Aktivität in Rattenleberlysats beobachten, welche in der Lage war, das Queuosin der tRNA^{Asp} aus *E. coli* zu mannolysieren. Aus dieser Studie lässt sich schließen, dass es sich um ein magnesiumabhängiges Enzym handelt, welches Guanosindiphosphat (GDP) aktivierte Mannose verwendet, um das Queuosin zu mannosylieren. Eine Reinigung des Lysats über eine DEAE²-Säule war für die beobachtete Aktivität zwingend notwendig. Des Weiteren konnte klar gezeigt werden, dass die Mannosylierung ausschließlich an der tRNA^{Asp} und an keinem der anderen drei tRNAs stattfindet.¹⁹³

1.6.4 Biologische Funktion

Amber-Kodon Unterdrückung: Das Amber Stoppkodon (UAG) kann von tRNA^{Tyr}, die an Position 35 ein Ψ tragen, als Tyrosinkodon gelesen werden.¹⁹⁴ Dabei ist es wichtig, ob

²2-Diethylaminoethanol

das Antikodon der tRNA mit Queuosin modifiziert ist. Während die tRNA mit dem GΨA-Antikodon das Amber Stoppkodon als Tyrosin abliest, ist dies mit dem QΨA-Antikodon nicht der Fall.^{195,196} Durch das Ψ kommt es zu einer stärkeren Kodon-Antikodon-Wechselwirkung. Hierdurch wird eine nicht favorisierte G:G_{syn}-Basenpaarung ermöglicht. Die N-glykosidische Bindung des G₃₄ rotiert bei einer solchen Basenpaarung von der *anti*- in die *syn*-Konformation. Eine solche Basenpaarung wird bei Queuosin durch den Cyclopentendiolrest unterbunden. Unmodifizierte tRNA^{Tyr} ohne Ψ und Queuosin sind nicht in der Lage das Amber-Kodon zu unterdrücken. *Zerfass* spekuliert, dass die Unterdrückung auf eine stärkere Ψ:A-Interaktion im Vergleich zu U zurückgeht.¹⁹⁴ Andere Publikationen konnten in der Tat zeigen, dass Ψ einen stabilisierenden Effekt auf RNA-Doppelstränge hat. Diese gehen vermutlich auf verbesserte Basenstapelungseffekte zurück, die durch Ψ ermöglicht werden.^{197,198} *Davis* vermutet dass dies auch die Kodon-Antikodon-Interaktion stabilisiert.¹⁹⁷

Stabilisierung der tRNA: In mehreren Organismen konnten Stabilisierungseffekte für Queuosin und seine Derivate gezeigt werden. Wenn *Dictyostelium discoideum* unter Q-freien Bedingungen wächst, sind die Level an tRNA^{Asp,Tyr}, im Vergleich zu Q-haltigen Kultivierungsbedingungen halbiert. Die tRNA^{Asn,His}-Level blieben unter dessen gleich. Wurde die RNA-Synthese jedoch mit Actinomycin C gestoppt, konnten unterschiedliche Effekte beobachtet werden, welche eine weitere Differenzierung zwischen Queuosin und seinen Derivaten zulassen. Unter Q-freien Kultivierungsbedingungen nahmen die tRNA-Level aller Q-tRNAs ab. Unter Q-haltigen Bedingungen nahmen jedoch nur die Level der tRNA^{Asn,His} ab, während die tRNA^{Asp,Tyr}-Level konstant blieben.¹⁷⁰

In keimfreien Mäusen, welche vier Wochen lang mit Q-freier Nahrung gefüttert wurden, konnten ebenfalls unterschiedliche Effekte für Queuosin und seine Derivate beobachtet werden. So fielen die Queuosin-Level in tRNA^{Asn,His}, während die tRNA^{Asp,Tyr}-Modifikationslevel unverändert blieben.¹⁵⁵ Keimfreie Mäuse, welche ein Jahr lang mit Q-freier Nahrung gefüttert wurden, hatten ausschließlich queuosinfreie tRNA. An diesen Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Queuosinlevel in tRNA^{Asp}, welche üblicherweise manQ trägt schneller wieder ansteigt, als in tRNA^{His}, sobald diese wieder Q-haltige Nahrung bekommen.¹⁵⁶

Die tRNA^{Asp} ist neben dem Queuosin an Position 34 (Q₃₄) auch mit einem 5-Methylcytidin an der Position 38 (m⁵C₃₈) modifiziert. Die Methylierung wird durch Dnmt2 (*tRNA*

(*cytosine(38)-C(5)-methyltransferase*) katalysiert.¹⁹⁹ Der Methylierungsgrad hängt direkt mit Q₃₄ zusammen. In *Schizosaccharomyces pombe* liegt der Modifikationsgrad von m⁵C₃₈ mit Q₃₄ bei 96 % und ohne Q₃₄ bei 18 %.²⁰⁰ *In vitro* Versuche haben gezeigt, dass bereits das Queuosin ausreicht, um die katalytische Effizienz von Dnmt2 zu steigern. Computerbasierte Modellierungen zeigen, dass Dnmt2 direkt mit Queuosin interagieren könnte, jedoch nicht nah genug am aktiven Zentrum sitzt, um die Methylierung direkt zu beeinflussen.²⁰¹ m⁵C₃₈ stabilisiert die tRNA, indem es sie vor einem stress-induzierten Abbau durch die Angiogenin RNase schützt.²⁰² In einer Studie, bei der die beiden Methyltransferasen Dnmt2 und Nsun2 ausgeschaltet wurden, konnte ein verringertes tRNA^{ASP}-Level beobachtet werden.²⁰³

Äquilibrierung der Translationsgeschwindigkeit: Die Aminosäuren Asparagin, Asparaginsäure, Histidin und Tyrosin werden durch zwei verschiedene Kodons kodiert und in den meisten Organismen lediglich durch eine tRNA oder einen tRNA-Isodekoder dekodiert.^{11,204–207} Die Kodons dieser Aminosäuren enden entweder auf Cytidin (C-Kodon) oder Uridin (U-Kodon). Diese Position paart beim Translationsprozess mit der Wobble Position (34) der tRNA, welche Q-modifiziert sein kann. Es wird angenommen, dass Queuosin einen äquilibrierenden Effekt auf die Translationsgeschwindigkeit der Kodons hat.^{183,206}

Bei eingehenden Untersuchungen mit verschiedenen Organismen hat sich ein heterogenes Bild gezeigt. In einer Studie mit HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Translationsgeschwindigkeit aller Kodons die durch Q-tRNAs dekodiert werden abnimmt, wenn diese nicht mit Queuosin modifiziert sind. Die U-Kodons waren von diesem Effekt stärker betroffen als die C-Kodons. Lediglich bei der tRNA^{ASP} wurde das C-Kodon durch die Abwesenheit von Queuosin stärker beeinträchtigt als das U-Kodon.¹⁸³ In einer Studie mit *Schizosaccharomyces pombe* hat sich ebenfalls ein queuosinabhängiger Einfluss auf die Translationsgeschwindigkeit gezeigt. Jedoch sind die Auswirkungen hier wesentlich heterogener. Queuosin reduziert die Translationsgeschwindigkeit der U-Kodons für tRNA^{Asn,Tyr} und beschleunigt die Translationsgeschwindigkeit der C-Kodons für ^{Asp,His}. Die Geschwindigkeit der Translation für die übrigen vier Kodons werden durch Queuosin nicht beeinflusst.²⁰⁶ Meier konnte über die Mikroinjektion von der tRNA^{His} aus *Drosophila melongaster* in *Xenopus* Oozyten zeigen, dass Queuosin sich auch auf Bindungspräferenzen auswirkt. Queuosinmodifizierte tRNA translatierte leicht bevorzugt das U-Kodon, während unmodifizierte tRNA das C-Kodon leicht präferiert las.²⁰⁸

Abhängigkeit der Queuosinlevel vom Alter: *Zaborske* konnte für verschiedene *Drosophila*-Spezies zeigen, dass der Modifikationsgrad der tRNAs mit Queuosin zum einen von Spezies zu Spezies variiert und zum anderen in der Abhängigkeit zum Alter. So sind die Queuosin-Werte in der embryonalen und adulten Phase höher als im dritten Larvenstadium.²⁰⁹ Auch in *Dictyostelium discoideum* variieren die Queuosin-Modifikationslevel abhängig von der Entwicklungsphase.²¹⁰

Tyrosinstoffwechsel: Säugetiere sind in der Lage aus der essentiellen Aminosäure Phenylalanin, Tyrosin darzustellen. Diese Reaktion wird von der Tetrahydrobiopterin (BH4) abhängigen Phenylalanin Hydroxylase (PAH) katalysiert.^{211–215} In einer Studie von 1997 konnte gezeigt werden, dass eine tyrosin- und queuinfreie Diät, welche Phenylalanin enthält, für keimfreie Mäuse letal ist. Die letalen Folgen konnten jedoch durch die Zugabe von Queuin in die Nahrung abgewendet werden. Darüber hinaus konnten auch alle vorher beobachteten Symptome wie ein torkelnder Gang, die erschwerte Atmung und Krampfanfälle durch die Gabe kuriert werden.²¹⁶ Eine andere Studie von 2011 hat Mäuse mit einem intakten Mikrobiom aber fehlender eTGT untersucht. Hier hat sich gezeigt, dass deren Fähigkeit zur Tyrosinbiosynthese beeinträchtigt ist. Eine tyrosinfreie Diät zeigt jedoch keine der 1997 beobachteten Symptomatiken und ist nicht letal. Im Vergleich mit Wildtypmäusen hat sich jedoch gezeigt, dass die Tetrahydrobiopterin- (BH4) und Dihydrobiopterin-Werte (BH2) verändert waren.²¹⁷ Im Vergleich mit Wildtypmäusen ergab sich, dass die BH4-Werte im Blutplasma niedriger waren und die BH2-Werte erhöht. Darüber hinaus waren die BH2-Werte im Urin dieser Mäuse ebenfalls erhöht.²¹⁷ Aus vorhergehenden Studien ist bereits bekannt, dass Queuosin sich positiv auf die Aktivität von verschiedenen antioxidativen Enzymen auswirkt.²¹⁸ Die dahinter stehenden Mechanismen sind unbekannt.

1.7 Aufgabenstellung

1.7.1 Studie zur Substratspezifität von ALKBH5

Das *Eraser*-Enzym FTO ist in der Lage neben m^6A , ein breites Spektrum an Substraten zu akzeptieren und zu demethylieren. Gleiches konnte für das zweite m^6A *Eraser*-Enzym ALKBH5 nicht gezeigt werden. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob ALKBH5 in der Lage ist, die Methylgruppen des strukturell ähnlichen m_2^6A 's teilweise oder vollständig zu entfernen. Dies sollte mit Hilfe von vier verschiedenen RNA-Einzelsträngen untersucht werden. In diesen vier Einzelsträngen war die jeweilige RNA-Modifikation in eine Konsensussequenz der m^6A - und in die Konsensussequenz m_2^6A -Modifikation eingebunden. Bei der Demethylierung von m^6A durch ALKBH5 konnte bisher, im Unterschied zu FTO, keine hydroxymethylierte Variante des m^6A 's beobachtet werden. Somit stellt sich die Frage, ob dies für ALKBH5₆₆₋₂₉₂ (katalytisch aktive, kürzere Variante) bei einem anderen Substrat zutrifft. Sofern ALKBH5₆₆₋₂₉₂ in der Lage ist die Methylgruppen des m_2^6A 's zu entfernen, sollte untersucht werden, in wie fern dies eine biologische Relevanz haben könnte. Hierfür sollten *in vitro* Versuche mit ribosomaler RNA und intakten Ribosomen durchgeführt werden.

1.7.2 Biosyntheseweg von 2-Methylthioadenosin

Der Biosyntheseweg von ms^2A wurde bisher in keiner Studie eingehender untersucht. Bisherige Veröffentlichungen haben gezeigt, dass die Modifikation in bakterieller tRNA zu finden ist und auch in Eukaryoten vorkommt. Arbeiten zu ms^2i^6A haben offen gelassen, ob MiaB strikt auf i^6A angewiesen ist, oder Adenosin direkt durch MiaB thiomethyliert werden kann. In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob Adenosin direkt durch MiaB oder andere Enzyme thiomethyliert werden kann. Hierfür sollte die RNA des *E.coli* $\Delta miaA$ Stammes untersucht werden. In diesem fehlt das Biosyntheseenzym MiaA für i^6A . Darüber hinaus sollte geklärt werden ob ms^2A aus ms^2i^6A dargestellt wird, indem bei letzterem die Prenylgruppe entfernt wird. Diese Fragestellung sollte durch die Untersuchung der RNA des *E.coli* $\Delta miaB$ Stammes geklärt werden. Dieser Stamm verfügt nicht mehr über die Thiomethyltransferase MiaB und kann kein ms^2i^6A mehr darstellen.

1.7.3 Queuosin

Struktur von Mannosylqueuosin

Die 1976 durch *Kasai* publizierte Struktur des β -Homo-Allylmannosylqueuosins wurde in der Arbeit von *Thumbs* falsifiziert. Er testete beide Homoallylvarianten des manQs (Abb. 1.11, **A**), doch keine der beiden Standards koeluierte mit der natürlichen Substanz. Zu einer Aufklärung der Struktur kam es in der Dissertation von *Thumbs* nicht. Das Ziel dieser Arbeit war es die Struktur aufzuklären. Da eine Darstellung der beiden Allylmannosylqueuosinstandards (Abb. 1.11, **B**) anspruchsvoll ist, sollte zunächst untersucht werden mit welcher Hexose das vermeintliche β -manQ derivatisiert wird. Hierfür sollten HEK293T-Zellen in verschiedenen Medien kultiviert werden, in welchen isotopenmarkierte Monosaccharide als Kohlenhydratquelle dienen. Anschließend sollte in Zusammenarbeit mit *Mirko Wagner* und *Markus Hillmeier* die genaue Struktur ermittelt werden. Dazu sollten verschiedene Varianten des Queosinderivats durch *Markus Hillmeier* dargestellt werden. Die Koinjektionsversuche derselben mit aus Mäusen isolierter Gesamt-RNA wurde von *Mirko Wagner* durchgeführt.

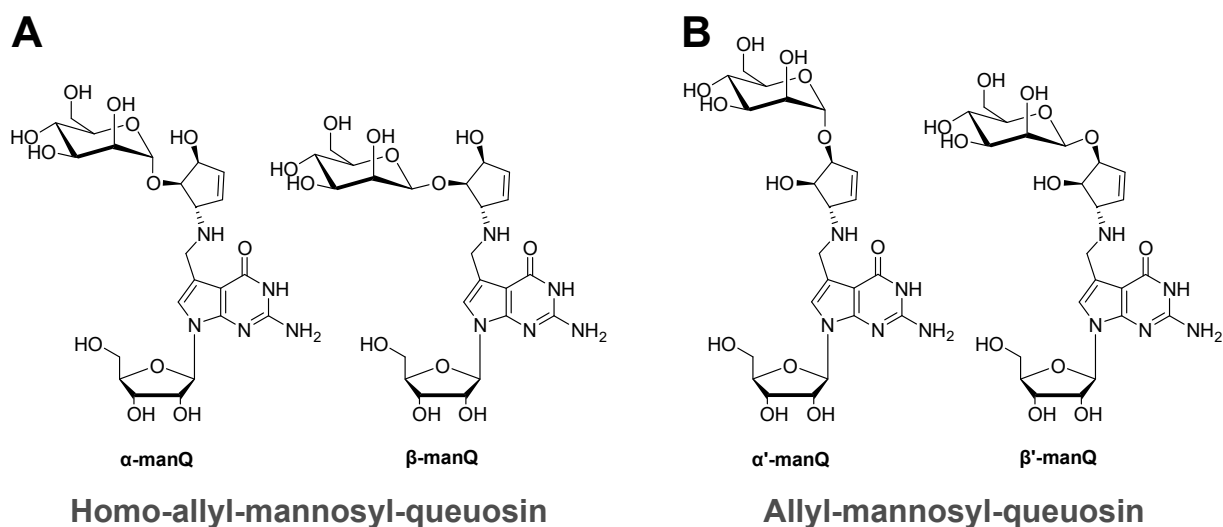


Abbildung 1.11: Abbildung der vermuteten Regio- und Stereoisomere des Mannosylqueuosins. **A** zeigt die beiden Stereoisomere der Homoallylvariante und **B** die der Allylvariante.

Studie zu *tRNA-queuosine- β -mannosyltransferase*

Okada berichtetet in einer Veröffentlichung 1977 eine enzymatische Aktivität welche das Queuosin in der *E.coli* tRNA^{Asp} mannosyliert. Dieses Experiment sollte mit leichten Veränderungen reproduziert werden, um die *tRNA-queuosine- β -mannosyltransferase* zu identifizieren.

Organ- und altersabhängige Queuosinlevel

In diesem Teil der Arbeit sollten die Level von Queuosin und seinen zwei in Eukaryoten vorkommenden Derivaten in sechs verschiedenen Organen quantifiziert werden. Die Quantifizierung erfolgte zu zwei verschiedenen Zeitpunkten. Einen Tag nach der Geburt und drei Monate nach der Geburt im adulten Alter.

2 Ergebnisse und Publikation

2.1 2-Methylthioadenosin

2.1.1 *E.coli* Einzelknockoutstudien

In den Veröffentlichungen von *Vold* und *Anton*, wurde tRNA aus *E.coli* und *Bacillus subtilis* (*B.subtilis*) untersucht. Aus diesen drei Veröffentlichungen geht klar hervor, dass ms²A (Abb. 2.1) eine tRNA-Modifikation ist.^{131,134,150} Der Biosynthese-Weg dieser Modifikation wurde bisher nicht betrachtet. Thiomethylierungen an der C2-Position des Adenosins werden durch die Enzyme MiaB und MtaB eingeführt. *E.coli* verfügt nur über MiaB, während *B.subtilis* über beide Enzyme verfügt.^{138,150} MtaB thiomethyliert das t⁶A zu ms²t⁶A.¹³⁸ Momentan ist nicht geklärt, ob MiaB strikt auf i⁶A als Substrat angewiesen ist oder auch Adenosin thiomethylieren kann. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden die *E.coli* Stämme untersucht, in denen die Enzyme für i⁶A (MiaA) und ms²A (MiaB) jeweils deletiert wurden.^{219,220} Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.2 dargestellt. Die Nukleinsäureanalytik in diesem Kapitel wurde von *Mirko Wagner* durchgeführt.

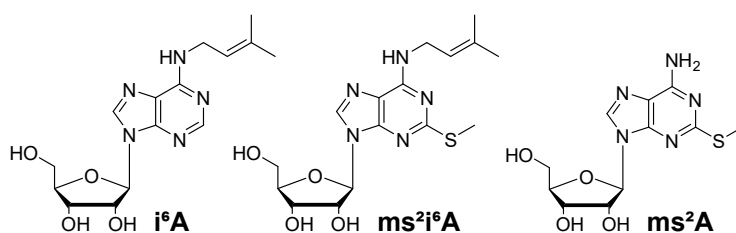


Abbildung 2.1: Strukturformeln von i⁶A, ms²A und ms²i⁶A.

Erwartungsgemäß lässt sich in dem *E.coli* $\Delta miaA$ Stamm weder i⁶A noch ms²i⁶A nachweisen. Hier fehlt mit MiaA die Isopentenyltransferase welche i⁶A darstellt und damit auch der Vorläufer für ms²i⁶A. Im $\Delta miaB$ Stamm ist lediglich die Thiomethyltransferase MiaB ausgeschaltet, weshalb sich i⁶A finden lässt, jedoch kein ms²i⁶A. Bei der Betrachtung von

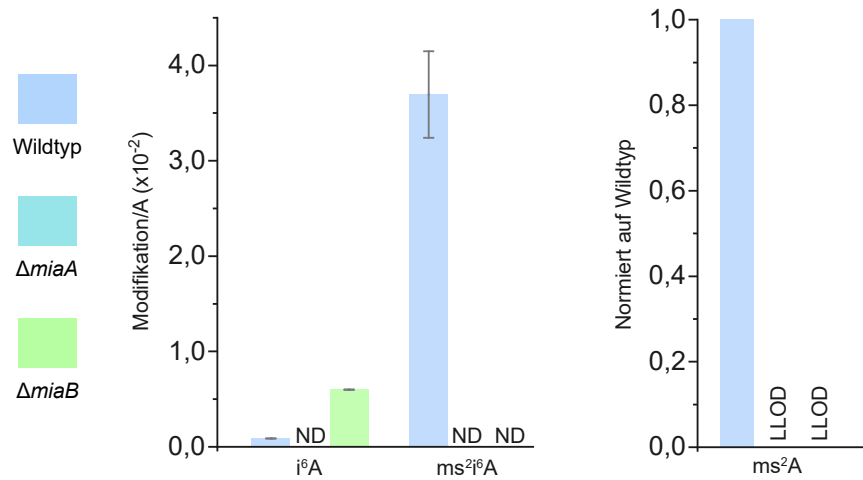


Abbildung 2.2: Massenspektrometrische Messung der i⁶A-, ms²i⁶A- und ms²A-Werte in *E. coli* BW25113 (Wildtypreferenz), $\Delta miaA$ und $\Delta miaB$. Zweimalige Messung einer biologischen Probe durch *Mirko Wagner*. Für die ms²A-Modifikation gibt es keine Kalibrationskurve, weshalb die Werte auf *E. coli* Wildtyp (BW25113) normalisiert wurden. Die ms²A-Werte in den MiaA- und MiaB-Knockout-Stämmen liegen unter dem *lower limit of detection* (LLOD). Nicht detektierte Modifikation sind mit ND (Nicht detektiert) gekennzeichnet.

ms²A zeigt sich, dass dieses lediglich im Wildtyp zu sehen ist. Die ms²A-Werte liegen in beiden Knockout-Stämmen unter dem *lower limit of detection* (LLOD) und konnten nicht mit Sicherheit von Hintergrundrauschen unterschieden werden. Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass MiaB strikt auf i⁶A angewiesen ist und Adenosin als Substrat nicht akzeptiert wird. Gleichzeitig zeigt es, dass der Biosyntheseweg von ms²A, über i⁶A und ms²i⁶A verläuft. Die *de-novo*-Synthese von ms²A könnte über eine oxidative Entfernung der Prenylgruppe des ms²i⁶A's ablaufen.

2.1.2 *E. coli* Multiple Knockouts

Um die mögliche ms²i⁶A-Dealkylase zu identifizieren wurden *E. coli* Stämme untersucht, in denen eine Reihe von Genen gleichzeitig ausgeschaltet sind. Die Stämme wurden über das *National Bioresource Project (NBRP)* erworben und gehen aus einer Arbeit von *Hashimoto*²²¹ hervor. Bei den Stämmen handelt es sich um *E. coli*, in denen sukzessive immer weitere Teile des Genoms über eine Selektionskassette entfernt wurden. Sowohl der Wildtyp als auch die sechzehn mutierten Stämme basieren auf dem *E. coli* Stamm MG1655. Den Knockout-Stämmen fehlen zwischen 2,4 % (*Large Deletion-1*) und 29,7 % (*Large*

Deletion-16) des Genoms.²²¹ Der erste Stamm wird im weiteren Verlauf der Arbeit als LD-1 bezeichnet, der zweite Stamm als LD-16. Um einen Überblick zu bekommen, ob in einem der sechzehn Stämme ein für ms^2A relevantes Gen deletiert wurde, wurde die RNA aus dem Wildtyp Stamm, dem LD-1 und dem LD-16 analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.3 dargestellt.

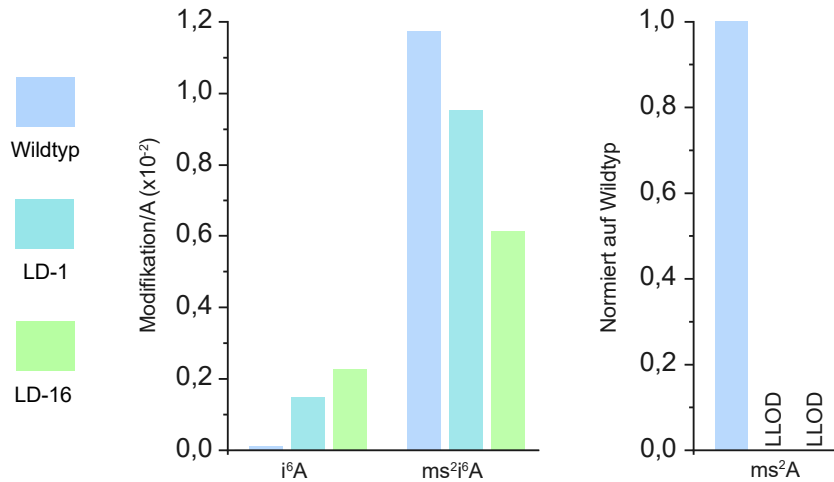


Abbildung 2.3: Massenspektrometrische Messung der i^6A -, ms^2i^6A - und ms^2A -Werte in *E. coli* ME5109 (Wildtyppräferenz), LD-1 (ME5110) und LD-16 (ME5125). Einfache Messung einer biologischen Probe durch *Mirko Wagner*. Für die ms^2A -Modifikation gibt es keine Kalibrationskurve, weshalb die Werte auf den *E. coli* Wildtyp (ME5109) normalisiert wurden.

Bei der Betrachtung fällt sofort auf, dass ms^2A in beiden Knockout-Stämmen fehlt und unter dem LLOD liegt. Somit muss bereits im LD-1-Stamm ein für die ms^2A -Modifikation relevantes Gen ausgeschaltet worden sein. Auch die Level an i^6A und ms^2i^6A verändern sich hier über alle drei Stämme hinweg. i^6A ist im LD-1 im Vergleich zum Wildtyp um das Elfache erhöht. Im LD-16-Stamm setzt sich dieser Trend wesentlich moderater fort.

Die Liste der deletierten Gene ist auf der Datenbank *Profiling of E. coli Chromosome*²²¹ (www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/) einsehbar. Die Analyse ergab, dass MiaA und MiaB in allen Deletionsstämmen vorhanden sind. Insgesamt sind im LD-1-Stamm 99 Gene ausgeschaltet. Die Liste wurde mit der Datenbank *UniProt*⁹³ abgeglichen, wodurch ein möglichst aktueller Datensatz erhalten wurde. Die Genliste ist im Anhang einsehbar. Die Liste wurde auf Enzyme, welche NAD(P)⁺-, Heme-, α -Ketoglutarat abhängig sind bzw. Metal-

tionen als Kofaktoren haben, überprüft. Unter den ausgeschalteten Genprodukten befinden sich mit Ahr, IdnD und IgoD (auch *yjjN* genannt), drei NAD(P)⁺/Zink-abhängige Enzyme.^{93,222–226} IdnO ist ein weiteres NAD(P)⁺-^{93,222} und UxuA ein Fe(II)-abhängiges Enzym.^{93,226–228} Sie alle sind Reduktasen, Dehydratasen oder Dehydrogenasen und kommen für die Dealkylierung von ms²i⁶A zu ms²A nicht in Frage. Dies legt die Vermutung nahe, dass eines der nicht charakterisierten Genprodukte die Dealkylierung katalysiert. Neben der oxidativen Entfernung wäre auch ein radikalischer Dealkylierungsmechanismus denkbar, oder ein Suizidmechanismus bei dem das Protein, durch die Übertragung des Alkylrests auf sich, inaktiviert wird. Das DNA-Reparatur-Protein Ada und das verkürzte Paralog Ogt entfernen Methylierungsschäden, indem sie die Methylgruppe irreversibel auf einen Cysteinrest des Proteins übertragen.^{229,230}

Die ms²i⁶A-Level fallen im LD-1-Stamm im Vergleich zu dem Wildtyp um 20 %. Die Analyse zeigte auch, dass im LD-1-Stamm das *fecABCDE* Operon zusammen mit *fecR* und *fecI* fehlen. Diese Gene kodieren für eines der drei Eisentransportsysteme in *E.coli*.^{231–234} In anderen Studien konnte beobachtet werden, dass i⁶A unter eisenfreien Kultivierungsbedingungen nicht zu ms²i⁶A thiomethyliert wird.^{235–237} Ähnliches ist in diesem Experiment hier auch zu beobachten. Es ist davon auszugehen, dass die ms²i⁶A-Level fallen, da die Eisenaufnahme des LD-1-Stammes teilweise beeinträchtigt ist. Dies ist plausibel, da es sich bei MiaB um ein Eisen-Schwefel-Cluster-Enzym handelt,^{139,142–145} welches direkt von der Eisenverfügbarkeit beeinträchtigt sein dürfte. Da ms²i⁶A das potentielle Substrat für ms²A ist, dürfte das auch einen Effekt auf die ms²A-Level haben. Jedoch kann der vollständig Rückgang von ms²A nicht alleine dadurch erklärt werden. Das bestärkt die These, dass die vermutete ms²i⁶A-Dealkylase im LD-1-Knockout ausgeschaltet wurde.

Im LD-16-Stamm, in welchem rund 29,7 % des Genomes ausgeschaltet sind, sinken die ms²i⁶A-Werte abermals. Die Auswertung ergab, dass hier *fiu* ausgeschaltet ist. Dieses Gen kodiert für einen Catechol-Siderophor-Rezeptor-Protein,^{238,239} welches ein Bestandteil eines anderen Eisentransportsystems von *E.coli* ist.²³³ Dadurch dürfte der Transport und somit die Verfügbarkeit von Eisen in der Zelle stärker beeinträchtigt sein. Allerdings darf zudem der Effekt nicht unterschätzt werden, welcher das Fehlen von 1295 Genprodukten hier auf die Zelle insgesamt hat.

Die Ergebnisse in diesem Projekt unterstützen die These, dass ms²A indirekt über i⁶A und ms²i⁶A dargestellt wird. Die Anzahl der in Frage kommenden Genprodukte konnte

auf unter 99 reduziert werden. Da es sich hier um erste Versuche mit einer biologischen Probe handelt, sollten die Ergebnisse durch weitere Versuche unterstützt werden.

2.2 Queuosin

2.2.1 Isotopenfütterungsstudien

In der Arbeit von *Peter Thumbs* wurde die publizierte Mannosylqueuosin-Struktur,¹⁶³ durch die Koinjektion von verschiedenen Queuosinstandards mit Schweine-Gesamt-RNA, falsifiziert. Vor der anspruchsvollen Darstellung neuer Standards für die Aufklärung der Struktur, sollte deshalb zunächst zweifelsfrei geklärt werden, mit welcher Hexose das vermeintliche Mannosylqueuosin derivatisiert wird. Das natürliche Queuosinderivat wird für ein besseres Verständnis im Folgenden als xQ bezeichnet. Der Datenbank *KEGG* lässt sich entnehmen, dass der Mensch Glukose, Mannose und Galaktose verstoffwechseln kann.^{240–242} Um verfolgen zu können, welche der Hexosen in das Zielmolekül inkorporiert wird, wurden Hexosen-¹³C₆ eingesetzt. Die drei Hexosen sind in einander überführbar und gelangen früher oder später in das Zielmolekül. Deshalb ist das Experimentdesign nicht trivial. Es wurde ein Experiment entworfen, in dem HEK293T-Zellen in einem speziellen RPMI-1640-Medium mit Glukose und einer der anderen Hexosen kultiviert wurden. Dabei wurde eine markierte Hexose und eine weitere mit natürlicher Isotopenverteilung je Medium eingesetzt. Unten sind die eingesetzten Kombinationen angegeben. Im Weiteren wird bei der Beschreibung der Medien, immer auf Galaktose bzw. Mannose Bezug genommen, da in allen Medien Glukose bereitgestellt wird. Das Medium wird als schwer (s-Medium) oder leicht (l-Medium) bezeichnet. Diese Nomenklatur bezieht sich ebenfalls auf die Galaktose bzw. Mannose im Medium.

- s-Gal-Medium: D-Galaktose-¹³C₆, D-Glukose
- l-Gal-Medium: D-Galaktose, D-Glukose-¹³C₆
- s-Man-Medium: D-Mannose-¹³C₆, D-Glukose
- l-Man-Medium: D-Mannose, D-Glukose-¹³C₆

Die Abbildung 2.4 A zeigt das Ergebnis des Experimentes für das s-Gal- und l-Gal-Medium. Nach einer halben Stunde lässt sich bei dem s-Gal-Medium, bereits ein Einbau

von Galaktose- $^{13}\text{C}_6$ erkennen. Dieses Signal nimmt nach drei Stunden nochmals deutlich zu. Im Vergleich dazu lässt sich bei dem Versuch mit l-Gal-Medium auch nach drei Stunden nur ein äußerst geringer Einbau der Glukose- $^{13}\text{C}_6$ in die Modifikation erkennen. Das Ergebnis dieses Versuchs spricht dafür, dass Galaktose direkt in die RNA-Modifikation eingebaut wird.

Abbildung 2.4 **B** stellt die Ergebnisse für den zweiten Versuch dar und zeigt die Daten für galQ in den s-Man- und l-Man-Medien. Hier lässt sich für beide Hexosen ein klarer Einbau nach drei Stunden erkennen. Diese späte Inkorporation spricht für eine Umwandlung von Glukose bzw. Mannose in UDP-Galaktose und kann über die Stoffwechselwege (Abb. 2.5) erklärt werden. Galaktose wird über den Leloir-Stoffwechselweg²⁴³⁻²⁴⁶ (Abb. 2.5) zu UDP-Galaktose aktiviert und zu Glukose-1-Phosphat verstoffwechselt. In diesem Stoffwechselweg wird unter anderem UDP-Galaktose zu UDP-Glukose epimerisiert. Die-

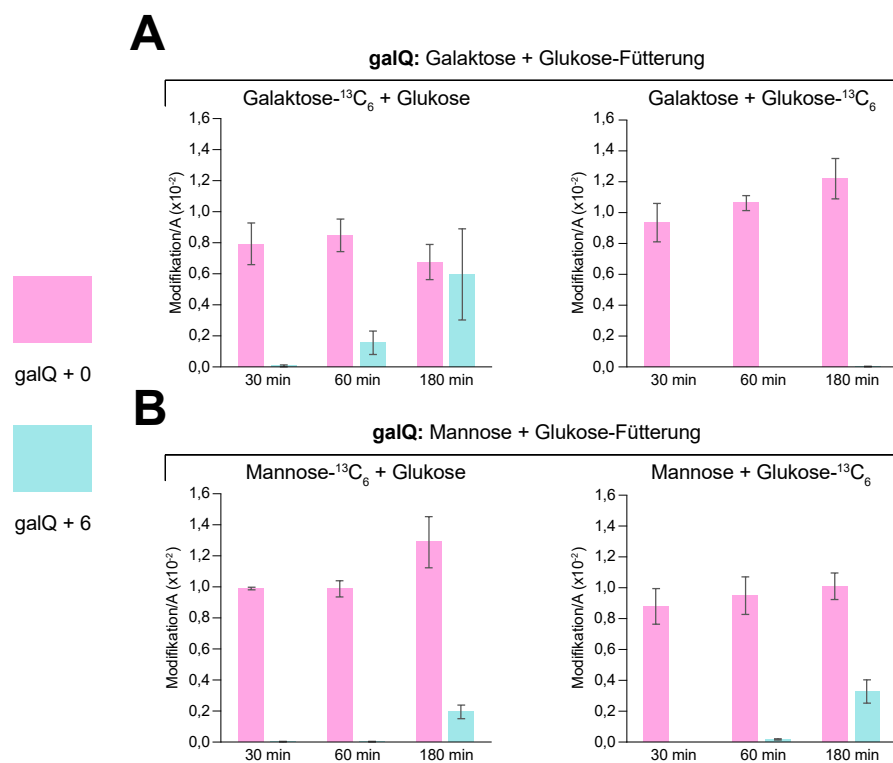


Abbildung 2.4: Level an leichtem (+ 0) und schwerem (+ 6) Galaktosylqueuosin. **A:** Isotopenfütterung mit Galaktose und Glukose. *Links:* Galaktose- $^{13}\text{C}_6$ und Glukose (s-Man-Medium). *Rechts:* Galaktose, Glukose- $^{13}\text{C}_6$ (l-Man-Medium). **B:** Isotopenfütterung mit Mannose und Glukose. *Links:* Mannose- $^{13}\text{C}_6$ und Glukose (s-Man-Medium). *Rechts:* Mannose, Glukose- $^{13}\text{C}_6$ (l-Man-Medium).

ser Schritt, welcher durch die UDP-Galaktose-4-Epimerase (GALE) katalysiert wird, ist reversibel.^{247,248} Hierdurch kann UDP-Glukose, welche ihren Ursprung in Glukose- $^{13}\text{C}_6$ hat, zu UDP-Galaktose- $^{13}\text{C}_6$ epimerisiert werden. Dadurch kann die Zelle bei dem Fehlen einer exogenen Galaktosequelle, UDP-Galaktose aus Glukose darstellen.²⁴⁹ Während bei dem Galaktose-Medien eine hohes Angebot an exogener Galaktose bereitgestellt wurde, ist dies in den Mannose-Medien nicht der Fall. Somit wird die benötigte UDP-Galaktose hier aus Glukose- $^{13}\text{C}_6$, durch die Zelle, dargestellt.

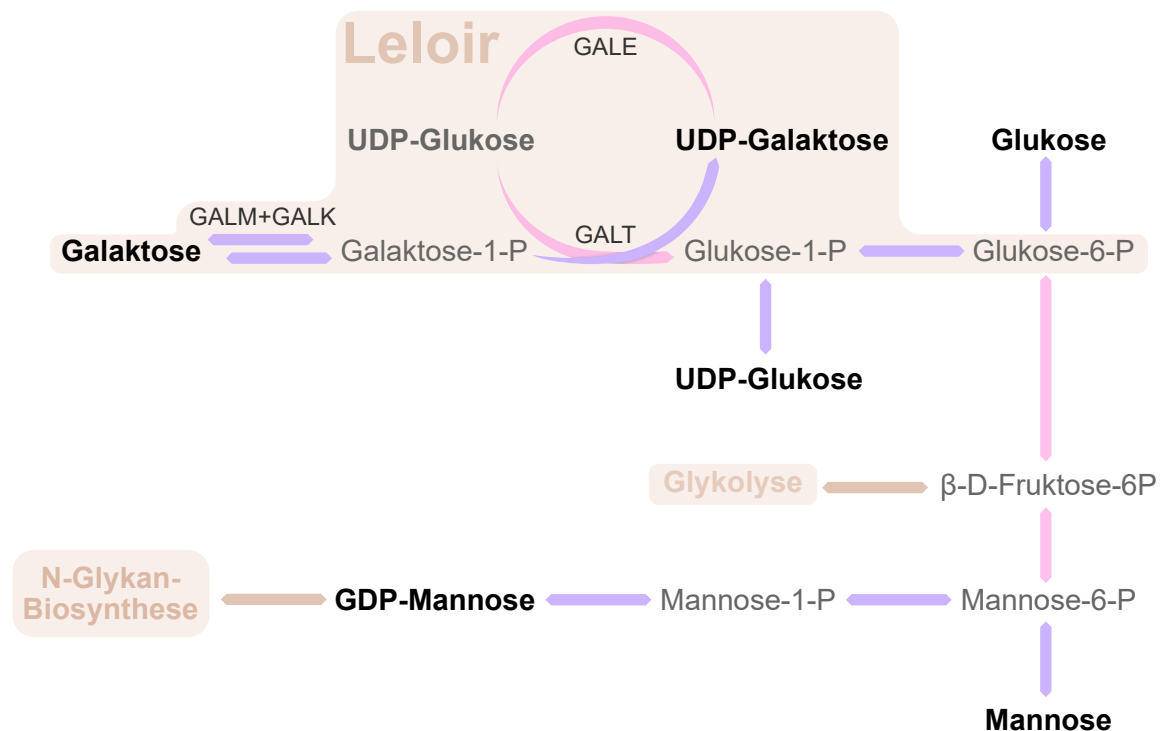


Abbildung 2.5: Stoffwechselwege von Glukose, Mannose und Galaktose im Menschen. Die Abbildung wurde Grundlage der Informationen auf der *KEGG*-Datenbank erstellt.²⁴⁰⁻²⁴² Violette Pfeile beschreiben den direkten Weg der Hexose zu ihrer aktivierte Form. Rosa Pfeile beschreiben einen Umwandlungsweg von einer Hexose zu einer anderen. Der Leloir-Stoffwechselweg ist beige unterlegt. Über ihn wird Galaktose zu UDP-Glukose umgewandelt. Stoffwechselwege in die eine Substanz eingeschleust werden kann sind ebenfalls in beige gehalten.

Mannose wird ebenfalls zu UDP-Galaktose verstoffwechselt und muss hierfür erst in Glukose-6-Phosphat überführt werden (Abb. 2.5). Die physiologischen Konzentrationen im Blut von Glukose und Mannose betragen 5 mM und 50 μM .²⁵⁰ *Ichikawa* hat in Zellkulturversuchen untersucht, wie Mannose unter zwanzigfach erhöhten Bedingungen (1 mM) verstoffwechselt wird. Die Veröffentlichung zeigt, dass Mannose unter diesen Bedingungen

identisch zu Glukose verstoffwechselt wird und sich auch in Produkten wie Laktat und Pyruvat wiederfinden lässt. Unter dieser deutlich erhöhten Mannosekonzentration, wurde auch gezeigt dass ein Teil der Galaktose in Produkten der N-Glykosylierung von Proteinen (N-Glykan), ihren Ursprung in der Mannose hatte. Dies war unter physiologischen Bedingungen nicht der Fall.²⁵⁰ Die in dieser Arbeit verwendete Mannosekonzentration von 11 mM liegt deutlich über der Konzentration in der Veröffentlichung, sodass mit einem gleichen Verhalten von Mannose und Glukose zu rechnen ist. Somit geht der in Abbildung 2.4 **B** erkennbare Einbau von Mannose-¹³C₆ auf UDP-Galaktose zurück, welche über Glukose-6-Phosphat in ersteres umgesetzt wurde (Abb. 2.5). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit *Kasai*'s Veröffentlichung von 1976 und der Dissertation von *Peter Thumbs*,^{163,169} Es zeigt sich außerdem, dass das experimentelle Design dafür geeignet ist, zu klären, welche Hexose in das xQ eingebaut wird.

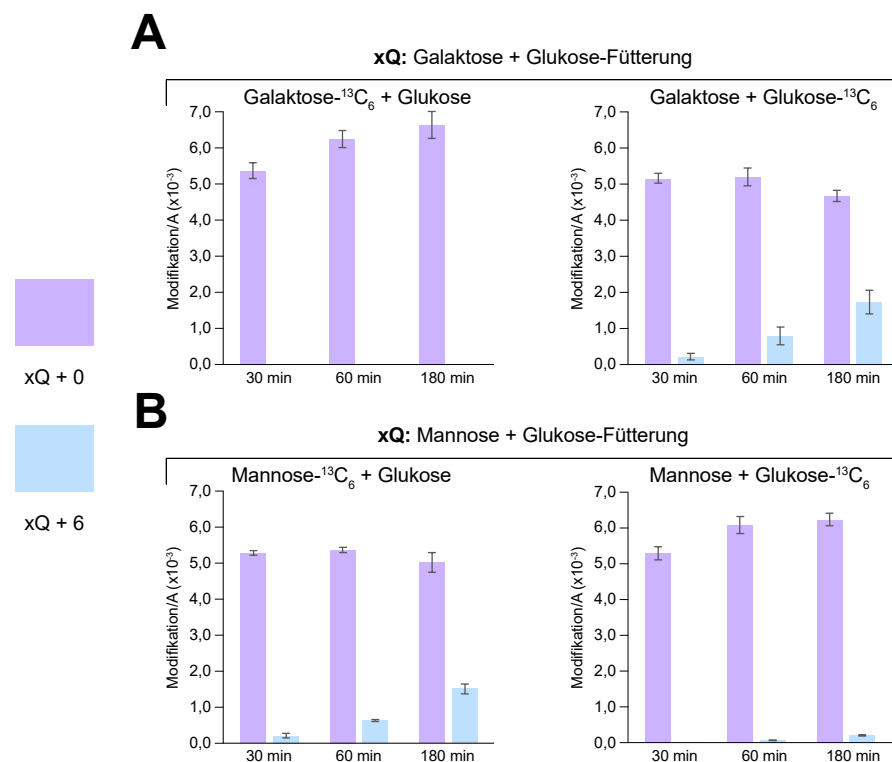


Abbildung 2.6: Level an leichtem (+ 0) und schwerem (+ 6) x-Queuosin. **A:** Isotopenfütterung mit Galaktose und Glukose. *Links:* Galaktose-¹³C₆ und Glukose (s-Man-Medium). *Rechts:* Galaktose, Glukose-¹³C₆ (l-Man-Medium). **B:** Isotopenfütterung mit Mannose und Glukose. *Links:* Mannose-¹³C₆ und Glukose (s-Man-Medium). *Rechts:* Mannose, Glukose-¹³C₆ (l-Man-Medium).

Abbildung 2.6 **A** stellt die Ergebnisse der Galaktose-Medien für das xQ dar. Hier lässt sich kein Einbau von Galaktose- $^{13}\text{C}_6$ beobachten, jedoch ein sehr eindeutiger Einbau von Glukose. Somit lässt sich Galaktose als mögliche Hexose, welche in xQ eingebaut wird, ausschließen. Bei der Betrachtung der Ergebnisse für die Mannose-Medien (Abb. 2.6 **B**) lässt sich wiederum nur ein Einbau von Mannose erkennen. Diese wird bereits nach 30 min inkorporiert und der Anteil steigt über den Verlauf von drei Stunden klar an. Währenddessen kann für die Glukose erst nach einer Stunde ein leichter Einbau, mit einer moderaten Steigerung nach drei Stunden, erkannt werden. Mannose ist ein wichtiger Bestandteil in der Glykosilierung von Proteinen. Der Einbau in das N-Glykan geschieht über eine Aktivierung der Mannose zu GDP-Mannose (Abbildung 2.5).²⁵⁰⁻²⁵² Unter physiologischen Bedingungen (5 mM Glukose, 50 μM Mannose im Blut) stellt die Zelle einen großen Teil der Mannose im N-Glykan aus Glukose dar,²⁵¹ wobei die exogen aufgenommene Mannose gegenüber der Glukose effizienter in das N-Glykan eingebaut wird.²⁵⁰ Somit scheint der Stoffwechselweg von Glukose zu GDP-Mannose sehr aktiv zu sein. Dies spiegelt sich in der Abbildungen 2.6 **A** wider. Ohne ein hohes Angebot an Mannose wird die benötigte GDP-Mannose aus der Glukose- $^{13}\text{C}_6$ dargestellt und für die Glykosilierung von xQ verwendet. Jedoch zeigt sich bei einem hohen Angebot exogener Mannose- $^{13}\text{C}_6$, dass diese gegenüber Glukose klar favorisiert ist (Abb. 2.6 **B**). Diese klare Favorisierung von Mannose- $^{13}\text{C}_6$ in der kompetitiven Fütterung zusammen mit Glukose zeigt, dass es sich bei dem Monosaccharid in xQ tatsächlich um Mannose handeln muss.

Die in diesem Abschnitt gezeigten Ergebnisse für galQ konnten herausstellen, dass das Experimentdesign in der Lage ist, die Fragestellung mit welcher Hexose xQ modifiziert wird, zu klären. Im Weiteren konnte eindeutig gezeigt werden, dass das xQ mit Mannose derivatisiert wird.

2.2.2 Koinjektionsstudien

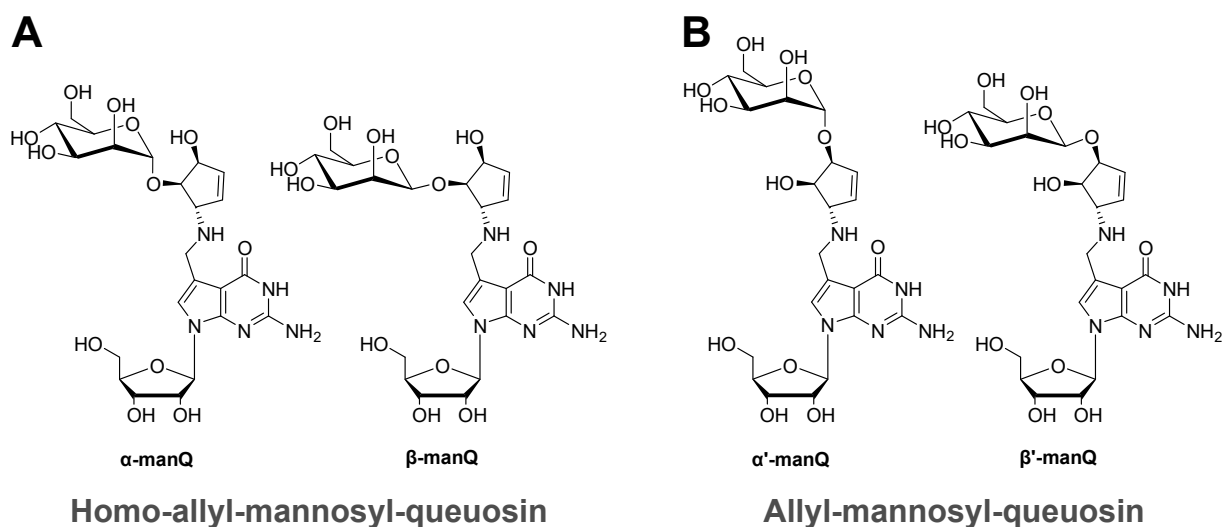


Abbildung 2.7: Abbildung der vermuteten Regio- und Stereoisomere des Mannosylqueuosins. **A** zeigt die beiden Stereoisomere der Homoallylvariante und **B** die der Allylvariante.

Durch die Experimente mit Hexosen- $^{13}\text{C}_6$ konnte eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei dem xQ in der tRNA^{ASP} um Mannosylqueuosin handelt. Allerdings befinden sich im Cyclopentendiolderivat des Queuosins eine homoallylische und eine allylische Hydroxylgruppe, welche beide für eine Mannosylierung infrage kommen. Des Weiteren kann die Mannose über eine α - oder β -glykosidische Bindung mit Queuosin verknüpft werden, wodurch sich vier Möglichkeiten ergeben (Abb. 2.7). Um zu ermitteln, welche der vier Varianten mit dem natürlichen Mannosylqueuosin übereinstimmt, wurden die Koinjektionsexperimente von *Thumbs* wiederholt. In seiner Arbeit wurden die beiden homoallylischen Anomere des Mannosylqueuosins (Abb. 2.7 **A**) mit Gesamt-RNA aus Schwein koinjiziert. Doch keiner der beiden Standards koeluierte mit dem natürlichen Molekül. Während das β -Homo-mannosylqueuosin (β -manQ) definitiv nicht mit der natürlichen Substanz koeluierte, zeigten die Signale des α -Homo-allylmannosylqueuosins (α -manQ) und der natürlichen Komponente eine teilweise Überlappung.

Die Versuche wurden mit Gesamt-RNA aus Mäuseleber wiederholt. Die Gesamt-RNA wurde durch den Autor dieser Arbeit isoliert. Die manQ-Standards wurden entweder durch *Peter Thumbs* oder *Markus Hillmeier* dargestellt. Die Koinjektionsversuche wurden von *Mirko Wagner* durchgeführt. Abbildung 2.8 zeigt das Ergebnis für die Koinjektionen mit α -manQ und β -manQ. Das Ergebnis von *Thumbs* konnte für den β -manQ reproduziert

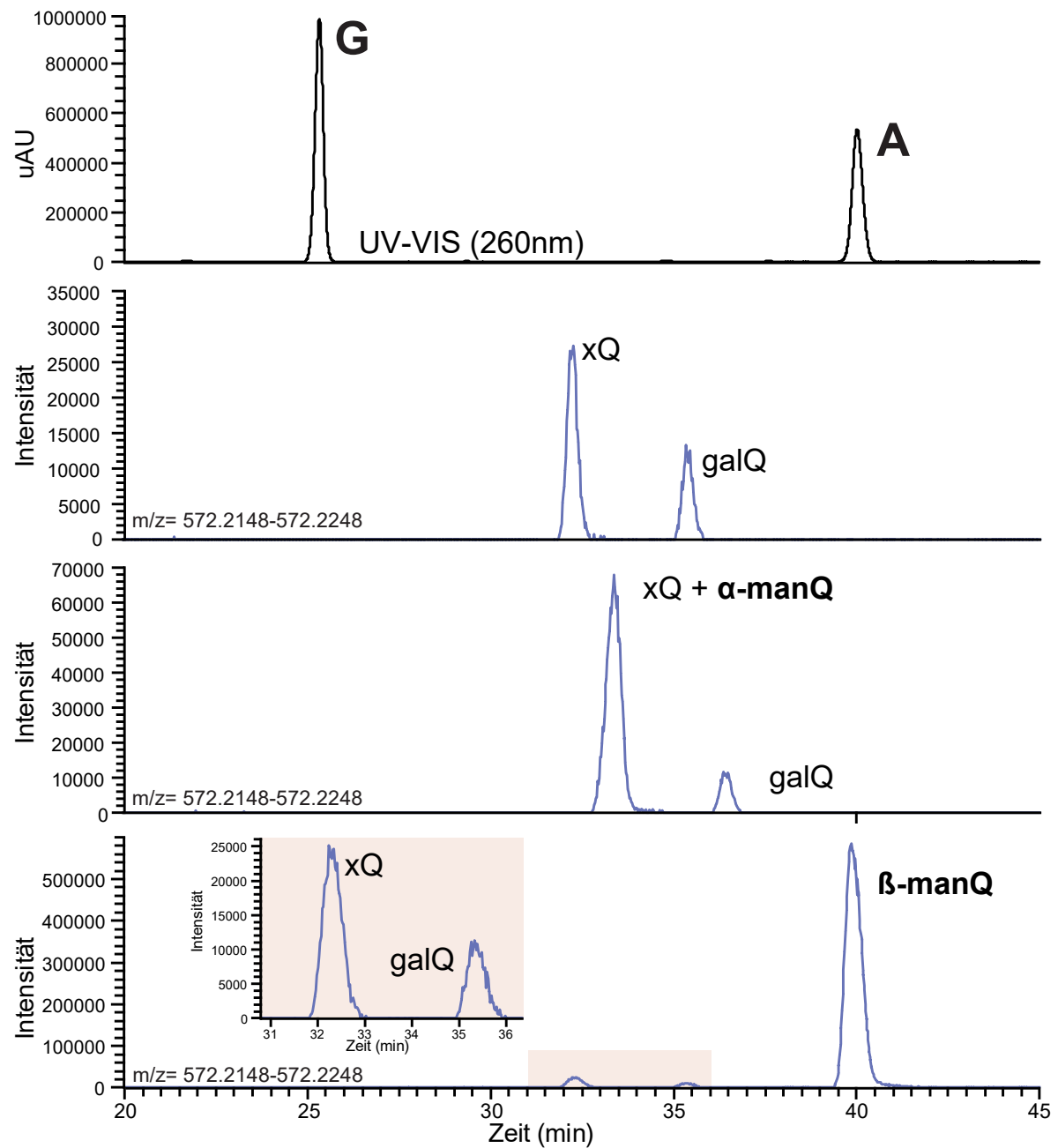


Abbildung 2.8: Dargestellt sind die Ergebnisse der Koinjektionen für α -manQ und β -manQ. Alle Versuche wurden mit Gesamt-RNA aus Mäuseleber durchgeführt. Von oben nach unten wie folgt abgebildet: UV-VIS-Spektralphotometriespur; Gesamt-RNA-Messung ohne eine Zugabe von einem Standard; Gesamt-RNA-Messung mit Zugabe von α -manQ-Standard; Gesamt-RNA-Messung mit Zugabe von β -manQ-Standard.

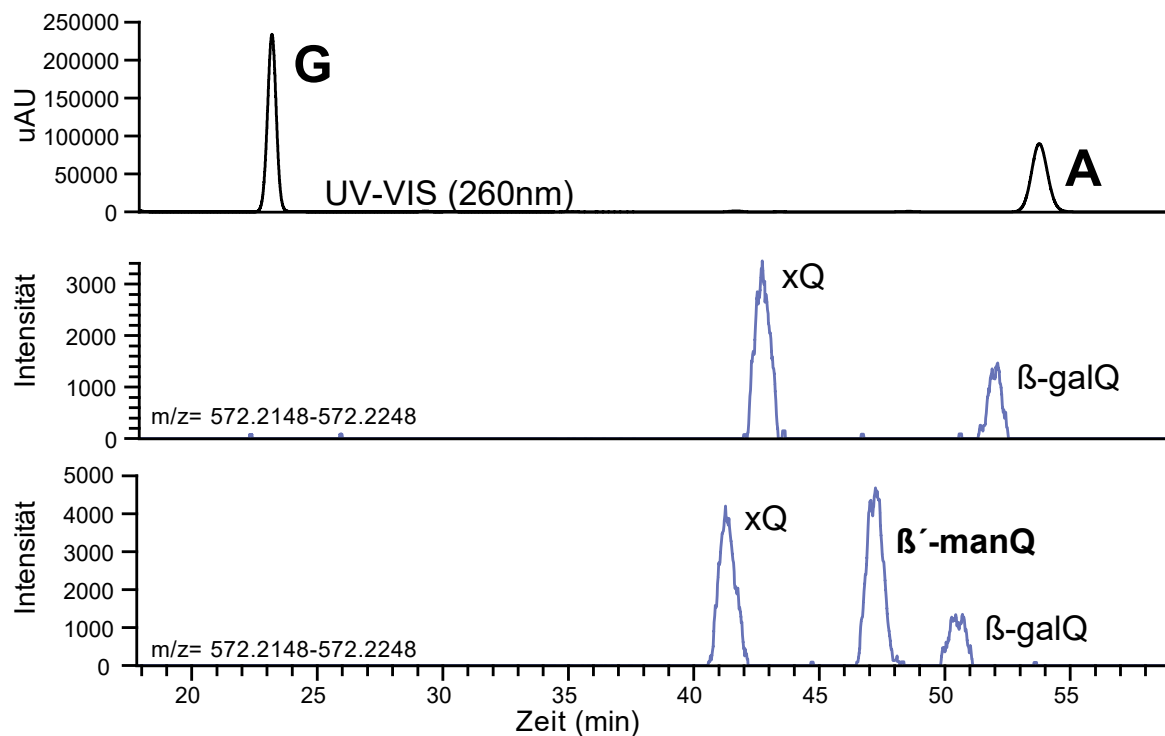


Abbildung 2.9: Dargestellt ist das Ergebnis der Koinjektion β' -manQ-Standard. Alle Versuche wurden mit Gesamt-RNA aus Mäuseleber durchgeführt. In dieser Versuchsreihe wurde ein längerer Gradient eingesetzt. Von oben nach unten wie folgt abgebildet: UV-VIS-Spektrophotometriespur; Gesamt-RNA-Messung ohne eine Zugabe von einem Standard; Gesamt-RNA-Messung mit Zugabe von β' -manQ-Standard.

werden. Hier kommt es ganz eindeutig zu keiner Koelution mit dem natürlichen Molekül. Daneben wurde auch eine Koinjektion mit durch *Markus Hillmeier* dargestelltem β -Allylmannosylqueuosinstandard (β' -manQ) durchgeführt (Abb. 2.9). Diese Komponente hat eine kürzere Retentionszeit als der β -manQ, läuft aber auch eindeutig nicht mit der natürlichen Substanz. Die Koinjektionsversuche mit dem α -manQ zeigen reproduzierbar eine Koelution mit dem natürlichen Mannosylqueuosin. Weshalb diese Ergebnisse unterschiedlich zu denen von *Thumbs* sind, kann nicht erklärt werden. Die Versuche mit dem α -manQ wurden sowohl mit dem Standard von *Thumbs* als auch, neu dargestelltem Standard von *Markus Hillmeier* durchgeführt. Darüber hinaus wurden durch *Mirko Wagner* verschiedene Verdauemethoden für den RNA-Verdau getestet, als auch verschiedene Gradienten bei der Säulenchromatographie. Diese Versuche führten alle zu einer Koelution mit dem α -manQ. Eine Koinjektion mit α -Allylmannosylqueuosinstandard (α' -manQ) ist geplant, aber zu dem derzeitigen Zeitpunkt noch nicht durchgeführt. Hierdurch soll ein vollständi-

ges Bild der Retentionszeiten aller Mannosylqueuosinvarianten erhalten werden, um das Ergebnis abschließend verifizieren zu können. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass es sich bei der natürlichen Substanz wahrscheinlich um α -Homo-allylmannosylqueuosin handelt.

2.2.3 Enzymatische Studien

Ein Teil dieser Arbeit ist die Suche nach dem Enzym, das die Mannose auf das Queuosin der tRNA^{ASP} überträgt. Eine solche Enzymaktivität wurde 1977 von *Okada* in Rattenleber beobachtet. Das Enzym ist als *tRNA-queuosine- β -mannosyltransferase* mit der EC Nummer 2.4.1.110 in den Datenbanken *ExpASY*²⁵³ und *Brenda*²⁵⁴ vermerkt. Da es sich bei dem natürlichen Mannosylqueuosin wahrscheinlich um α -Homo-allylmannosylqueuosin handelt, wird das Enzym in dieser Arbeit fortan *tRNA-queuosine α -mannosyltransferase* genannt. Die Experimente in der hier vorliegenden Arbeit wurden auf der Veröffentlichung von 1977 aufbauend geplant.

In der Publikation von 1977, wurden 50 g Rattenleber homogenisiert, dialysiert und dann über eine Anionenaustauschchromatografie (DEAE¹-Säule) gereinigt. Der letzte Schritt ist laut *Okada* notwendig, da die Experimente ohne eine chromatografische Reinigung des Lysats keine Aktivität beobachten ließen. In den Experimenten wurde die jeweilige Proteinfraktion von der Säule zusammen mit aktivierter Mannose und einer der gereinigten tRNAs aus *E.coli* inkubiert. Hier wurden die vier Q-tRNAs getestet, wobei nur mit der tRNA^{ASP} eine Aktivität zu beobachten war. Die aktivierte Mannose wurde in Form von radioaktiv markierter Guanosindiphosphatmannose (GDP-[U-¹⁴C]-Mannose) bereit gestellt.¹⁹³

¹2-Diethylaminoethanol

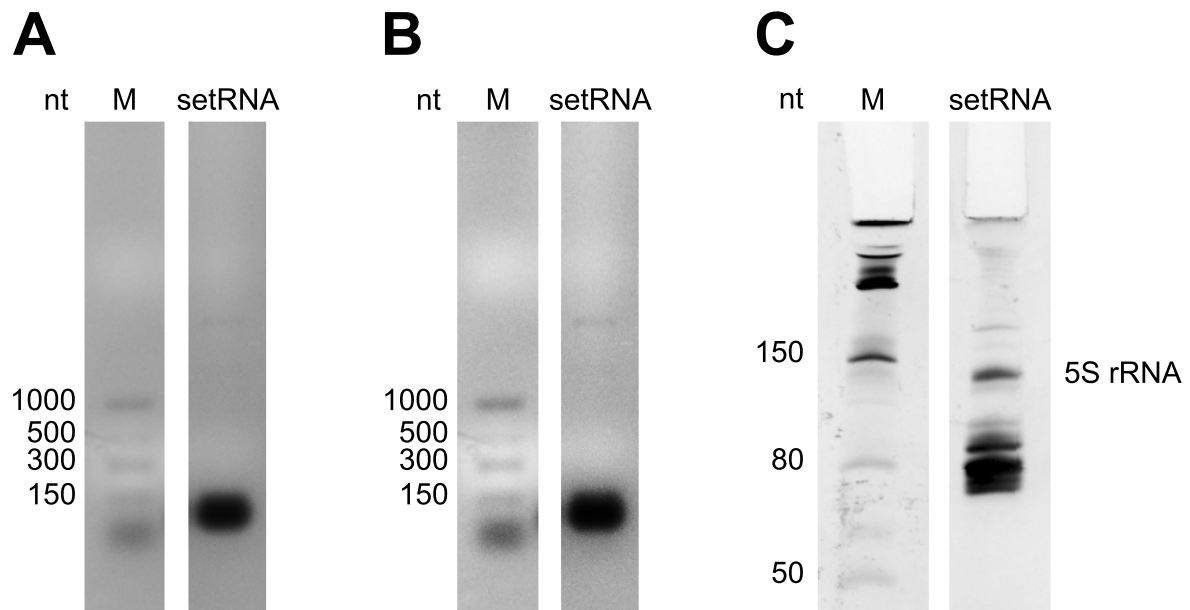


Abbildung 2.10: Bild einer Agarose-Gelelektrophorese und TBE-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. **A** Agarose-Gelelektrophorese (Gel: 1,5 %, für 60 min bei 100 V), verwendeter Marker: NEB *Low Range ssRNA Ladder*, Bahn 1: setRNA aus *E.coli*. **B** selbes Bild wie in A, allerdings mit erhöhtem lokalen und globalen Kontrast sowie angepassten Schwarzwerten, um schwache Banden sichtbarer zu machen. **C** TBE-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der selben Probe. TBE-PAGE 12 %, für 80 min bei 15 mA, verwendeter Marker: NEB *Low Range ssRNA Ladder*.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden in abgewandelter Form wie in der Veröffentlichung beschrieben durchgeführt und sind im Abschnitt 3.4.4 ausführlich beschrieben. Jedoch gab es zwei wichtige Veränderungen des Protokolls auf die direkt hier eingegangen wird. Statt der 50 g Rattenleber wurde die Leber einer Maus verwendet. Bei der verwendeten RNA handelte es sich um Gesamt-RNA aus *E.coli*, statt der gereinigten tRNA^{Asp}. Die Isolation von Gesamt-RNA wurde für diese Experimente so optimiert, dass sie sehr stark mit kleiner RNA angereichert ist (*small enriched total RNA* (setRNA)). Wie in Abbildung 2.10 **A** und **B** gezeigt, ist in der isolierten RNA nur wenig rRNA (> 1000 nt) zu sehen, während der Anteil der kleinen RNA klar überwiegt.

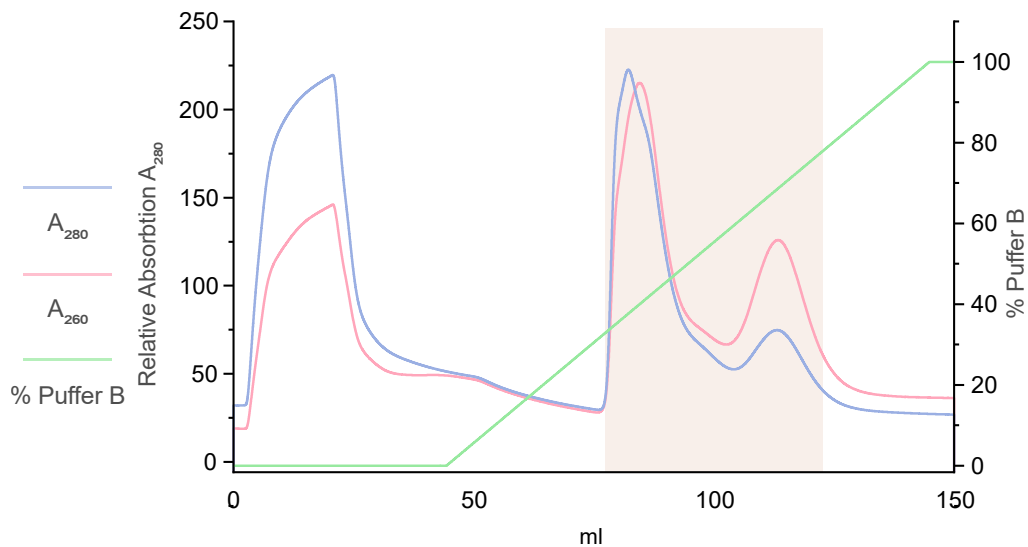


Abbildung 2.11: UV-Chromatogramm. Die UV-Spuren sind in integrierter Form dargestellt. Es wurden 15 Fraktionen auf die Enzymaktivität getestet. Der Bereich, der getestet wurde, ist im Chromatogramm beige unterlegt.

Abbildung 2.11 zeigt ein repräsentatives Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie mit der Mäuseleber. Dieses Chromatogramm war sehr gut reproduzierbar. Leider konnte die von *Okada* beobachtete Aktivität nicht gezeigt werden. *Okada* verwendet mit 50 g wesentlich mehr Leber, als in dieser Arbeit eingesetzt wurde. Im Vergleich dazu wiegt eine Mäuseleber etwa 2-3 g.²⁵⁵ Es könnte sein, dass die Menge eine Notwendigkeit war, da die Mannosyltransferase nicht sehr abundant ist. Es ist also sinnvoll, das Experiment mit der entsprechenden Menge Leber in einem größerem Maßstab zu wiederholen.

2.2.4 Organ- und altersabhängige Queuosinlevel

In der hier vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die Queuosin- (Q), Mannosylqueuosin- (manQ), Galaktosylqueuosin-Werte (galQ) in sechs verschiedenen Mäuseorganen (Großhirn, Kleinhirn, Leber, Herz, Niere und Milz) einen Tag nach der Geburt und im adulten Alter (drei Monate) gemessen. Hierfür wurde die Gesamt-RNA aus den Organen isoliert. Die Proben wurden von *Mirko Wagner* analysiert. Abbildung 2.12 zeigt die Ergebnisse. Bei der Betrachtung der Werte fallen sofort zwei grundlegende Trends auf. Zum einen große Unterschiede zwischen den Organen und zum anderen eine unterschiedlich starke Veränderung der Level abhängig vom Alter. So zeigt sich, dass sich die Q-Level in Abhängigkeit vom Alter am stärksten verändern. Während die gal- und manQ-Level um

15 % bzw. 18 % ansteigen, steigen die Q-Werte um durchschnittlich 52 %. *Farkas* hat beobachtet, dass die gal- und manQ haltigen $tRNA^{Asp,Tyr}$ in Mäusen vollständig modifiziert sind, während die $tRNA^{Asn,His}$, welche nur das Queuosin tragen, einen Modifizierungsgrad von 85 % haben.¹⁵⁵ Bei *Drosophila* fallen die Queuosin-Level während des Larvenstadiums auf ein globales Tief. *Zaborske* spekuliert, dass dies eine Folge einer schnellen Wachstumsphase sein könnte, in der ein Mangel an Queuosin besteht.²⁰⁹ Vergleichbares könnte hier der Fall sein. Die Neugeborenen befinden sich in einer schnellen Entwicklungsphase, in der vermutlich nicht genügend Queuosin zur Verfügung steht.

In einer Studie von *Reyniers* konnte gezeigt werden, dass die $tRNA^{Asp}$ gegenüber der $tRNA^{His}$ bevorzugt mit Queuosin modifiziert wird.¹⁵⁶ Es könnte also sein, dass bei einem

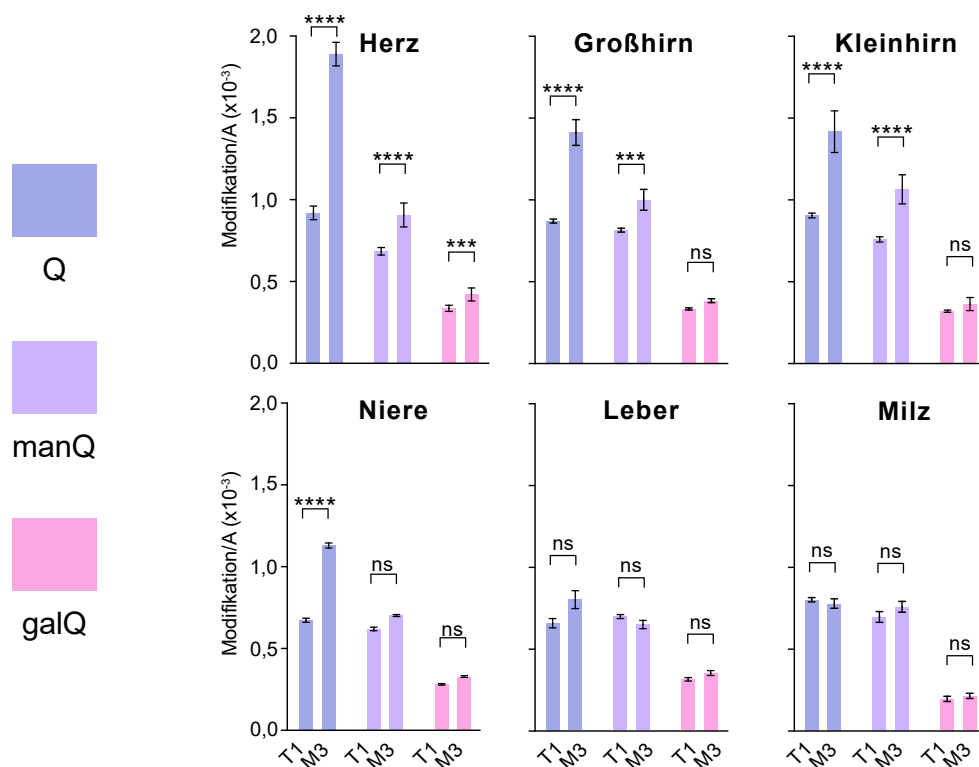


Abbildung 2.12: Queuosin-, Mannosylqueuosin- und Galaktosylqueuosin-Level in sechs verschiedenen Organen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten. T1: Ein Tag nach der Geburt; M3: Drei Monate nach der Geburt. Die Level wurden in Gesamt-RNA bestimmt. Gezeigt werden die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten. Die Quantifizierung erfolgte über einen β -Allyl-mannosylqueuosin-Standard (dargestellt von *Markus Hillmeier*). Die Messungen wurden von *Mirko Wagner* durchgeführt. Bewertung über zweifaktoriellen Anova-Test

Queuosinmangel zunächst bevorzugt die tRNAs, welche gal- und manQ tragen, queuosiniert werden und später die Queuosin tRNAs. Eine Überlegung die von *Farkas* geteilt wird.¹⁵⁵ Die Modifizierung der tRNA^{Asp,Tyr} mit man- bzw. galQ könnte eine Notwendigkeit sein, welche die tRNA gegen einen Abbau stabilisiert. *Farkas* hat in der selben Veröffentlichung keimfreie Mäuse für vier Wochen auf eine Queuosindiät gesetzt. Es konnte beobachtet werden, dass die tRNA^{Asp,Tyr} nach dieser Zeit noch vollständig modifiziert waren, während tRNA^{Asn,His} nur noch zu 15 % modifiziert vorlag.¹⁵⁵ Dies könnte mit einem verringerten Abbau der tRNAs zusammenhängen. Das Queuosin in der tRNA^{Asp} stimuliert die Methyltransferase Dnmt2, welche das Cytosin an der Position 38 methyliert.^{200,201} Interessant ist, dass diese Stimulation bereits durch Queuosin erreicht wird.²⁰¹ Der Einfluss von Mannosylqueuosin auf die Stimulation von Dnmt2 ist nicht untersucht. Das 5-Methylcytosin (m⁵C) scheint vor einem stressinduzierten tRNA-Abbau durch Angiogenin zu schützen.²⁰² Somit wirkt sich das Queuosin indirekt auf die Stabilität der tRNA aus. Eventuell greifen bei der tRNA^{Tyr} ähnliche, bisher nicht bekannte, Stabilisierungseffekte. Die Stärke des Queuosinanstieg mit dem Alter unterscheidet sich von Organ zu Organ. Während die zytosolischen tRNAs^{Asp,Tyr} mit manQ und galQ modifiziert sind, sind die mitochondrialen tRNAs in Eukaryoten ausschließlich mit Queuosin modifiziert.¹³⁶ Dies legt nahe, dass Schwankungen im Queuosingehalt eng mit dem mitochondrialer Aktivität verbunden sind. Eine andere Modifikation, das ms²i⁶A, kommt in Eukaryoten ausschließlich in mitochondrialen tRNAs vor, es dient daher als guter Indikator, wie groß der Anteil an mitochondrialer tRNA in der Probe ist.^{126,136} Eine Veröffentlichung von *Reiter* zeigt, dass der ms²i⁶A-Anteil im Herzen am höchsten ist, gefolgt vom Groß- und Kleinhirn, der Niere, der Leber und der Milz.¹⁴⁷ Bei der Betrachtung des altersbedingten Queuosinanstiegs (Abb. 2.12) fällt auf, dass dieser Anstieg mit der oben genannten Reihenfolge übereinstimmt. Das spricht dafür, dass die Stärke des Queuosinanstiegs von der Menge an mitochondrialer tRNA^{Asp,Asn,His,Tyr} korreliert. Während sich in der Milz und Leber kein bzw. ein geringer altersbedingter Anstieg erkennen lässt, ist dieser in den übrigen Organen wesentlich stärker. Das Herz zeigt hier mit Abstand die größte altersbedingte Veränderung. Hier verdoppeln sich die Q-Level.

Wie oben bereits erwähnt sind die Unterschiede zwischen den verschiedenen Organen ebenfalls nicht zu vernachlässigen. Im adulten Alter sind die Level galQ und Q im Herzen am höchsten und in der Milz am geringsten. Der Wert für manQ ist im Kleinhirn am höchsten und in der Leber am niedrigsten, allerdings sind die Level für manQ in der Niere, Leber und Milz ähnlich und die Unterschiede sind nicht signifikant². Nimmt man den

²Bewertung über zweifaktoriellen Anova-Test.

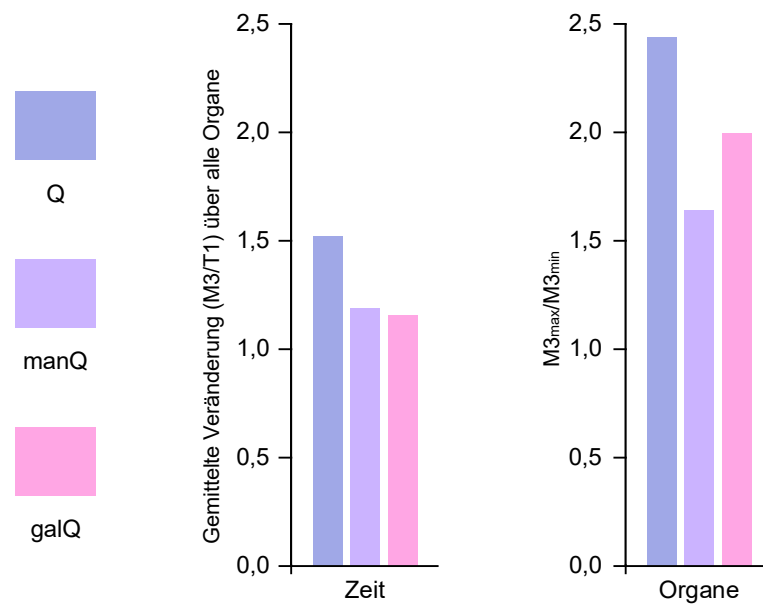


Abbildung 2.13: Links: Mittelwert der Veränderung (T1/M3) aller Organe über die Zeit. **Rechts:** Quotient zwischen dem Organ mit dem höchsten und dem niedrigsten Modifikationslevel für jede Modifikation. Eine Abbildung (3.1) die die Modifikationslevel in den verwendeten Organen zeigt, befindet sich im Anhang.

Quotienten zwischen dem Organ mit dem meisten Queuosin und dem geringsten, ergeben sich Differenzen von 144 %, 100 % und 64 % für Q, galQ und manQ (Abb. 2.13). *Brandmayr* hat gezeigt, dass sich das Level von tRNA-Modifikationen zwischen den Organen unterscheiden kann.¹⁰³ In dieser Veröffentlichung wurden ebenfalls die Queuosin-Werte ermittelt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich bis auf eine Ausnahme mit dieser Publikation. Dort war Queuosin in dem Groß- und Kleinhirn abundanter als im Herzen, dies ist hier umgekehrt. Eine plausible Erklärung hierfür kann nicht gegeben werden.

Interessanterweise sind die Schwankungen der Modifikationen zwischen den verschiedenen Organen im adulten Alter größer als die Zeitabhängigen (Abb. 2.13). Die Unterschiede zwischen den Organen werfen drei Fragen auf. Werden die Queuosin modifizierten tRNAs in den Organen weniger exprimiert? Hängen die Unterschiede mit einer global niedrigeren Translation und einem kleineren tRNA-*Pool* in den Organen zusammen? Oder sind die Queuosin tRNAs in Organen wie der Leber und Milz nur teilweise modifiziert?

Eine Veröffentlichung von *Dittmar* kommt zu dem Schluss, dass sich die Abundanz der

verschiedenen tRNA-Spezies zwischen den Organen unterscheidet. Allerdings zeigt ihre Methode je nach tRNA-Spezies mitunter sehr große Fehler, weshalb die Aussage der Studie nicht zweifelsfrei belegt ist.²⁵⁶ Eine Studie von *Kuttner* untersucht die Verweildauer der Polymerase III, welche die tRNA-Gene transkribiert, in verschiedenen Geweben. Die Studie kommt zu dem Schluss, dass die Polymerase abhängig vom Gewebe andere Genkopien einer tRNA-Isoakzeptor-Familie transkribiert. Betrachtet man jedoch die Isoakzeptor-Familie als Ganzes, kommt es zu keinen organabhängigen Unterschieden.²⁵⁷ Auf der Grundlage der momentanen Literatur gibt es also keine zweifelsfreien Indikatoren dafür, dass tRNA-Spezies abhängig vom Gewebe unterschiedlich stark exprimiert werden. Mehrere Veröffentlichungen haben die relative oder (fraktionelle)³ Proteinsyntheserate diverser Organe in verschiedenen Organismen ermittelt, indem sie markierte Aminosäuren im Organismus verfolgt haben. Es lässt sich davon ausgehen, dass eine höhere Proteinsyntheserate mit einem größeren tRNA-*Pool* einhergeht. Die Studien haben gezeigt, dass das Herz und Gehirn eine niedrigere (fraktionelle) Proteinsyntheserate haben als die Leber, Milz und Niere.^{258–262} Auch *Brandmayr* zeigt eine höhere Translationsaktivität in der Leber.¹⁰³ *Garlick* hat gezeigt, dass die Menge RNA pro Gramm Gewebe mit einer höheren fraktionellen Proteinsyntheserate steigt.²⁶¹ Das lässt vermuten, dass auch der tRNA-*Pool* in der Leber, Niere und Milz nicht kleiner, sondern größer ist. Dies wiederum würde bedeuten, dass die Q-tRNAs nicht vollständig modifiziert sind. Sofern sich die These bewahrheitet heißt dies, dass ein umgekehrtes Verhältnis zwischen Modifikationslevel und Proteinsyntheserate besteht. Tendenziell scheint zu gelten: je höher die Proteinsyntheserate, desto geringer der Queuosin-Modifikationsgrad. Eine Vermutung wäre, dass Gewebe mit einer höheren Proteinsyntheserate auch eine höhere tRNA-Syntheserate haben und die Modifikation dieser nicht ebenso schnell erfolgt.

Zwei neuere Veröffentlichungen haben untersucht, wie sich das Queuosin auf die Translationsgeschwindigkeit der betroffenen Kodons auswirkt. Die Studien wurden in HeLa-Zellen und *Schizosaccharomyces pombe* (Spaltheife) durchgeführt.^{183,206} Die Ergebnisse sind jedoch sehr heterogen und reflektieren vermutlich den evolutionären Abstand dieser Organismen. In der Spaltheife profitierten die auf Cytosin endenden Kodons der tRNA^{Asp,His} von Queuosin. Sie wurden schneller translatiert. Die auf Uridin endenden Kodons der tRNA^{Tyr,Asn} wurden jedoch langsamer translatiert. Die übrigen vier Kodons wurden in

³Das Verhältnis von spezifischer Radioaktivität der Aminosäure im Protein zu durchschnittlicher spezifischer Radioaktivität der freien Aminosäure über einen Zeitraum von 0-10 min. Formel variiert abhängig von der Veröffentlichung.

ihrer Geschwindigkeit nicht durch die An- oder Abwesenheit von Queuosin beeinflusst. Des Weiteren kommt es zu einer geringeren fehlerhaften Translation des Glycin-Kodons GGC, durch die tRNA^{Asp}_{QUC}.²⁰⁶ In HeLa-Zellen zeigte sich dagegen ein homogeneres Bild. Hier verlangsamt die Abwesenheit von Queuosin die Translation aller Kodons. Dabei sind die auf Uridin endenden Kodons stärker betroffen als die auf Cytosin endenden. Die Ausnahme bildet die tRNA^{Asp}; hier war das Cytosin-Kodon stärker betroffen.¹⁸³ Es ist zu vermuten, dass das Translationsverhalten in Mäusen dem der HeLa-Zellen ähnelt. Durch die Anwesenheit von Queuosin kann die Präferenz zu einem Kodon umgepolt werden. So translatiert modifizierte *Drosophila* tRNA^{His} leicht präferiert das auf Uridin endende Kodon.²⁰⁸ Angesichts der Tatsache, dass die Translationsgeschwindigkeit ohne Queuosin abnimmt, ja gar anfälliger für Fehler wird, ist es schwer abzuschätzen, weshalb ein untermodifiziertes Set an tRNAs bei einer höheren Proteintranslationsrate von Vorteil sein kann. In *E.coli* führt das Fehlen von Queuosin gar zu einer verringerten Bindungseffizienz der tRNA^{Tyr} zum Ribosom.²⁶³ Möglicherweise werden in diesen Geweben Proteine exprimiert, welche auf eine langsamere Translation an diesen Kodons angewiesen sind, um fehlerhaften Faltungen vorzubeugen.²⁶⁴ Es muss sich also nicht zwingend ein Nachteil aus einer langsameren Translation ergeben. Genauso besteht das Problem der Fehltranslation des GGC-Kodons nicht, sofern die exprimierten Gene hauptsächlich eines der anderen drei Glycin-Kodons verwenden.

2.3 Ausblick

2.3.1 Syntheseweg von 2-Methylthioadenosin

Die Ergebnisse in dieser Arbeit unterstützen die These, dass die *de-novo*-Synthese von ms^2A über i^6A und ms^2i^6A verläuft. Hierbei wird vermutlich die Prenylgruppe des ms^2i^6A 's auf eine nicht bekannte Weise entfernt. Das Enzym, welches hierfür verantwortlich ist, konnte in dieser Arbeit nicht identifiziert werden, dennoch wurde die Liste an Genprodukten, die dafür in Frage kommen, auf unter 99 eingeschränkt. Die Ergebnisse legen weiterhin nah, dass es sich um ein bisher nicht charakterisiertes Enzym mit einer nicht charakterisierten Domäne handelt.

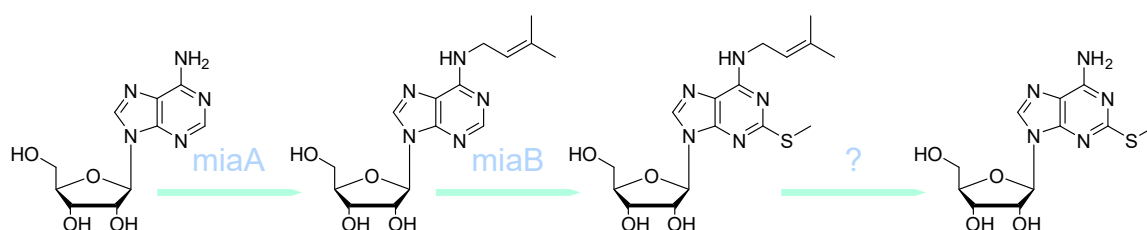


Abbildung 2.14: Auf der Grundlage der hier präsentierten Ergebnisse werden die oben abgebildeten Stoffwechselwege für ms^2A beschrieben.

Eine Herausforderung in diesem Projekt ist, dass bereits die Verdauenzymen zu einem ms^2A -Signal beitragen. In allen weiteren Untersuchungen sollte deswegen eine größere Menge RNA für die Messungen verwendet werden, um dieses Problem zu umgehen. Auf diese Weise ließen sich die Erkenntnisse dieser Arbeit mit abschließender Gewissheit klären. In der *E.coli* Keio-Kollektion wurde immer ein Gen pro Stamm deletiert.^{219,220} Dies ermöglicht es, die im LD-1-Stamm ausgeschalteten Genprodukte systematisch zu untersuchen. Auf diese Weise sollte sich ms^2i^6A -Dealkylase ermitteln lassen.

2.3.2 Queuosin

tRNA-queuosine- α -mannosyltransferase

Die durch Osaka beobachtete *tRNA-queuosine- α -mannosyltransferase*-Aktivität konnte in dieser Arbeit nicht reproduziert werden. Dies liegt vermutlich an der Tatsache, dass die *tRNA-queuosine- α -mannosyltransferase* kein sehr abundantes Enzym ist. Darauf deutet

der Einsatz von 50 g Rattenleber in der Veröffentlichung von 1976 hin. Somit sollte der Versuch mit 50 g Leber wiederholt werden.

Ein alternatives Experiment für die Identifizierung der Transferase, wäre die Erzeugung eines RNA-Protein-*Crosslinks*. In Zellkulturen, deren DNA 6-Thioguanin enthielt, konnten durch UV-A-Bestrahlung DNA-Protein-*Crosslinks* zu DNA-Reparatur- und DNA-Replikationsenzymen erzeugt werden.²⁶⁵ Analog dazu könnte 6-Thioqueuin eingesetzt werden, um die *tRNA-queuosine- α -mannosyltransferase* zu identifizieren. Dies würde über das Zellkulturmedium in die tRNAs der Zelle eingebaut. Die anschließende UV-A-Strahlung würde vermutlich ein Protein-RNA-Crosslinker katalysieren. Allerdings würden über diese Methode alle mit Queuosin interagierenden Enzyme gecrosslinked. Somit eignet sich das Experimentdesign gut, um andere bisher nicht identifizierte Enzyme wie den Queuintransporter zu identifizieren. Die selektivere Alternative wäre, die $tRNA^{Asp}$ *in vitro* zu synthetisieren und das 6-Thioqueuin über rekombinante eTGT einzubauen. Die tRNA könnte dann an magnetischen Partikeln immobilisiert werden. Eine anschließende Inkubation mit Zelllysate unter UV-A-Bestrahlung könnte dann dafür sorgen, dass die Mannosyltransferase an dem Partikel immobilisiert wird.

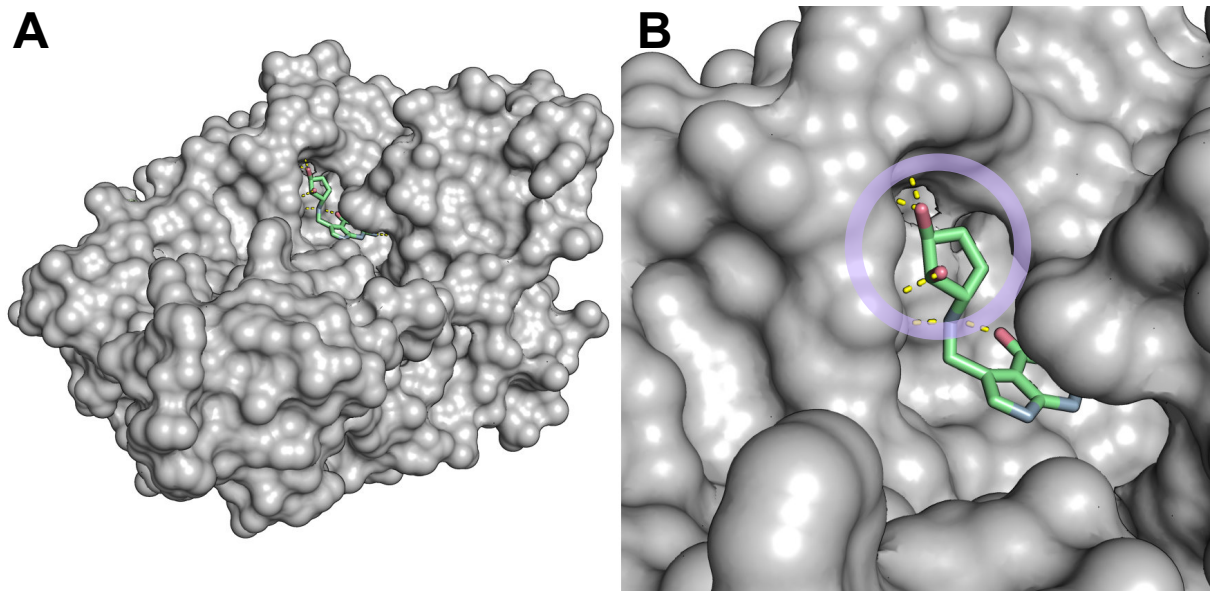


Abbildung 2.15: QTRT1 in einem Komplex mit Queuin. **A** Die Kristallstruktur zeigt, dass die zwei Hydroxylgruppen für ein weiteres Enzym zugänglich wären. **B** Bildausschnitt von A; Cyclopentendiolrest Violett hervorgehoben. Abbildung mit PDB: 6H45 erstellt.

Reyniers hat in einem Mäusemodell gezeigt, dass die $tRNA^{ASP}$ gegenüber der $tRNA^{His}$ bevorzugt mit Queuosin modifiziert wird.¹⁵⁶ Diese Beobachtung ist bisher nicht erklärt. Es scheint, dass die eTGT eine Präferenz für die $tRNA^{ASP}$ hat. Allerdings ist fraglich was für die Diskriminierung sorgt. Denkbar ist, dass die Sequenzdiskriminierung in dem eTGT Heterodimer aus QTRT1 und QTRT2 selbst angelegt ist. Es wäre allerdings auch möglich, dass die *tRNA-queuosine- α -mannosyltransferase* zusammen mit dem katalytisch aktiven QTRT1 ein Heterodimer bildet welches präferiert die $tRNA^{ASP}$ modifiziert. Eine Kristallstruktur der QTRT1 im Komplex mit Queuin unterstützt diese Annahme. Die Kristallstruktur zeigt, dass die C4-Hydroxylgruppe des Cyclopentendioldervats für das Lösungsmittel frei zugänglich ist.²⁶⁶ Somit wäre also ein Einbau mit einer gleichzeitigen Glykosylierung durch die *tRNA-queuosine- α -mannosyltransferase* nicht ausgeschlossen. Es ist auch möglich, dass die *tRNA-queuosine- α -mannosyltransferase* ein Trimer mit QTRT1 und QTRT2 bildet und so die Präferenz steuert. Aufbauend auf dieser Hypothese könnte man die eTGT bzw. QTRT1 an einem magnetischen Partikel immobilisieren und mit diesem die *tRNA-queuosine- α -mannosyltransferase* aus einem Zellysat an dem Partikel anreichern.

Organ- und Altersabhängige Queuosinlevel

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal umfassende Untersuchungen zu den Queuosin(derivaten) in einem Säugetier gezeigt. Daraus ergeben sich spannende neue Fragestellungen. So verändern sich die Queuosin-Level stark mit dem Alter. Dies hängt nach Vermutung dieser Arbeit mit der Menge an mitochondrialen tRNAs zusammen. Des Weiteren stellt sich die Frage inwiefern der Modifikationsgrad der Q-tRNAs mit der Proteinsyntheserate korrelieren. Hier scheint sich eine umgekehrte Korrelation zu ergeben.

Es wäre also interessant, der Fragestellung nachzugehen, ob der Queuosinanstieg mit dem Anteil an Mitochondrien in einer Zelle zunimmt. Sofern sich dieses bestätigt, wäre es interessant der Frage nachzugehen, wie sich die Untermodifizierung auf die zytosolischen und mitochondrialen tRNAs verteilt. Ist eine der beiden tRNA Spezies stärker betroffen oder sind die tRNAs in der Zelle uniform von dem Mangel betroffen? Um das zu beantworten, sollte der Modifizierungsgrad der zytosolischen und mitochondrialen $tRNAs^{ASP,Asn,Tyr,His}$ bestimmt werden. Darüber hinaus sollte der Modifizierungsgrad der $tRNA^{ASP,Asn,Tyr,His}$ in allen Organen bestimmt werden, um zu klären, ob die Q-tRNAs in der Leber, Milz und Niere tatsächlich unvollständig modifiziert sind. Ferner wäre es interessant zu erfahren, ob sich hier ein Zusammenhang mit dem Kodongebrauch der exprimierten Gene zeigt.

2.4 Publikation

Timm T. Ensfelder,[‡] Matthias Q. Kurz,[‡] Katharina Iwan,[‡] Simon Geiger, Sarah Matheisl, Markus Müller, Roland Beckmann, Thomas Carell*

([‡] Beitrag der Autoren zu gleichen Teilen.)

Prolog

Die vier kanonischen RNA-Basen können über Veränderungen des Basen- oder Ribosegerüst verändert werden. Einfache Derivatisierungen, wie Methylierungen, sind stark verbreitet. Anhand der RNA-Modifikation m⁶A konnte in diesem Jahrzehnt gezeigt werden, dass Modifikationen dynamisch sein können. Die Methylierung kann durch die Enzyme FTO und ALKBH5 oxidativ entfernt werden. Während FTO verschiedene Substrate demethylieren kann, ist gleiches für ALKBH5 nicht bekannt. In der hier vorliegenden Veröffentlichung konnten wir erstmals zeigen, dass ALKBH5₆₆₋₂₉₂ neben m⁶A auch in der Lage ist, die ribosomale Modifikation m₂⁶A *in vitro* vollständig zu demethylieren.

Autorenbeitrag

Für diese Studie wurde die Expressionsmethode von ALKBH5₆₆₋₂₉₂, sowie dessen Aufreinigung von mir durchgeführt und optimiert. Die Enzymsassays mit den RNA-Oigonukleotide und der ribosomalen RNA wurden von mir durchgeführt. Die enzymatischen Assays mit den RNA-Oigonukleotide wurden anschließend per MALDI-ToF-Analyse von mir gemessen. Mit der Hilfe von *Sarah Matheisl* wurden die Ribosomen aus HEK293T-Zellen isoliert. Anschließend habe ich aus den Ribosomen ribosomale RNA für die enzymatischen Assays isoliert. Die Ergebnisse wurden gemeinsam mit *Matthias Kurz*, *Katharina Iwan*, *Sarah Matheisl* *Markus Müller* und *Thomas Carell* geplant und interpretiert.

Lizenz

Kopie mit Erlaubnis des Verlages.


 Cite this: *Chem. Commun.*, 2018, 54, 8591

 Received 18th May 2018,
Accepted 4th July 2018

DOI: 10.1039/c8cc03980a

rsc.li/chemcomm

ALKBH5-induced demethylation of mono- and dimethylated adenosine†

 Timm T. Ensfelder,‡^a Matthias Q. Kurz,^{§a} Katharina Iwan,^{§a} Simon Geiger,^a Sarah Matheisl,^b Markus Müller,^b Roland Beckmann^b and Thomas Carell^{§a*}

RNA contains methylated A-base derivatives. A methylation to m⁶A and then demethylation regulate homeostasis in mRNA. It is assumed that m⁶A is mainly demethylated by the α -ketoglutarate dependent oxidase ALKBH5. Here we show that ALKBH5 also demethylates the dimethylated adenosine m⁶₂A, which is a non-canonical base present in ribosomal RNA.

RNA contains a large number of modified nucleosides.^{1,2} Most abundant throughout all RNA species are mono-methylated or multiply methylated nucleosides.² Particularly high levels of methylated nucleosides are detected in transfer RNA (tRNA), but also ribosomal RNA (rRNA) and messenger RNA (mRNA) feature such non-canonical nucleosides.^{1,3} Basically, for all canonical nucleosides methylated derivatives exist.¹ They all serve different functions.⁴ The methylated RNA nucleoside m⁶A was first reported in mRNA in 1974^{5,6} and is among the best studied modifications within the set of methylated adenosines (Fig. 1).⁷ Others^{8–14} and we¹⁵ have shown that the nucleoside recruits and repels proteins to control the lifetime of the corresponding mRNA. As such the nucleoside is directly involved in regulating mRNA homeostasis.¹⁵ Particularly exciting is the observation that the nucleoside m⁶A can be demethylated by α -ketoglutarate dependent oxidases,¹⁶ which opens the possibility that methylation and demethylation establish a new layer of regulation to facilitate transcriptional control. In addition to m⁶A, ribosomal RNA also contains the double methylated species m⁶₂A, where two methyl groups are both situated at the exocyclic N⁶-heteroatom. Because the methyl groups are connected to a heteroatom, this oxidation would allow oxidative double demethylation of m⁶₂A in contrast to m²A and m⁸A, where the methyl

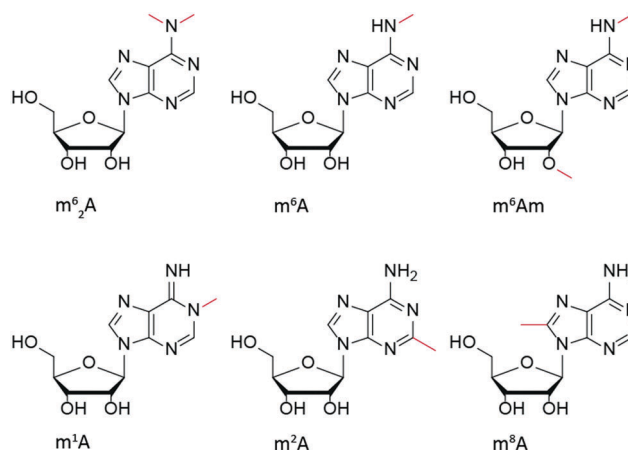


Fig. 1 Selection of naturally occurring methylated adenosines in RNA.

group resides on a carbon. Such sequential demethylations performed by a single enzyme are known: for example, histone demethylases are able to demethylate mono-, di- and even trimethylated lysines.^{17,18} Here, we investigated if the Fe²⁺-, α -ketoglutarate-dependent ALKBH5, which is known to demethylate m⁶A, would be able to demethylate naturally occurring m⁶₂A as well. In contrast to m⁶A, however, m⁶₂A is predominately, if not exclusively, found in a conserved sequence context of the small ribosomal subunit.^{2,3} For this study, we first investigated the demethylation of small RNA strands containing m⁶A and m⁶₂A in different sequence contexts with ALKBH5_{66–292} *in vitro*. Therefore, we synthesized the phosphoramidites of m⁶A and m⁶₂A and subsequently used them for solid phase RNA synthesis (SPOS) of oligoribonucleotides (ORN) 1–4 (Fig. 2). In this study we inserted m⁶A and m⁶₂A into their natural sequence context, *i.e.*, 5'-GGm⁶ACU-3' for m⁶A and 5'-GUGm⁶₂A-m⁶₂ACUU-3' for m⁶₂A. To address potential sequence bias during the enzymatic studies, we also inserted m⁶A into the sequence of m⁶₂A and *vice versa*. In addition to the investigation with pure oligonucleotides, the study was furthermore complemented with the putative demethylation of m⁶₂A in intact ribosomes and in human ribosomal rRNA.

^a Center for Integrated Protein Science, Department of Chemistry, Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstraße 5-13, 81377 Munich, Germany. E-mail: Thomas.carell@lmu.de; Web: www.carellgroup.de

^b Gene Center and Department of Biochemistry, Ludwig-Maximilians-Universität München, Feodor-Lynen-Straße 25, 81377 Munich, Germany

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c8cc03980a

‡ Equal contributions.

Communication

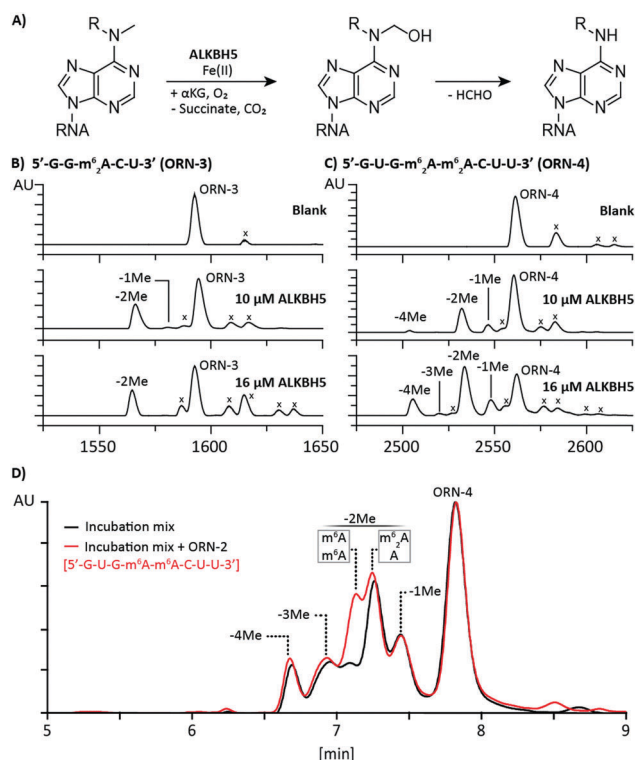


Fig. 2 (A) Oxidation scheme of methylated adenine by ALKBH5 with R being a hydrogen or a methyl group. (B and C) MALDI-TOF spectra of ORN 3–4 and their demethylation products ($-x\text{Me}$) at different concentrations of ALKBH5_{66–292}. The sodium signals in the spectra are marked with an “x”. (D) HPL chromatogram of the incubation of ORN-4 with 16 μM ALKBH5_{66–292} (black line) and with a spike of ORN-2 (red line).

The His₆-tagged protein human ALKBH5_{66–292} enzyme was overexpressed in *E. coli* BL21(DE3) from a pNIC28–Bsa4-ALKBH5_{66–292} plasmid¹⁹ using a modified procedure compared to the literature²⁰ data (see the ESI[†]) and isolated in one step *via* Ni-NTA affinity chromatography. This procedure yielded the protein in a purity of 90% (ESI, [†] Fig. S1). The buffer was changed to the assay buffer (50 mM Tris HCl, pH 7.5, 15 mM KCl). Stock solutions of diammonium-Fe(II)-sulfate and α-ketoglutarate were prepared fresh for every assay and added to a final concentration of 300 μM. ALKBH5_{66–292} concentrations in the assay buffer were either 10 or 16 μM. The corresponding oligonucleotides were held constant at 10 μM. Exclusion of oxygen was not needed. The solution was incubated at 37 °C for about 1 h (see the ESI[†]). For analysing the demethylation reaction, we desalted the assay solution using a Millipore MF™ VSWP-membrane (0.025 μm) and measured the molecular weight of the oligonucleotides using MALDI-TOF mass spectrometry. The obtained data are depicted in Fig. 2.

As expected, we observed complete demethylation of m⁶A in both sequence contexts ORN-1 and ORN-2 (ESI, [†] Fig. S2A and B). This is interesting because it shows that the oxidation of m⁶A, putatively to the corresponding N⁶-hydroxymethyl-A followed by hydrolysis of the hemiaminal (Fig. 2A), has no observable sequence bias under our conditions. In addition, we see that the demethylation proceeds also at two directly adjacent m⁶A to completion.

When we analysed the demethylation with the m⁶₂A strands ORN-3 and ORN-4 (Fig. 2B and C), we obtained more complex spectra. We could indeed detect demethylation but with a significantly reduced efficiency. When m⁶₂A is placed in the context of the m⁶A consensus sequence, the formation of the mono-demethylated ORN-3 at 10 μM enzyme concentration is seen, furthermore the fully demethylated ORN-3 (-2Me) is clearly visible (Fig. 2B). The conversion is about 40%, estimated based on the observed signal intensities. Demethylation in the rRNA context, where two directly adjacent m⁶₂A occur, is shown in Fig. 2C. At 10 μM and an incubation time of 1 h, mono-, di-, and tetra-demethylations are observed. At a slightly higher enzyme concentration, we detected all expected species with the loss of one–four methyl groups. The loss of two methyl groups can yield two different species, either one with m⁶A–m⁶A or one with m⁶₂A–A. To address this issue, we further performed LC-MS analysis of the ORN-4 assay mixture with and without a spike of ORN-2. Fig. 2D shows that both species occur and the m⁶₂A–A product is the favoured one. In summary, the data show that ALKBH5_{66–292} is able to fully demethylate an m⁶₂A–m⁶₂A sequence *via* oxidation of all four methyl groups. Interestingly, the mono- and tri-demethylated ORNs do not accumulate. We interpret this effect as an indication that the first demethylation step is rate limiting, while the demethylation of m⁶A proceeds quickly.

We next wanted to study if double-demethylation of m⁶₂A is also possible on intact rRNA. To this end, we isolated the ribosomes from HEK293T cells using ultracentrifugation followed by rRNA isolation. The obtained ribosomes and rRNA are more complex than the synthesized oligonucleotides because they contain one m⁶A per subunit and in addition the m⁶₂A–m⁶₂A sequence. These m⁶₂A positions are highly conserved in all species with only very few exceptions.²¹ For the analysis, due to the large size of the RNA strand, we digested the RNA after the assay to the individual nucleosides and measured all four canonical nucleosides plus the methylated adenosines m⁶A and m⁶₂A *via* UHPLC-MS/MS using our described procedure (see the ESI[†]). In order to obtain absolute quantitative data, we synthesized the isotopologues of m⁶A and m⁶₂A that were used for internal calibration (see the ESI[†]). The obtained quantitative MS-data are compiled in Fig. 3. In the control studies performed without enzymes, we clearly detected the m⁶A and m⁶₂A nucleosides at the expected ratios (two of each per rRNA). Upon addition of ALKBH5_{66–292} in two different concentrations, we see a clear and strong reduction of the m⁶A signal, showing that in principle ALKBH5_{66–292} is able to demethylate m⁶A also in ribosomal RNA. Because the sequence context is different, this result argues again that the activity of ALKBH5_{66–292} has no observable sequence preference. One has to note that in these experiments ALKBH5_{66–292} is present in great excess over the used large rRNA. Interestingly, however, m⁶A levels are not reduced to zero which we would expect based on the observed full demethylation with the smaller RNA strands. For m⁶₂A, we also see clearly reduced levels, showing that ALKBH5_{66–292} demethylated m⁶₂A also in rRNA. It is interesting to note that at 16 μM enzyme concentration, in contrast to the ORN, the resulting m⁶A values are higher than those observed at

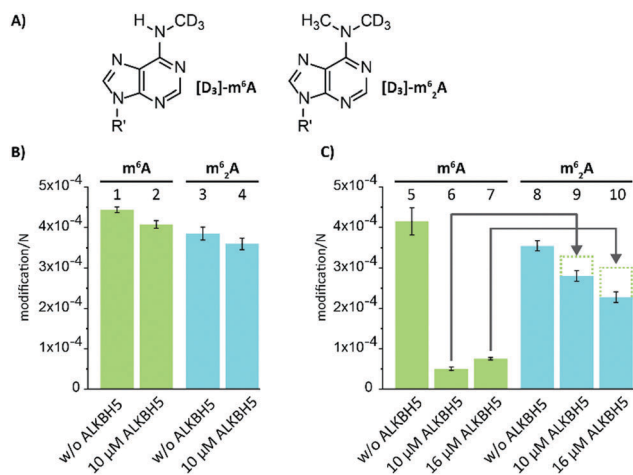


Fig. 3 Quantification data of m⁶A and m⁶₂A upon incubation with ALKBH5_{66–292} at different concentrations. (A) For quantification, isotope labelled standards of m⁶A and m⁶₂A were used. R' represents the ribose sugar moiety. Panel (B) represents the amount in ribosomes and (C) the amount in rRNA. The dashed lines shown in (C) indicate the sum of residual m⁶A and m⁶₂A.

10 μM, despite lower m⁶₂A levels. We hypothesize that the observed m⁶A levels are the hemi-demethylated intermediates that are obtained when ALKBH5_{66–292} oxidizes and demethylates m⁶₂A. The sum of residual m⁶A and m⁶₂A levels never exceeds the starting values of m⁶₂A (Fig. 3D), showing that the full demethylation of m⁶₂A occurs and that all the original m⁶A was likely demethylated as well.

ALKBH5 is an α-ketoglutarate-dependent oxidase that was shown to demethylate m⁶A in mRNA. We investigated here if the enzyme is able to demethylate also the double-methylated m⁶₂A, which is known to occur in the small subunit of the ribosome. We also wanted to know if the enzyme is in addition able to demethylate m⁶A in rRNA. We show that ALKBH5 demethylates m⁶A in basically all sequence contexts, when used at an equimolar ratio or higher, even when two m⁶A bases are adjacent to each other. It also demethylates m⁶₂A both in rRNA and in small ORNs. Here, in general demethylation occurs and the mono-demethylated intermediate (ORN3/ORN4 -1Me; Fig. 2D and E) is detectable. This is very interesting because it shows that the enzyme releases its substrate after the first demethylation step. Since the demethylation of the mono-methylated compound m⁶A is much more efficient compared to m⁶₂A, one would expect direct conversion of m⁶₂A into adenosine if the substrate is not released. We speculate that the substrate release after the first demethylation could be required to reload another α-ketoglutarate co-substrate into the active site. It is unclear if the demethylation of m⁶₂A ALKBH5_{66–292} is a process that occurs in nature. We suspect that the small amount of observed demethylation at approximately 100-fold excess of the enzyme relative to the added rRNA speaks against this possibility. Indeed, when we performed the demethylation studies with assembled ribosomes, demethylation did not occur. This makes demethylation of intact ribosomes unlikely, but it still leaves the possibility that demethylation occurs during rRNA maturation

similar to the insertion of non-canonical nucleosides into mRNA upon mRNA maturation.

We thank Felix Hagelskamp and the Kellner Lab (LMU Munich) for sharing unpublished protocols. We thank Christina Schneider for applying this protocol to help us with the LC-MS measurements. We thank Michael McDonough, Christopher Schofield and Dong Zhang for kindly providing us with the pNIC28–Bsa4-ALKBH5_{66–292} plasmid. Furthermore, we thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB749, SFB1032, GRK2062 and SPP1784) for financial support. Additional support was obtained from the Excellence Cluster CIPSM.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Notes and references

- 1 P. Boccaletto, M. A. Machnicka, E. Purta, P. Piątkowski, B. Bagiński, T. K. Wirecki, V. de Crécy-Lagard, R. Ross, P. A. Limbach, A. Kotter, M. Helm and J. M. Bujnicki, *Nucleic Acids Res.*, 2018, **46**, D303–D307.
- 2 M. A. Machnicka, K. Milanowska, O. Osman Oglou, E. Purta, M. Kurkowska, A. Olchowik, W. Januszewski, S. Kalinowski, S. Dunin-Horkawicz, K. M. Rother, M. Helm, J. M. Bujnicki and H. Grosjean, *Nucleic Acids Res.*, 2013, **41**, D262–D267.
- 3 D. Piekna-Przybylska, W. A. Decatur and M. J. Fournier, *Nucleic Acids Res.*, 2008, **36**, D178–D183.
- 4 G. Jia, Y. Fu and C. He, *Trends Genet.*, 2013, **29**, 108–115.
- 5 R. Desrosiers, K. Friderici and F. Rottman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1974, **71**, 3971–3975.
- 6 R. P. Perry and D. E. Kelley, *Cell*, 1974, **1**, 37–42.
- 7 B. S. Zhao, I. A. Roundtree and C. He, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2016, **18**, 31–42.
- 8 W. Xiao, S. Adhikari, U. Dahal, Y.-S. Chen, Y.-J. Hao, B.-F. Sun, H.-Y. Sun, A. Li, X.-L. Ping, W.-Y. Lai, X. Wang, H.-L. Ma, C.-M. Huang, Y. Yang, N. Huang, G.-B. Jiang, H.-L. Wang, Q. Zhou, X.-J. Wang, Y.-L. Zhao and Y.-G. Yang, *Mol. Cell*, 2016, **61**, 507–519.
- 9 D. P. Patil, C.-K. Chen, B. F. Pickering, A. Chow, C. Jackson, M. Guttman and S. R. Jaffrey, *Nature*, 2016, **537**, 369–373.
- 10 X. Wang, B. S. Zhao, I. A. Roundtree, Z. Lu, D. Han, H. Ma, X. Weng, K. Chen, H. Shi and C. He, *Cell*, 2015, **161**, 1388–1399.
- 11 K. D. Meyer, D. P. Patil, J. Zhou, A. Zinoviev, M. A. Skabkin, O. Elemento, T. V. Pestova, S.-B. Qian and S. R. Jaffrey, *Cell*, 2015, **163**, 999–1010.
- 12 X. Wang, Z. Lu, A. Gomez, G. C. Hon, Y. Yue, D. Han, Y. Fu, M. Parisien, Q. Dai, G. Jia, B. Ren, T. Pan and C. He, *Nature*, 2014, **505**, 117–120.
- 13 K. D. Meyer, Y. Saletore, P. Zumbo, O. Elemento, C. E. Mason and S. R. Jaffrey, *Cell*, 2012, **149**, 1635–1646.
- 14 D. Dominissini, S. Moshitch-Moshkovitz, S. Schwartz, M. Salmon-Divon, L. Ungar, S. Osenberg, K. Cesarkas, J. Jacob-Hirsch, N. Amariglio, M. Kupiec, R. Sorek and G. Rechavi, *Nature*, 2012, **485**, 201–206.
- 15 R. R. Edupuganti, S. Geiger, R. G. H. Lindeboom, H. Shi, P. J. Hsu, Z. Lu, S.-Y. Wang, M. P. A. Baltissen, P. W. T. C. Jansen, M. Rossa, M. Müller, H. G. Stunnenberg, C. He, T. Carell and M. Vermeulen, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2017, **24**, 870–878.
- 16 G. Zheng, J. A. Dahl, Y. Niu, P. Fedorcsak, C.-M. Huang, C. J. Li, C. B. Vågbo, Y. Shi, W.-L. Wang, S.-H. Song, Z. Lu, R. P. G. Bosmans, Q. Dai, Y.-J. Hao, X. Yang, W.-M. Zhao, W.-M. Tong, X.-J. Wang, F. Bogdan, K. Furu, Y. Fu, G. Jia, X. Zhao, J. Liu, H. E. Krokan, A. Klungland, Y.-G. Yang and C. He, *Mol. Cell*, 2013, **49**, 18–29.
- 17 K. Yamane, C. Toumazou, Y.-I. Tsukada, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. Wong and Y. Zhang, *Cell*, 2006, **125**, 483–495.
- 18 S. M. Kooistra and K. Helin, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2012, **13**, 297–311.
- 19 W. Aik, J. S. Scotti, H. Choi, L. Gong, M. Demetriades, C. J. Schofield and M. A. McDonough, *Nucleic Acids Res.*, 2014, **42**, 4741–4754.
- 20 F. W. Studier, *Protein Expression Purif.*, 2005, **41**, 207–234.
- 21 Z. Xu, H. C. O'Farrell, J. P. Rife and G. M. Culver, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2008, **15**, 534–536.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräteliste

Tabelle 3.1: Geräteliste der in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Firma
Autoklaven	
VX-65	Systec
Laboklav	SHP Steriltechnik AG
Zentrifugen	
5424 R, Rotor: FA-45-24-11	Eppendorf
5427 R, Rotor: FA-45-30-11	Eppendorf
5702, Rotor: A-4-38	Eppendorf
5810 R, Rotor: A-4-62	Eppendorf
Sorvall RC 6 plus Rotor: Fiberlite F10-4×1000 LEX Rotor: SS-34	Thermo Fisher Scientific
Inkubationsschüttler	
Innova [®] 44 Incubator Shaker Series	New Brunswick Scientific
Inkubationshaube TH 30	Edmund Bühler GmbH
Inkubatoren	
Incucell 55	MMM Medcenter Einrichtungen GmbH
INE 500	Memmert

Inkubator für Zellkulturen	Binder
pH-Meter	
MP 220 Basic MP220 Basic pH Meter	Mettler Toledo
Gelkammern	
Gelkammer Mini PROTEAN Tetra System	Bio-Rad
PerfectBlue Gelsystem Mini S	peqlab
PerfectBlue Gelsystem Mini L	peqlab
Netzteile	
PowerPac TM Basic	Bio Rad
Gewebe- und Zellaufschluss	
Ultraschallgerät Sonoplus UW2070	Bandelin
Schwingmühle MM 400	Retsch
Thermocycler	
Mastercycler [®] personal	Eppendorf
Geldokumentation	
E-Box VX5	Vilber
LAS-3000	Fujifilm
Reinstwassersystem	
arium [®] pro DI	Satorius AG
Proteinreinigung	
ÄKTA TM pure 25 mit UV-Detektor U9-D	GE Healthcare Life Sciences
<i>Speed-vac</i> und Eiskondensator	
Alpha 2-4 LD Plus	Christ
AVC 2-33 IR	Christ
CT 04-50 SR	Christ
Sonstige Geräte	
Pipet-Aid XP	Drummond Scientific
Pipetus [®]	Hirschmann Laborgeräte
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Thermomixer C	Eppendorf
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Vortex-Schüttler	VWR International
Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer	Peqlab

F12-MA Kälte-Umwälzthermostat	Julabo
Herasafe™ KS	Thermo Fisher Scientific
<i>Blender</i> 8011EB HGB2WT	Waring

3.1.2 Medien, Puffer und Lösungen

Medien und Nährböden zur Bakterienkultivierung sowie Puffer für molekularbiologische Arbeiten wurden vor dem Gebrauch bei 121 °C autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden steril filtriert (Porengröße: 0,22 µm).

Tabelle 3.2: Medien die Kultivierung von Bakterienkulturen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	0,50 % (w/w) Hefeextrakt; 1,00 % (w/w) Trypton; 0,50 % (w/w) Natriumchlorid
LB-Agar	0,50 % (w/w) Hefeextrakt; 1,00 % (w/w) Trypton; 0,50 % (w/w) Natriumchlorid; 1,50 % (w/w) Agar
Antibiotisches Medium 3 (ABM3)	0,15 % (w/w) Fleischextrakt 0,15 % (w/w) Hefeextrakt, 0,50 % (w/w) Trypton; 0,10 % (w/w) Dextrose; 0,35 % (w/w) Natriumchlorid; 10 % (v/v) ABM3-Puffer
ABM3-Puffer (Sterilfiltriert)	3,68 % (w/w) Dikaliumhydrogenphosphat; 1,32 % (w/w) Kaliumhydrogenphosphat

Tabelle 3.3: Lösungen und Medienkomponenten für die Kultivierung von humanen Zellkulturen. Für die Medien wurden Produkte der Firmen SIGMA ALDRICH (MERCK), THERMO FISHER SCIENTIFIC und SILANTES.

Kurzname	Voller Name; Hersteller; Katalognummer
RPMI	RPMI 1640 Medium; SIGMA ALDRICH; R0883
RPMI (o.G.)	RPMI 1640 Medium ohne Glukose; THERMO FISHER SCIENTIFIC; 11879020
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> ; SIGMA ALDRICH; D5921
FBS	Fötales Rinderserum (englisch <i>Fetal Bovine Serum</i>); THERMO FISHER SCIENTIFIC; 10500064
Ala-Gln	<i>Alanin-glutamine</i> ; SIGMA ALDRICH; G8541
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin; SIGMA ALDRICH; P0781
PBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> ; SIGMA ALDRICH; D8537
D-Glukose- $^{13}\text{C}_6$	D-Glukose- $^{13}\text{C}_6$; SILANTES; 302204100
D-Galaktose- $^{13}\text{C}_6$	D-Galaktose- $^{13}\text{C}_6$; SIGMA ALDRICH; 605379
D-Mannose- $^{13}\text{C}_6$	D-Mannose- $^{13}\text{C}_6$; SIGMA ALDRICH; 605379

Tabelle 3.4: Medien für die Kultivierung von humanen Zellkulturen. Es wurden die in Tabelle 3.3 aufgeführten Komponenten verwendet. Den Medien mit einer speziellen Zuckermischung wurde eine Mischung aus Galaktose und Glukose bzw. Mannose und Glukose hinzugegeben. Die finale Konzentration je Hexose war 11 mM. In den Medien wurde immer ein Paar aus einer $^{13}\text{C}_6$ - und eine nicht markierten Hexose eingesetzt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
RPMI Medium	88 % (v/v) RPMI; 10 % (v/v) FBS; 1 % (v/v) Pen-Strep; 1 % Ala-Gln
DMEM Medium	88 % (v/v) DMEM; 10 % (v/v) FBS; 1 % (v/v) Pen-Strep; 1 % Ala-Gln
Schweres RPMI Medium Gal/Glc	88 % (v/v) RPMI (o.G.); 10 % (v/v) FBS; 1 % (v/v) Pen-Strep; 1 % Ala-Gln; 11 mM D-Galaktose($^{-13}\text{C}_6$); 11 mM D-Glukose($^{-13}\text{C}_6$)
Schweres RPMI Medium Man/Glc	88 % (v/v) RPMI (o.G.); 10 % (v/v) FBS; 1 % (v/v) Pen-Strep; 1 % Ala-Gln; 11 mM D-Mannose($^{-13}\text{C}_6$); 11 mM D-Glukose($^{-13}\text{C}_6$)

Tabelle 3.5: Puffer und Lösungen, die für die Agarose-Gelelektrophorese verwendet wurden.

Bezeichnung	Zusammensetzung oder Hersteller
1x TAE-Puffer	40 mM TRIS; 0,1 mM EDTA; pH 8,0
<i>RNA Loading Dye (2×)</i>	NEW ENGLAND BIOLABS; N0362
<i>peqGREEN DNA/RNA binding dye</i>	VWR; 732-3196

Tabelle 3.6: Lösungen für die TBE-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Bezeichnung	Zusammensetzung
10×TBE-Puffer	0,89 M TRIS; 0,89 M Borsäure; 0,02 M EDTA
2×TBE-Ladepuffer	20 % (v/v) 10x TBE-Puffer; 300 mM Ficoll; 149 µM Bromphenolblau; 372 µM Xylene Cyanol FF; 7 M Urea
TBE-Lösung (12 %)	4,2 ml Urea (8 M); 4,8 ml Rotiphorese® Sequenziergel Konzentrat (SIGMA ALDRICH; 3043,1) 0,05 ml APS (10 % (w/v)); 0,005 ml TEMED

Tabelle 3.7: Spezielle Puffer für die Proteinreinigung.

Puffer	Bezugsquelle
Puffer MTA	10 mM TRIS-HCl (pH 7,5); 10 mM MgCl ₂ ; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10 % Glycerin (v/v)
Puffer MTL	50 ml Puffer MTA mit einer Tablette PMSF
Puffer MTB	10 mM TRIS-HCl (pH 7,5); 10 mM MgCl ₂ ; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10 % Glycerin (v/v); 400 mM NaCl
10×MTR Enzypuffer	75 mM TRIS-HCl (pH 7,5); 25 mM MgCl ₂

3.1.3 Größenstandards

Tabelle 3.8: Verwendete Größenstandards.

Marker	Bezugsquelle
<i>Low Range ssRNA Ladder (N0364)</i>	NEW ENGLAND BIOLABS

3.1.4 Stämme und Zelllinien

Tabelle 3.9: Verwendete *E. coli* Stämme.

Stamm	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> BW25113	NATIONAL BIORESOURCE PROJECT
<i>E. coli</i> JW0658-KC (Δ <i>miaB</i>)	NATIONAL BIORESOURCE PROJECT
<i>E. coli</i> JW1319-KC (Δ <i>ogt</i>)	NATIONAL BIORESOURCE PROJECT
<i>E. coli</i> JW2200-KC (Δ <i>alkB</i>)	NATIONAL BIORESOURCE PROJECT
<i>E. coli</i> JW2201-KC (Δ <i>ada</i>)	NATIONAL BIORESOURCE PROJECT
<i>E. coli</i> JW4129-KC (Δ <i>miaA</i>)	NATIONAL BIORESOURCE PROJECT
<i>E. coli</i> JW5105-KC (Δ <i>ybiX</i>)	NATIONAL BIORESOURCE PROJECT
<i>E. coli</i> ME5109 (Δ <i>rpsL</i>)	NATIONAL BIORESOURCE PROJECT
<i>E. coli</i> ME5110 (Δ (<i>yjgR-yjjA</i>))	NATIONAL BIORESOURCE PROJECT
<i>E. coli</i> ME5125 (siehe unten)	NATIONAL BIORESOURCE PROJECT

Genetisches Profil von ME5125 Δ (*yjgR-yjjA*, *yqjL-b3122*, *yabC-arcC*, *yjcD-cadC*, *yiaH-yibI*, *rhsB-yiaE*, *yeeE-mrp*, *yccC-yceE*, *ygaD-b2740*, *intA-emrB*, *yejO-alkB*, *ompC-yfaA*, *yfaE-b2275*, *ycjD-b1505*, *hipA-b1579*, *b0245-tauD*, *galM-ybjZ::tet*, *bla*, *cat*)

Tabelle 3.10: Verwendete Zelllinie.

Zelllinie	Langname	Bezugsquelle
HEK293T	<i>Human Embryonic Kidney 293T</i>	ATCC

3.2 Mikrobiologische und Zellkulturmethoden

3.2.1 Vorkulturen

Für die Vorkulturen wurden bis zu 50 ml LB-Medium verwendet. Als Selektionsmarker wurde Kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) eingesetzt. Die Vorkulturen wurden bei 37 °C und 210 upm über Nacht inkubiert. *E. coli* ME5109, ME5110, ME5125 wurden in ABM3-Medium kultiviert.

3.2.2 Hauptkulturen

Hauptkulturen (Kanamycin (50 µg/ml)) wurden mit der Vorkultur auf eine Zelldichte von OD₆₀₀ 0,05 angeimpft und bei 37 °C und 210 upm bis zu der gewünschten Zelldichte kultiviert. *E.coli* ME5109, ME5110, ME5125 wurden in ABM3-Medium kultiviert.

3.2.3 Stammerhaltung

500 µl Zellkultur wurden mit 500 µl sterilem Glycerin (50 % (v/v)) versetzt, gemischt und in flüssigen Stickstoff gefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.2.4 Zellkultur

Die in dieser Studie verwendeten Zelllinien wurden in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Als Kultivierungsmedien wurden entweder *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) oder *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (Tabelle 3.4) verwendet. Bei einer Konfluenz von 70 % wurden die Zellen passagiert.

Dafür wurde das Medium zunächst entfernt und ein variables Volumen *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (PBS) wurde auf die Zellkulturplatte gegeben, um Mediumrückstände zu entfernen. Das PBS wurde entfernt und eine variable Menge Trypsinlösung hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C. Schwach adhärente Zelllinien (HEK293T) wurden 1 min inkubiert. Das Volumen war abhängig von der Größe der Zellkulturplatte. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gegen die Wand der Zellkulturplatte vereinzelt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen für 3 min bei 300 × g und Raumtemperatur pelletiert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen wurden durch die Zugabe von neuem Medium resuspendiert. Entweder wurde bereits Medium in die Zellkulturplatte vorgelegt oder die Zellen wurden direkt in der notwendigen Menge Medium resuspendiert. Der Verdünnungsfaktor hing dabei von der Anzahl der gewünschten Kultivierungsdauer und der jeweiligen Zelllinie ab. Abschließend wurde die Zellsuspension in das neue Kultivierungsgefäß gegeben und gleichmäßig verteilt. Die Inkubation fand anschließend wie oben beschrieben bis zur nächsten Passagierung statt.

Isotopenfütterung

Um zu ermitteln, welche Hexose in das Queuosin der tRNA^{Asp} eingebaut wurden, wurden HEK293T-Zellen in verschiedenen schweren RPMI-Medien (siehe Tabelle 3.4) kultiviert. Die schweren RPMI-Medien enthielten jeweils zwei Monosaccharide. Eine der beiden Hexosen war vollständig C¹³-isotopenmarkiert, die andere entsprach dem natürlichen Isotopenverteilungsmuster. Es wurden schwere RPMI-Medien mit folgenden Hexosekombinationen verwendet:

- D-Mannose-¹³C₆, D-Glukose
- D-Mannose, D-Glukose-¹³C₆
- D-Galaktose-¹³C₆, D-Glukose
- D-Galaktose, D-Glukose-¹³C₆

1,3 mio HEK293T-Zellen wurden auf einer p60-Zellkulturschale ausgesät. Die Kultivierung fand für 18 – 21 h in RPMI-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ statt. Anschließend wurde das Medium entfernt und gegen schweres RPMI-Medium ausgetauscht. Die Inkubation fand unter den oben angegebenen Bedingungen für 30, 60 und 180 min statt. Nach dem Ablauf der jeweiligen Zeit wurde das Medium entfernt und die Zellen vorsichtig mit Hilfe von PBS von der Zellkulturschale abgelöst und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Darauf folgte die Pelletierung bei 1 min, 500 × g, 4 °C. Das PBS wurde entfernt und das Zellpellet sofort durch 1 ml TRI Reagent[®] resuspendiert. Die 30 min Messpunkte wurden für 40 min inkubiert, die 60 min und 180 min für 5 min. Die weitere Isolation der RNA erfolgte wie in Abschnitt 3.3.2 (Allgemeine Schritte) beschrieben, durchgeführt.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Mäuse für Organstudien

Für die Organstudien wurden je drei männliche Mäuse von der selben Mutter verwendet. Die neugeborenen Mäuse waren ein Tag alt, die adulten waren drei Monate und fünf Tage alt.

3.3.2 RNA Isolation

Spezifische Schritte

Alle RNA Isolationen wurden mit der TRI Reagent® Lösung von SIGMA-ALDRICH durchgeführt. Der Aufschluss der Proben war vom Ausgangsmaterial abhängig und wird im Folgenden beschrieben.

Escherichia coli: Die Zellkultur wurde zunächst bei $3.220 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 20 min zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet sofort in TRI Reagent® resuspendiert. Das Resuspendieren erfolgte mit Hilfe eines Vibrationsmischers. Anschließend wurde die Lösung 10 min inkubiert.

Das Verhältnis von TRI Reagent® zu den Zellen war abhängig davon, ob die gesamte RNA isoliert werden sollte oder RNA in der kleiner RNAs angereichert (*small enriched total RNA* (setRNA)) sind. Sofern die gesamte RNA isoliert werden sollte, wurde 1 ml TRI Reagent® je 1 ml Zellkultur (OD_{600} 2,5) eingesetzt. Bei der Isolation von angereicherter RNA wurden je Milliliter Kultur (OD_{600} 2,5) 100 μl TRI Reagent® eingesetzt.

Zellkultur: Das Kultivierungsmedium wurde zunächst entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um alle Rückstände des Mediums zu entfernen. Danach wurden die Zellen direkt mit TRI Reagent® von der Zellkulturflasche geerntet. Es wurde ein Verhältnis von 1 ml TRI Reagent® pro p60 bzw. T25 verwendet. Bei einer größeren Zellkulturflasche wurde entsprechend hochskaliert. Es wurde je 1 ml der Lösung in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und 10 min inkubiert.

Zelllinien wie HEK293T, die leicht von der Zellkulturflasche abgelöst werden können, wurden bereits mit dem PBS von der Flasche abgelöst. Die Zelllösung wurde dann in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und durch das Zentrifugieren (1 min, $500 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) pelletiert. Das PBS wurde entfernt und die Zellen direkt in TRI Reagent® resuspendiert. Anschließend wurden sie 10 min inkubiert.

Gewebe: Das Gewebe wurde direkt bei der Organentnahme in 50 – 100 mg große Stücke geteilt und in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Es wurde dann unmittelbar in flüssigen

Stickstoff gefroren. Die Lagerung fand bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ statt. Die gefrorenen Proben wurden nach der Entnahme vom Lagerungsort direkt mit TRI Reagent[®] versetzt. Pro 50 – 100 mg wurde 1 ml TRI Reagent[®] eingesetzt. Die Probe wurde anschließend mit Hilfe der Schwingmühle aufgeschlossen. Dies erfolgte durch einen vierminütigen Aufschluss bei 20 Hz mit anschließender Wiederholung für eine Minute bei 30 Hz. Bei schwer aufzuschließenden Gewebeproben erfolgte eine weitere einminütige Wiederholung bei 30 Hz. Anschließend wurde das Lysat in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß übertragen.

Allgemeine Schritte

Die weiteren Schritte waren für alle gleich und werden unten beschrieben.

Die Lösung wurde nach der Inkubation mit 200 μl Chloroform versetzt mit Hilfe des Vibrationsmischers gemischt und anschließend 15 min bei $12.000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Anschließend wurde die obere klare Phase in eine neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die überführte Phase wurde mit 500 μl Isopropanol versetzt und gut gemischt. Die Fällung der RNA fand bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht gefällt. Die Proben wurden direkt für 30 min bei $21.130 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Danach wurde 1 ml 75 % (v/v) kalter Ethanol ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) hinzugegeben und abermals für 20 min bei $21.130 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die letzten drei Schritte wurden zwei weitere Male wiederholt. Der Überstand wurde abermals abgenommen und das Pellet wurde bis zur Trockenheit an der bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde das Pellet in membrangefiltertem Wasser gelöst.

3.3.3 RNA Fällung

Sofern die isolierte RNA mit Phenol verunreinigt war wurde eine Natriumacetat-Fällung durchgeführt. Hierfür wurde die Lösung mit dem 0,1 fachen Volumen einer 5 M Natriumacetatlösung (pH-Wert nicht eingestellt) versetzt und gut gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Lösung das 2,5 fache Volumen absoluten Ethanol hinzugegeben, gemischt und über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Mindestens aber für zwei Stunden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Darauf folgend wurde die Lösung für 20 min bei $21.130 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und es wurde ein variables Volumen 75 % (v/v) kalter Ethanol ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) hinzugegeben. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei $21.130 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 20 min. Die letzten drei Schritte wurde ein weiteres Mal wiederholt und anschließend die Lösung, ohne das Pellet zu berühren, entfernt. Das Pellet

wurde bis zu der Trockenheit bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde das Pellet in Membran-gefiltertem Wasser gelöst.

3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden 1,5 % Agarosegele verwendet um RNA-Fragmente der Größe nach aufzutrennen. 1,5 % Agarose (w/v) wurde in $1 \times$ TAE-Puffer gegeben und in der Mikrowelle für einige Minuten bis zum Schmelzen erwärmt. Vor dem Gießen wurde das Gel mit 0,004 – 0,006 % (v/v) peqGREEN gemischt. Zu den Proben wurde das selbe Volumen Ladepuffer (*RNA Loading Dye*) hinzugegeben. Der Größenstandard wurde ebenfalls für jedes Gel frisch angesetzt. 2 μ l Größenstandard wurden mit 8 μ l Ladepuffer gemischt. Anschließend wurden die Proben als auch der Größenstandard für 2 min bei 90 °C denaturiert und danach sofort auf Eis gestellt. Die Größenauftrennung erfolgte für 60 min bei 100 V. Puffer, Ladepuffer und Größenstandards sind in Tabelle 3.5 und 3.8 aufgeführt.

3.3.5 TBE-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das TBE-Polyacrylamidgel wurde nach dem Rezept in Tabelle 3.6 angesetzt und im Gussrahmen ausgehärtet. Nachdem das Gel in die Elektrophoresekammer übertragen wurde, wurde die Kammer mit 1:10 verdünnten $10 \times$ TBE-Puffer gefüllt. Dann wurde zunächst eine Elektrophorese ohne Proben für 20 min, 15 mA durchgeführt. Danach wurden die Taschen durch direktes Reinpipettieren des $1 \times$ TBE-Puffers gespült. Die Proben sowie der Größenstandard wurden mit dem gleichen Volumen $2 \times$ TBE-Ladepuffer gemischt. Die Proben wurden geladen und es erfolgte eine Elektrophorese bei einem Konstanten Amperewert von 15 mA für 80 min. Nach der Elektrophorese wurde das Gel entnommen und in 100 ml $1 \times$ TBE-Pufferlösung mit 10 μ l SYBR-Green für 20 min gefärbt.

3.4 Proteinschemische Methoden

3.4.1 Organentnahme und -aufschluss

Die Leber einer ein Monat alten Maus wurde bei der Organentnahme direkt in 50 – 100 mg schwere Teile zerlegt und in je ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml vorgelegtem Puffer MTL überführt. Das Reaktionsgefäß wurde auf Eis gelagert. Die Gewebestücke wurde mit Hilfe einer Schwingmühle zerkleinert. Dies erfolgte durch zwei vierminütige Aufschlüsse bei

20 Hz mit anschließender Wiederholung für eine Minute bei 30 Hz.

Eine Alternative zu der oben genannten Methode war der Aufschluss über das Pürieren. Hierbei wurde die Leber direkt bei der Entnahme in 50 ml Puffer MTL überführt. Der Aufschluss erfolgte durch mehrmaliges Pürieren. Dabei wurde der Pürierer mit mehreren Pausen bedient, um ein wärmer werden der Lösung bestmöglich zu verhindern. Die Puffer sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

3.4.2 Abtrennen der Zelltrümmer und Dialyse

Die Trennung der nicht löslichen Proteine und Zelltrümmer von den löslichen Proteinen erfolgte bei $38.000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 90 min. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig in eine neues 50 ml Gefäß überführt. Der Überstand wurde durch einen Spritzenvorsatzfilter mit einer $0,2\text{ }\mu\text{m}$ Zellulose-Acetat-Membran filtriert, um größere nicht abgetrennte Schwebstoffe zu entfernen. Das filtrierte Lysat wurde dann in eine Dialysekassette (Porengröße: 3,5 kDa) überführt. Die Dialyse erfolgte für eine Stunde gegen 2 L und dann über Nacht gegen 2 L bzw. 5 L Puffer MTA. Puffer sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

3.4.3 Proteinreinigung

Das dialysierte Lysat wurde über eine Säulenchromatografie gereinigt. Hierfür wurde das ÄKTA pure System der Firma GE HEALTHCARE verwendet. Es wurde eine HiTrap-DEAE-FF-Säule (5 ml) der gleichen Firma eingesetzt. Die Säule wurde auf den Puffer MTA äquilibriert. Der Probenauftrag fand über einen 50 ml *Superloop* der gleichen Firma statt. Nach dem Probenauftrag wurde die Säule mit fünf Säulenvolumen Puffer MTA gewaschen. Anschließend wurde mit Puffer MTB linear über 20 Säulenvolumen eluiert. Die Fraktionsgröße während des Probenauftrags und Waschschrattes betrug 50 ml während der Elution 3 ml. Puffer sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

3.4.4 Enzym Assay

Die Enzymversuche wurden basierend auf einer Veröffentlichung von *Okada* (Abbildung 2) durchgeführt.¹⁹³ Der Enzym Assay sollte die verschiedenen Fraktionen auf die *tRNA-queuosine β -mannosyltransferase*-Aktivität testen. Das Endvolumen des Reaktionsansatzes betrug 400 μl , wovon 100 μl aus der jeweiligen Fraktion waren. Die finalen Puffer-

3.5. METHODEN DER VERÖFFENTLICHUNG

bedingungen waren 10 μM Tris-HCl (pH 7,5), 5 μM MgCl_2 , 1 μM GDP-Mannose, 0,5 – 0,7 A_{260} setRNA (siehe Abschnitt 3.3.2 (*Escherichia coli*)) und ein variabler Anteil an NaCl der durch die jeweilige Fraktion hinzu kam. Durch die Zugabe von 40 μl 10 \times MTR Enzypuffer (siehe Tabelle 3.7) wurden die Pufferbedingungen stabil gehalten. Der Säulenfluss lag die ganze Zeit über bei 2,5 ml/min. Die Reaktion wurde durch die Zugabe der GDP-Mannose gestartet. Sie wurde für zwei Stunden bei 37 °C durchgeführt und durch einfrieren (-20 °C) gestoppt. Als Versuchsreferenz für die Analyse diente ein Leerversuch in dem alle Bestandteile außer der GDP-Mannose zugegeben wurden.

3.4.5 RNA Extraktion

Die Proben wurden durch Vakuumkonzentrator auf ein Volumen von 20 – 50 μl eingengt. Anschließend wurden sie mit 500 μl TRI Reagent[®] und 200 μl Chloroform versetzt. Alle weiteren Schritte wurden wie in Abschnitt 3.3.2 (Allgemeine Schritte) beschrieben durchgeführt.

3.5 Methoden der Veröffentlichung

Supporting Information

**ALKBH5-Induced Demethylation of Mono- and Dimethylated
Adenosine**

Timm T. Ensfelder, ‡^a Matthias Q. Kurz, ‡^a Katharina Iwan, ‡^a Simon Geiger,^a Sarah Matheisl,^b
Markus Müller,^a Roland Beckmann,^b Thomas Carell,^{*a}

Center for Integrated Protein Science (CiPS^M) at the Department of Chemistry, Ludwig-
Maximilians-Universität München, Butenandtstrasse 5–13, 81377 Munich.

Gene Center and Department of Biochemistry, Ludwig-Maximilians-Universität München,
Feodor-Lynen-Straße 25, 81377 Munich.

E-mail: Thomas.Carell@cup.uni-muenchen.de

Index

1. General methods.....	3
2. RNA-oligonucleotide solid Phase Synthesis	3
RNA oligonucleotide sequences.....	4
3. Biochemical methods.....	4
Ribosome isolation by Ultracentrifugation and rRNA isolation	4
Protein expression and purification	4
ALKBH5 enzyme assay	5
4. Analytical methods	6
RNA digestion	6
UHPLC/MS-MS analysis of RNA samples.....	6
Determination of extinction coefficients	7
Quantification of nucleosides.....	7
5. Supplementary Tables.....	9
6. Literature.....	11

1. General methods

Acetonitrile for HPLC-purification of nucleoside standards and oligonucleotides were purchased from VWR. Triethylamine and acetic acid (glacial) for HPLC buffer preparation was purchased from *Sigma-Aldrich* resp. from *Fisher Scientific*. Water of LC-MS grade was purchased from *Honeywell*. Acetonitrile of LC-MS grade was purchased from *Carl Roth GmbH + Co. KG*. Formic acid was purchased from *Fluka*, p.a. for mass spectrometry. Water was purified by an arium[®] pro DI Ultrapure Water System from *Satorius Stedim biotech*. Nuclease S1 (*Aspergillus oryzae*) was obtained from *Sigma Aldrich*, snake venom phosphodiesterase I (*Crotalus adamanteus*) from *USB corporation* and antarctic phosphatase from *New England Biolabs*.

2. RNA-oligonucleotide solid Phase Synthesis

The phosphoramidites of m⁶A and m⁶₂A were synthesised according to literature^{1,2}

The m⁶A and m⁶₂A containing RNA oligonucleotides were synthesised on an ABI 394 DNA/RNA Synthesizer (*Applied Biosystems*) using typical reagent concentrations [deprotection: 3% dichloroacetic acid in DCM (*emp biotech*), activator: 0.3 M benzylthiotetrazole in MeCN (*Link Technologies*), capping: Capping A (ABI) & Capping B (ABI) solution (*J.T. Baker*), oxidation: Oxidizing (ABI) solution (*J.T. Baker*)]. The oligonucleotide synthesis were carried out on 1 μmol scale with CPG carriers (*SynBase* CPG 1000/110) and 0.1 M solutions in MeCN of TBDMS-protected standard RNA phosphoramidites (U, dmf-G, Ac-C and Bz-A) obtained from *Link Technologies*. Both modified phosphoramidites, m⁶A and m⁶₂A were incorporated into RNA using the standard protocol but the coupling times were increased to 20 min.

After synthesis, the CPG material from the cartridges were treated with 1 mL of AMA solution (28% NH₄OH in H₂O/ 40% MeNH₂ in H₂O, 1:1) first at room temperature for 5 min and secondly at 65 °C for 5 min to ensure complete cleavage of the oligonucleotide from the resin and basic deprotection. The AMA solution was removed *in vacuo*. The residue was dissolved in DMSO (100 μL) and Et₃N·3HF was added and the mixture was heated to 65 °C for 90 min. After the addition of a NaOAc solution (3 M, pH=5.5, 25 μL) the oligonucleotides were precipitated by addition of *n*-BuOH (1 mL) and cooling to -80 °C for 12 h. The suspension was centrifuged at 4 °C with 21130 x g for 60 min to pelletise the crude oligonucleotides. Further purification and analysis of the final product was performed on a Waters HPLC system (preparative HPLC: 1525 with 2487 UV detector, analytical HPLC: Waters Alliance 2695 with PDA 2996) with Nucleodur C-18 Columns from *Macherey Nagel*. The used gradient was 0.1 M Triethylammonium acetate in water and 80% MeCN. The purified oligonucleotides were

desalted using Sep-Pak C18 Classic Cartridges (*Waters*) before further usage and the identity was confirmed by MALDI-ToF-MS.

RNA oligonucleotide sequences

ORN-1: 5'-G-G-m⁶A-C-U-3'

ORN-2: 5'-G-U-G- m⁶A - m⁶A -C-U-U-3'

ORN-3: 5'-G-G-m⁶₂A-C-U-3'

ORN-4: 5'-G-U-G- m⁶₂A - m⁶₂A -C-U-U-3'

3. Biochemical methods

Ribosome isolation by Ultracentrifugation and rRNA isolation

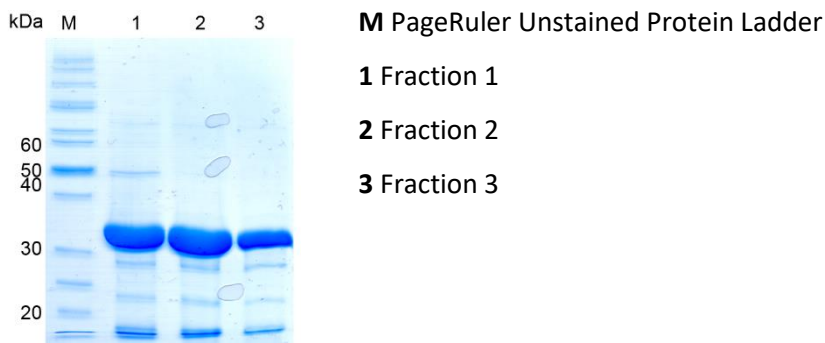
Native ribosomes were isolated from pelleted HEK 293T cells. $10 \cdot 10^7$ cells were resuspended in 6 mL of lysis buffer (50 mM Tris·HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 0.5% NP-40 Substitute, 0.2 U/μL RNasin). Lysis was performed by incubating the cells in lysis buffer for 30 min at 4 °C. Cell debris was removed by centrifugation (*Eppendorf* FA-45-24-11 rotor, 5 min, 12000 x g, 4 °C). The supernatant was then incubated with a final Puromycin concentration of 1 mM for 15 min at RT and another 15 min at 4 °C. After the incubation the supernatant was loaded on sucrose cushion buffer (50 mM Tris·HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 30% (w/v) sucrose, 0.2 U/μL RNasin). The ribosomes were pelleted by centrifuging for 15 h 30 min (*Beckman Coulter* TLA 120.2, 24001 x g, 4 °C).

The supernatant was removed. The pellet was resuspended in resuspension buffer (50 mM Tris·HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 3.48% (w/v) sucrose) over a time of 2 h on ice. Any possible impurity was removed by another centrifugation (*Eppendorf* FA-45-24-11 rotor, 1 min, 12000 x g, 4 °C). The ribosome concentration was determined by measuring the A₂₆₀. The rRNA was isolated from the ribosome solution using the Monarch[®] Total RNA Miniprep Kit by *NEB* according to its protocol.

Protein expression and purification

A pNIC28-Bsa4 vector which is encoding an N-terminal His₆-tagged ALKBH5₆₆₋₂₉₂, was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). Expression was performed in ZYM-5052 auto induction medium without trace metals, for 3 h at 37 °C and 17 h to 20 h at 20 °C and 300 rpm. The cells were harvested by centrifugation (*Thermo Fisher Scientific* Fiberlite™ F10-4 x 1000 LEX rotor, 11970 x g, 4 °C, 8 min) and stored at -20 °C. A ratio of 10:1 (1 mL buffer per 0.1 g pellet) was used to resuspend the cell pellet in lysis buffer (50 mM Tris·HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM Imidazol). Furthermore cComplete™ EDTA free protease inhibitor (*Sigma-Aldrich*) and Lysozyme were added. After an incubation of 30 min on ice, the cells were lysed by sonification on ice. The cell debris was removed by centrifugation (*Thermo Fisher Scientific* Sorvall SS-34 rotor, 38720 x g, 4 °C, 30 min). The lysate was filtered and applied to a HisTrap HP (5 mL) by *GE Healthcare*. To remove unspecific binding proteins the column was washed with 8%

elution buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 365 mM imidazole). Elution was performed with a step gradient over ten column volumes. Purification was evaluated with a 15% SDS-PAGE (Marker *Thermo Scientific PageRuler Unstained Protein Ladder* #26614). On average the purity was at 90% after one step. The buffer was changed to the assay buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM KCl) via dialysis overnight. After dialysis the enzyme solution was centrifuged for 5 min at 21130 x g and 4 °C to remove precipitated protein. The enzyme concentration was evaluated with Bradford.

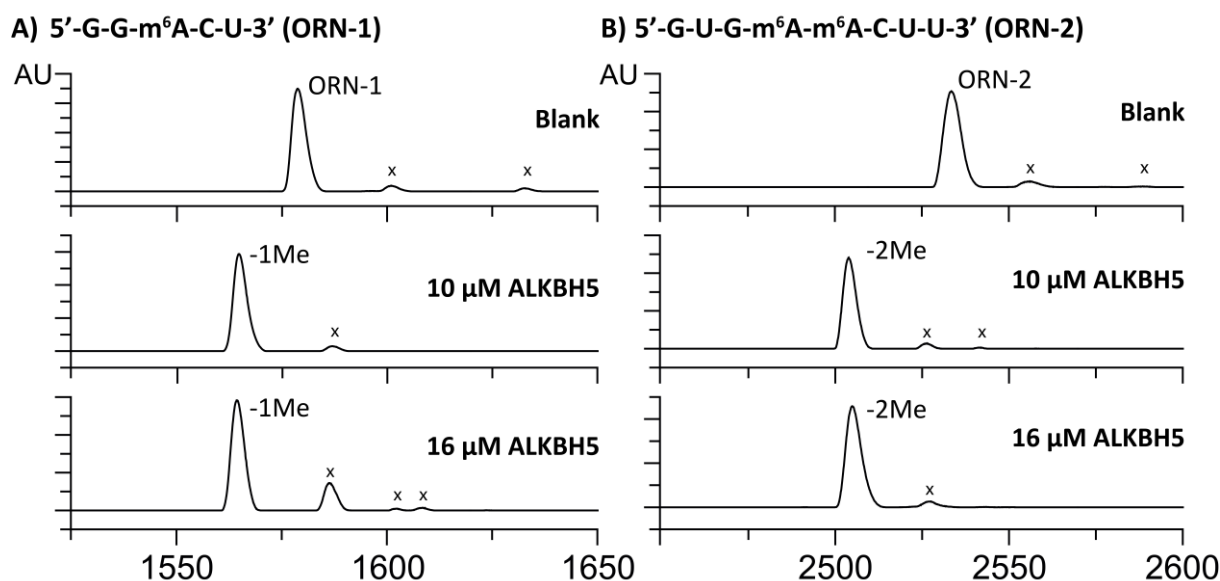


Supplementary Figure 1 ALKBH5 after one purification step. Fraction 2 was used for the enzyme assay with ORN-1 to ORN-4. Estimated purity is 90%.

ALKBH5 enzyme assay

ALKBH5₆₆₋₂₉₂ was always used directly without freezing it for storage. Every assay was performed in a volume of 50 μ L and as a triplicate. Only the assay with rRNA and 16 μ M ALKBH5 were performed as a duplicate. The final assay mixture was 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM KCl, 2 mM L-ascorbate, 300 μ M α -ketoglutarate, 300 μ M diammonium iron(II) sulfate hexahydrate complex. Assays with native ribosomes did contain 150 mM KCl instead of 15 mM and also contain sucrose and MgCl₂ with a final concentration of 3.48% (w/v) and 6 mM. In all assays with rRNA, a murine RNase inhibitor was added with a final concentration of 1 U/ μ L. The L-ascorbate, α -ketoglutarate and diammonium iron(II) sulfate hexahydrate solutions were made afresh. The concentration of the synthetic RNA oligonucleotides (ORN 1-4) was 10 μ M. The rRNA concentration was 101.5 nM (11.9 μ g) and ribosome concentration was 250 nM. The enzyme concentration was either 10 μ M or 16 μ M ALKBH5₆₆₋₂₉₂.

All assays with ORNs or rRNA were incubated at 37 °C for 1 h. Assays with native ribosomes were incubated in a Thermomixer for 4 h at 37 °C and 1000 rpm. Assays with rRNA and native ribosomes were immediately stored at -20 °C for further RNA extraction. Every assay with synthetic RNA oligonucleotides was directly desalted (up to 30 min) on a *Merck Millipore* MF™ VSWP-membrane (0.025 μ M) for an analysis by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry. A 3-Hydroxypicolinic acid (3-HPA) matrix was used. The native ribosomes and rRNA extraction from the assays was done with the Monarch® Total RNA Miniprep Kit by *NEB*.



Supplementary Figure 2 (A and B) MALDI-ToF spectra of ORN-1 and ORN-2 and their demethylation products (-xMe) at different concentrations of ALKBH5₆₆₋₂₉₂. The sodium signals in the spectra are marked with an “x”.

4. Analytical methods

RNA digestion

1.0 μg of RNA in 35 μL H₂O were digested as follows: An aqueous solution (7.5 μL) of 480 μM ZnSO₄, containing 18.4 U nuclease S1 (*Aspergillus oryzae*, Sigma-Aldrich), 5 U Antarctic phosphatase (*NEB*) and specific amounts of labelled internal standards ([D₃]-m⁶₂A, [D₃]-m⁶A) were added, and the mixture was incubated at 37 °C for 2 h. After addition of 7.5 μL of a 520 μM [Na]₂-EDTA solution, containing 0.15 U snake venom phosphodiesterase I (*Crotalus adamanteus*, USB corporation), the sample was incubated for 2 h at 37 °C and then stored at -20 °C. Prior to UHPLC-MS/MS analysis, samples were filtered by using an AcroPrep Advance 96 filter plate 0.2 μm Supor (*Pall Life Sciences*).

UHPLC/MS-MS analysis of RNA samples.

Quantitative UHPLC-MS/MS analysis of digested RNA samples was performed using an Agilent 1290 UHPLC system equipped with a UV detector and an Agilent 6490 triple quadrupole mass spectrometer. For exact quantification of m⁶A and m⁶₂A internal quantification with the stable isotope dilution technique was developed (Supplementary Fig. 2 and Supplementary Tab. 2 and 3). The canonical nucleosides (C, U, G, A) were measured and quantified with the UV-detector (Supplementary Tab. 3). The source-dependent parameters were as follows: gas temperature 80 °C, gas flow 15 L/min (N₂), nebulizer 30 psi, sheath gas heater 275 °C, sheath gas flow 11 L/min (N₂), capillary voltage 2,500 V in the positive ion mode and nozzle voltage 500 V. The fragmentor voltage was 380 V. Delta EMV was set to 500 (positive mode). Compound-dependent parameters are summarized in Supplementary Table 1. Chromatography was performed by a Poroshell 120 SB-C8 column (*Agilent*, 2.7 μm, 2.1 mm × 150 mm)

at 35 °C using a gradient of water and MeCN, each containing 0.0075% (v/v) formic acid, at a flow rate of 0.35 mL/min: 0 →6 min; 0 →6.0% (v/v) MeCN; 6 →7 min; 6.0 →40% MeCN; 7 →10.8 min; 40 →80% MeCN; 10.8 →12.50 min; 80% MeCN; 12,50 →13.50 min; 80 →0% MeCN; 13.5 →15 min; 0% MeCN. The effluent up to 1.1 min and after 14 min was diverted to waste by a Valco valve. The autosampler was cooled to 4 °C. The injection volume was amounted to 39 µL.

Determination of extinction coefficients

For the following absolute internal quantification of nucleosides the exact concentration of the isotopically labeled internal standards needs to be known. In order to measure the concentrations one needs to determine the extinction coefficients first. For this determination, m^6A and m^6_2A were diluted in D_2O as well as the reference nucleoside U. The absorbance of all three solutions were measured as technical quintuplets on the *NanoDrop* 1000 Spectrophotometer for the λ_{max} of each nucleoside. Subsequently, a 1:1 mixture of m^6A and U as well as m^6_2A and U was prepared, each mixture as a technical triplicate. Following 1H -NMR measurements of these mixtures resulted in specific ratios of the amount $n(m^6A)$ to the amount $n(U)$, respectively $n(m^6_2A)$ to $n(U)$. 1H -NMR spectra were recorded on *Bruker Avance III HD* 800 MHz. By applying the Beer-Lambert law one can calculate the actual concentration $c(U)$ solution with the literature known extinction coefficient (ϵ_λ). With the ratio of $n(U)$ to $n(m^6A)$, respectively $n(U)$ to $n(m^6_2A)$, one can calculate the concentrations $c(m^6A)$ and $c(m^6_2A)$ in each solution. Applying again the Beer-Lambert law results in the desired extinction coefficients of the two nucleosides $\epsilon_\lambda(m^6A)$ and $\epsilon_\lambda(m^6_2A)$ at a specific wavelength λ (see Supplementary Table 1).

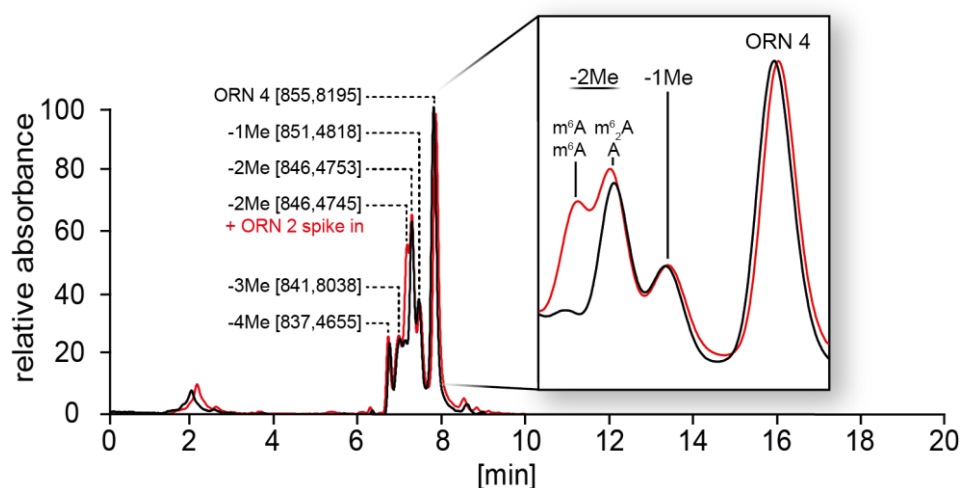
Quantification of nucleosides

In order to obtain the internal calibration curves for exact quantification, each standard, namely $[D_3]$ - m^6A and $[D_3]$ - m^6_2A was analyzed in comparison to the corresponding non-labelled nucleoside with constant concentration. Technical triplicates were measured and the linear regression was applied using *Origin® 6.0 (Microcal™)*. Therefore, the ratio of the area under the curve of unlabeled nucleoside (A) to the labelled standard (A*) was plotted against the ratio of the amount of unlabeled nucleoside (n) to the labelled one (n*) (see Supplementary Fig. 2). In order to obtain the UV calibration curves for quantification of the canonical nucleosides, namely C, U, G and A were measured in a concentration series. For every nucleoside two different solutions were diluted with a dilution factor of two in order to get five different concentrations for every nucleoside, which were measured as technical triplicates. The UV area under the curve (A) was plotted against the amount of the nucleoside (n) (see Supplementary Tab. 3). Acceptable precision (< 20% relative s.d. within each triplicate) and accuracy (80-120%) was achieved for all calibration curves. The accuracy is calculated as the ratio of the measured to the calculated ratios of the areas (A/A^*) under the curves in percent. The ratios of the areas (A/A^*) can be calculated by using the linear equations for the corresponding ratio of amount

(n/n^*). The lower limit of detection was defined as the detected amount, which is three times higher than the blank response (LOD). The lower limit of detection (LLOQ) and the upper limit of detection (ULOQ) are the lowest, respectively the highest amount (n) and ratio of the amounts (A/A^*) fulfilling the requirements of the corresponding linear equation.

LC-MS analysis of ORN-4

The analysis of the ORN-4 assay with $16\mu\text{M}$ ALKBH5₆₆₋₂₉₂ were analyzed by LC-ESI-MS on a Thermo Finnigan LTQ Orbitrap XL and were chromatographed by a Dionex Ultimate 3000 HPLC system with a flow of 0.15 mL/min over a *Phenomenex Synergi*TM $2.5\mu\text{m}$ Fusion-RP 100 \AA C18 column. The column temperature was maintained at $30\text{ }^\circ\text{C}$. The used eluting buffers were buffer A ($10\text{ mM NH}_4\text{OAc}$ in H_2O ($\text{pH } 7$)) and buffer B (MeCN). The elution was monitored at 260 nm (*Dionex Ultimate 3000 Diode Array Detector*). The chromatographic eluent was directly injected into the ion source without prior splitting. Ions were scanned by use of a positive polarity mode over a full-scan range of m/z $120\text{-}2000$ with a resolution of 30000 .



Supplementary Figure 3 HPL chromatogram of the incubation of ORN-4 with $16\text{ }\mu\text{M}$ ALKBH5₆₆₋₂₉₂ (black line) and with a spike in of ORN-2 (red line). The measured mass of the different species is shown in square brackets ($[(M+3H)]^{+3}$)

5. Supplementary Tables

Supplementary Table 1 Determined extinction coefficients for m⁶A and m⁶₂A.

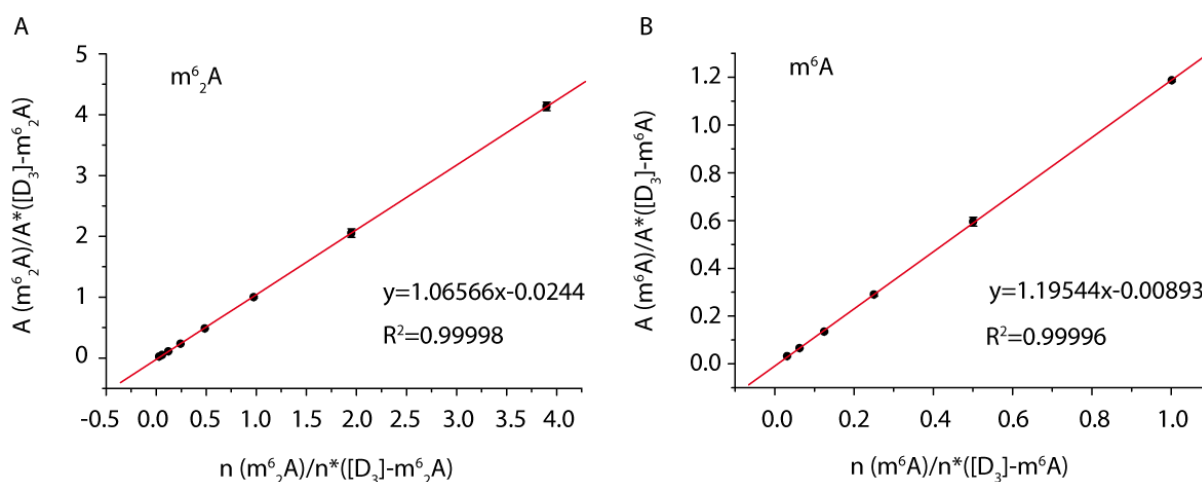
compound	$\epsilon_{\lambda_{\max}} (\lambda_{\max}) [\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}]$	$\epsilon_{\lambda=260\text{nm}}[\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}]$
m ⁶ A	15474 (267 nm)	-
m ⁶ ₂ A	19047 (274 nm)	12623

Supplementary Table 2 Compound-dependent LC-MS/MS-parameters used for the analysis of RNA. CE: collision energy, CAV: collision cell accelerator voltage, EMV: electron multiplier voltage. The nucleosides were analyzed in the positive ([M+H]⁺ species) ion selected reaction monitoring mode (SRM).

compound	Precursor ion (m/z)	MS1 Resolution	Product Ion (m/z)	MS2 Resolution	Dwell time [ms]	CE (V)	CAV (V)	Polarity
Time segment 2.4-14 min								
[D ₃]-m ⁶ ₂ A	299.15	Wide	167.11	Wide	60	2	5	Positive
m ⁶ ₂ A	296.14	Wide	164.11	Wide	60	2	5	Positive
[D ₃]-m ⁶ A	285.14	Wide	153.10	Wide	60	2	5	Positive
m ⁶ A	282.12	Wide	150.08	Wide	60	2	5	Positive

Supplementary Table 3 Compound-dependent LC-MS/MS ranges of the corresponding linear equations.

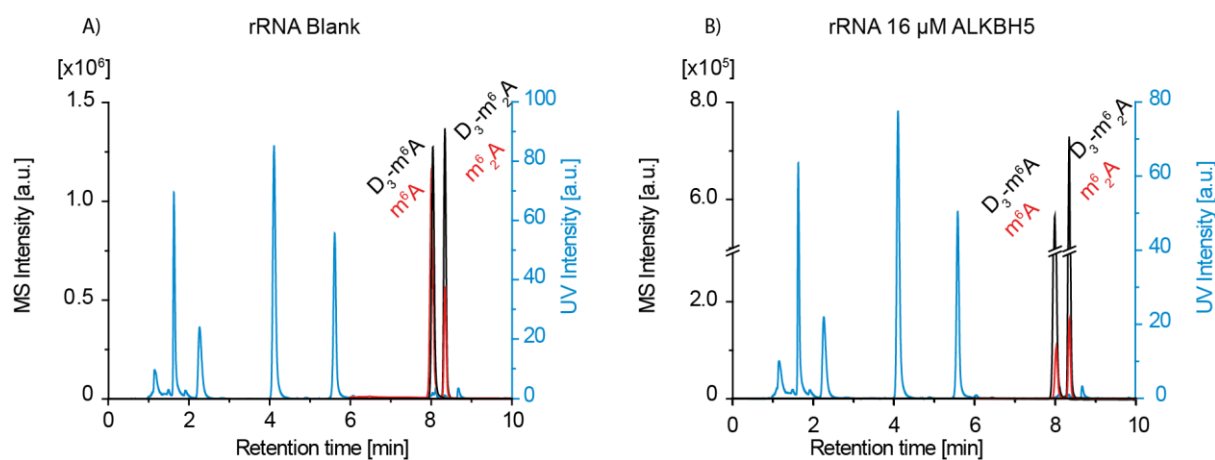
compound	n (ULOQ) [pmol]	n (LLOQ) [pmol]	A/A* (ULOQ)	A/A* (LLOQ)
m ⁶ ₂ A	3.104	0.049	4.13	0.040
m ⁶ A	1.709	0.053	1.18	0.029



Supplementary Figure 4 Internal calibration curves for the exact quantification of m^6_2A (A) and m^6A (B) with the corresponding linear equation and coefficient of determination.

Supplementary Table 4 Compound-dependent UV ranges and the corresponding linear equations of the canonical nucleosides.

compound	linear regression	n (ULOQ) [pmol]	n (LLOQ) [pmol]
C	$y=0.28955x+0.17515$	791	24.7
U	$y=0.45953x-0.34086$	792	24.7
G	$y=0.56985x-0.91256$	792	24.7
A	$y=0.62408x-0.10334$	659	20.6



Supplementary Figure 5 UV Chromatogram (blue) and MS trace (red: natural modification; black: isotopically labelled standard) of rRNA are shown, upon incubation with 16 μ M ALKBH5₆₆₋₂₉₂ (B) and without ALKBH5₆₆₋₂₉₂ (A).

6. Literature

1. R. R. Edupuganti, S. Geiger, R. G. H. Lindeboom, H. Shi, P. J. Hsu, Z. Lu, S.-Y. Wang, M. P. A. Baltissen, P. W. T. C. Jansen, M. Rossa, M. Müller, H. G. Stunnenberg, C. He, T. Carell and M. Vermeulen, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2017, **24**, 870-878.
2. C. Höbartner, C. Kreutz, E. Flecker, E. Ottenschläger, W. Pils, K. Grubmayr and R. Micura, *Monatsh. Chem.*, 2003, **134**, 851-873.

Anhang

Ergänzende Abbildungen

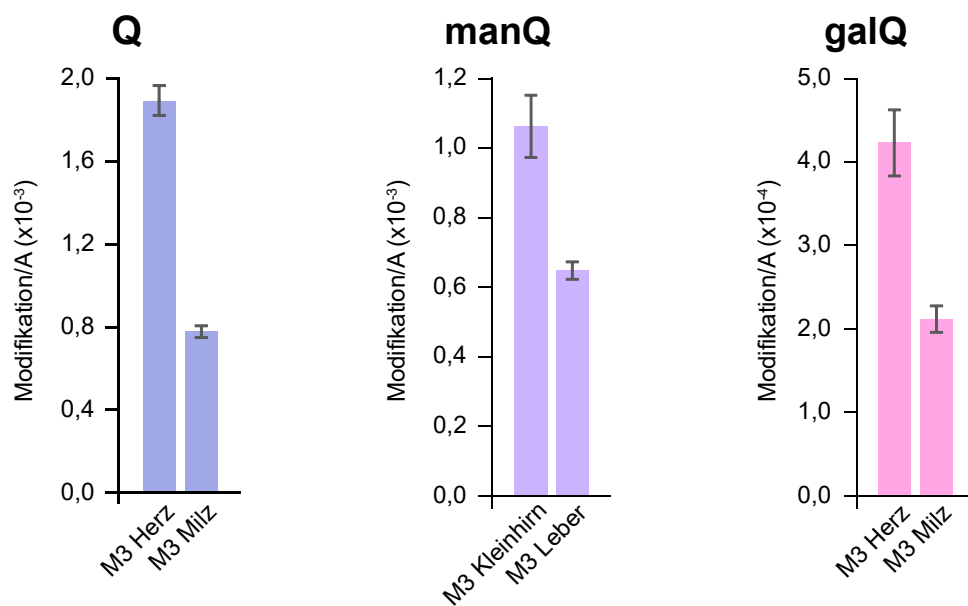


Abbildung 3.1: Abbildung der Organe mit dem jeweils höchsten und niedrigsten Modifikationslevel im adulten Alter (M3) für alle drei Modifikationen.

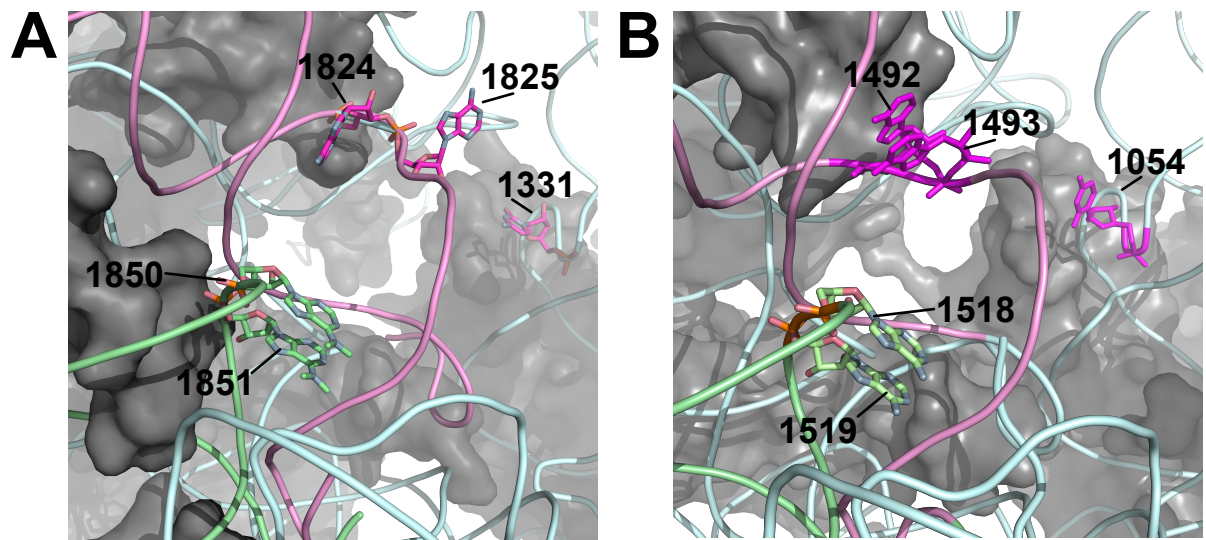


Abbildung 3.2: Referenzabbildung zu Abbildung 1.2. Die Positionen der Basen in der humanen ribosomalen Untereinheit wurden mit Hilfe der Datenbank *3D Ribosomal Modification Maps* ermittelt.²⁶ **A** Abbildung der humanen kleinen Untereinheit aus der Einleitung (PDB: 6QZP). **B** Abbildung der kleinen Untereinheit von *Thermus thermophilus* (PDB: 1J5E).

Liste der im LD-1-Stamm ausgeschalteten Gene

UniProt ID	Orf	Produkt
A0A4S4ZT51	fecA	<i>KpLE2</i> phage-like element; ferric citrate outer membrane transporter
A0A4S4NTW1	fecB	<i>KpLE2</i> phage-like element; iron-dicitrate transporter subunit
A0A4S4ZWL5	fecC	<i>KpLE2</i> phage-like element; iron-dicitrate transporter subunit
A0A4S5ALZ3	fecD	<i>KpLE2</i> phage-like element; iron-dicitrate transporter subunit
P15031	fecE	<i>KpLE2</i> phage-like element; iron-dicitrate transporter subunit
P23484	fecI	<i>KpLE2</i> phage-like element; RNA polymerase, sigma 19 factor
A0A4S4NL43	fecR	<i>KpLE2</i> phage-like element; transmembrane signal transducer for ferric citrate transport
A0A4S4PKU5	fimA	major type 1 subunit fimbriae (<i>pilin</i>)
A0A4S4YVS6	fimB	tyrosine recombinase/inversion of on/off regulator of <i>fimA</i>
A0A4S4PDJ8	fimC	periplasmic chaperone
P30130	fimD	outer membrane usher protein, type 1 fimbrial synthesis
A0A4S5RSP6	fimE	tyrosine recombinase/inversion of on/off regulator of <i>fimA</i>
A0A4S4P4E1	fimF	minor component of type 1 fimbriae
A0A4S4YD99	fimG	minor component of type 1 fimbriae
A0A4S4NXR8	fimH	minor component of type 1 fimbriae
P39264	fimI	fimbrial protein involved in type 1 pilus biosynthesis
A0A4S4Y9X5	gntP	fructuronate transporter
A0A4S4PM05	hsdM	DNA methyltransferase M
A0A4S5AYK7	hsdR	endonuclease R Type I restriction enzyme
A0A4S5AYU7	hsdS	specificity determinant for <i>hsdM</i> and <i>hsdR</i>
A0A4S4Y9J2	iadA	isoaspartyl dipeptidase
P39346	idnD	L-idonate 5-dehydrogenase, NAD-binding

LISTE DER IM LD-1-STAMM AUSGESCHALTETEN GENE

A0A4S4PMK0	idnK	<i>D-gluconate kinase, thermostensitive</i>
A0A4S4YFT3	idnO	<i>5-keto-D-gluconate-5-reductase</i>
A0A4V3YU72	idnR	<i>DNA-binding transcriptional repressor, 5-gluconate-binding</i>
A0A4S4YDJ5	idnT	<i>L-idonate and D-gluconate transporter</i>
P0CF40	insC1	<i>IS2 repressor ThpA</i>
P0CF53	insD1	<i>IS2 transposase ThpB</i>
P03835	insG	<i>IS4 transposase</i>
P0CF88	insI1	<i>IS30 transposase</i>
-	insO	-
P39347	intB	-
A0A4S4YDL8	iraD	<i>RpoS stabilizer after DNA damage, anti-RssB factor</i>
A0A4S4P4F2	kptA	<i>RNA 2'-phosphotransferase</i>
P15005	mcrB	<i>5-methylcytosine-specific restriction enzyme McrBC, subunit McrB</i>
A0A4S5RYS9	mcrC	<i>5-methylcytosine-specific restriction enzyme McrBC, subunit McrC</i>
A0A4S4Y9Z4	mdtM	<i>multidrug efflux system protein</i>
P24202	mrr	<i>methylated adenine and cytosine restriction protein</i>
P69856	nanC	<i>N-acetylneuraminic acid outer membrane channel protein</i>
A0A4S4Y9W6	nanM	<i>N-acetylneuraminic acid mutarotase</i>
P39370	nanS	<i>9-O-acetyl N-acetylneuraminic acid esterase</i>
A0A4S4Y9M4	opgB	<i>phosphoglycerol transferases I and II</i>
P39363	sgcA	<i>KpLE2 phage-like element; predicted phosphotransferase enzyme IIA component</i>
P58035	sgcB	<i>putative enzyme IIB component of PTS</i>
P39365	sgcC	<i>KpLE2 phage-like element; predicted phosphotransferase enzyme IIC component</i>
P39362	sgcE	<i>KpLE2 phage-like element; predicted epimerase</i>
A0A4S5AKL9	sgcQ	<i>KpLE2 phage-like element; predicted nucleoside triphosphatase</i>

LISTE DER IM LD-1-STAMM AUSGESCHALTETEN GENE

P39361	sgcR	<i>KpLE2 phage-like element; predicted DNA-binding transcriptional regulator</i>
P39366	sgcX	<i>KpLE2 phage-like element; predicted endoglucanase with Zn-dependent exopeptidase domain</i>
A0A4S4Y9S8	symE	<i>toxic peptide regulated by antisense sRNA symR</i>
P02942	tsr	<i>methyl-accepting chemotaxis protein I, serine sensor receptor</i>
A0A4S4YVT5	uxuA	<i>mannonate hydrolase</i>
P39160	uxuB	<i>D-mannonate oxidoreductase, NAD-dependent</i>
A0A4S4YEM9	uxuR	<i>DNA-binding transcriptional repressor</i>
P27250	yjgB	<i>putative alcohol dehydrogenase, Zn-dependent and NAD(P)-binding</i>
P39342	yjgR	<i>conserved protein, DUF853 family with NTPase fold</i>
P39349	yjgX	-
P39351	yjgZ	<i>KpLE2 phage-like element; putative protein</i>
P39352	yjhB	<i>putative transporter</i>
P39353	yjhC	<i>putative oxidoreductase</i>
P39354	yjhD	-
P39355	yjhE	-
P39357	yjhF	<i>KpLE2 phage-like element; predicted transporter</i>
P39358	yjhG	<i>KpLE2 phage-like element; predicted dehydratase</i>
P39359	yjhH	<i>KpLE2 phage-like element; predicted lyase/synthase</i>
P39360	yjhI	<i>KpLE2 phage-like element; predicted DNA-binding transcriptional regulator</i>
P39367	yjhP	<i>KpLE2 phage-like element; predicted methyltransferase</i>
P39368	yjhQ	<i>KpLE2 phage-like element; predicted acetyltransferase</i>
P39369	yjhR	-
P39356	yjhU	<i>putative DNA-binding transcriptional regulator; KpLE2 phage-like element</i>
Q47719	yjhV	-
A0A4S5B0B5	yjhX	<i>hypothetical protein</i>

LISTE DER IM LD-1-STAMM AUSGESCHALTETEN GENE

-	yjhY	-
-	yjhZ	-
P24203	yjiA	<i>putative GTPase</i>
P39374	yjiC	<i>hypothetical protein</i>
P39376	yjiE	<i>hypochlorite-responsive transcription factor</i>
P0AEH8	yjiG	<i>inner membrane protein, SpmB family</i>
P39379	yjiH	<i>putative inner membrane protein</i>
P39381	yjiJ	<i>putative inner membrane protein</i>
P39382	yjiK	<i>hypothetical protein</i>
P39383	yjiL	<i>putative ATPase, activator of (R)-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase</i>
P39384	yjiM	<i>putative 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase</i>
P39385	yjiN	<i>zinc-type alcohol dehydrogenase-like protein</i>
P0DP21	yjiP	-
P39389	yjiR	<i>fused predicted DNA-binding transcriptional regulator/predicted aminotransferase</i>
P39390	yjiS	<i>hypothetical protein</i>
P39391	yjiT	-
P39393	yjiV	-
P0ADC8	yjiX	<i>hypothetical protein</i>
P39396	yjiY	<i>putative inner membrane protein</i>
P18390	yjiA	<i>hypothetical protein</i>
P39398	yjiL	<i>L-galactonate transporter</i>
P39399	yjiM	<i>DNA-binding transcriptional activator for yjjMN; mutants fail to grow on L-galactonate</i>
P39400	yjiN	<i>L-galactonate oxidoreductase</i>
A8DYQ1	ythA	<i>hypothetical protein</i>
-	leuX	tRNA ^{Leu}

LISTE DER IM LD-1-STAMM AUSGESCHALTETEN GENE

-	ryjB	<i>novel sRNA, function unknown</i>
-	symR	<i>sRNA antisense regulator destabilizing divergent and overlapping symE mRNA</i>

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
× g	Mehrfaches der Erdbeschleunigung
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ahr	<i>Alcohol dehydrogenase</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg, R	Arginin
bp	<i>basepair</i> , Basenpaar
Brenda	<i>Braunschweig enzyme database</i>
cmnm ⁵ U _m	5-Carboxymethylaminomethyl-2-O-methyluridin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ddH ₂ O	didestilliertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIM1	Dimethyladenosine transferase
Dnmt2	<i>tRNA (cytosine(38)-C(5))-methyltransferase</i>
D-Stamm	Dihydrouracil-Stamm
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ExpASy	<i>Expert Protein Analysis System</i>
f ⁶ A	6-Formyladenosin
Fe	Ferrum, Eisen
Fig.	<i>Figure</i>
g	Gramm
GALK	Galaktokinase
GALM	Galaktose Mutarotase
GALT	<i>Galactose-1-phosphate uridylyltransferase</i>
Glu, E	Glumaninsäure

LISTE DER IM LD-1-STAMM AUSGESCHALTETEN GENE

Gly, G	Glycin
h	hours, Stunden
hm ⁶ A	6-Hydroxymethyladenosin
Hz	Hertz
i ⁶ A	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladenosin
IdnD	<i>L</i> -idonate 5-dehydrogenase
IdnO	5-keto-D-gluconate 5-reductase
IgoD	<i>L</i> -galactonate-5-dehydrogenase
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
L	Liter
LB	<i>Lysogeny broth</i>
Lys, K	Lysin
m	Milli (10 ⁻³)
M	mol×L ⁻¹
m/z	Massenzahl pro Ladungszahl
m ¹ A	1-Methyladenosin
m ³ T	3-Methylthymin
m ³ U	3-Methyluridin
m ₂ ⁶ A _m	<i>N</i> ⁶ -2-O-methyladenosin
min	minute, Minute
ml	Milliliter
ms ² hn ⁶ A	2-Methylthio- <i>N</i> ⁶ -hydroxynorvalyl-carbamoyladenosine
ms ² io ⁶ A	2-Methylthio- <i>N</i> ⁶ -4-hydroxyisopentenyladenosine
ms ² t ⁶ A	2-Methylthio- <i>N</i> ⁶ -threonylcarbamoyladenosine
ms ² i ⁶ A	2-Methylthio- <i>N</i> ⁶ -isopentenyladenosine
MtaB	Threonylcarbamoyladenosine tRNA methylthiotransferase MtaB
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺ /NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ncm ⁵ U _m	2'-O-Methyl-5-carbamoylmethyluridin
Nsun2	<i>RNA cytosine C(5)-methyltransferase NSUN2</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Polyacrylamidgelelektrophorese)
pH	potentia Hydrogenii
Phe, F	Phenylalanin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

LISTE DER IM LD-1-STAMM AUSGESCHALTETEN GENE

PreQ ₀	<i>7-Cyano-7-deazaguanine</i>
PreQ ₁	<i>7-Aminomethyl-7-deazaguanine</i>
QueA	<i>S-adenosylmethionine: tRNA ribosyltransferase-isomerase</i>
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
t ⁶ A	<i>Ntextsuperscript6-threonylcarbamoyladenosine</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRIS-HCl	TRIS Hydrochlorid
upm	Umdrehungen pro Minute
UV-VIS	<i>Ultraviolett-visible</i>
UxuA	<i>Mannonate dehydratase</i>
V	Volt
v/v	volume/volume (Volumen/Volumen)
Val, V	Valin
w/v	weight/volume (Gewicht/Volumen)

Abbildungsverzeichnis

0.1	Schematic illustration of the ms ² A biosynthesis pathway based on the data presented in this thesis.	VII
0.2	Schematische Darstellung der Biosynthese von ms ² A, auf Grundlage der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse.	IX
1.1	A Die fünf Basen leiten sich jeweils von dem Purin- bzw. Pyrimidingerüst ab. B Nummerierungsschema von RNA-Modifikationen. Neben der Base selbst kann auch die Hydroxylgruppe an der zweiten Position der Ribose methyliert werden. C Rechts: 6-Methyladenosin (m ⁶ A), als ein Beispiel für eine einfache Purinmodifikation. Links: 5-Carboxymethylaminomethyl-2'-O-methyluridine (ncm ⁵ U _m) als ein Beispiel für eine komplexe Pyrimidinmodifikation (Hypermodifikation).	2
1.2	Darstellung der humanen kleinen ribosomalen Untereinheit (PDB: 6QZP). Die Helix 44 ist in Altrosa und die Helix 45 in Grün dargestellt. A Ansicht von oben. Auf der linken Abbildung sind A ₁₈₅₀ , A ₁₈₅₁ dargestellt. Die Information für die Abbildung wurden teilweise der Veröffentlichung von <i>Zorbas</i> entnommen. ²³ B Seitliche Ansicht. Des Weiteren sind A ₁₈₂₄ , A ₁₈₂₅ und C ₁₃₃₁ dargestellt. Sie entsprechen A ₁₄₉₂ , A ₁₄₉₃ und C ₁₀₅₄ in den PDB-Einträgen (1J5E, 3OTO) aus der Publikation von <i>Demicri</i> . ²⁴ Eine Referenzabbildung befindet sich im Anhang. C Struktur von N ⁶ ,N ⁶ -Dimethyladenosin.	4
1.3	Generelles Reaktionsschema einer Fe(II)/αKG abhängigen Dioxygenase.	7
1.4	Darstellung der aktiven Taschen von ALKBH5 und FTO. Die Triade und das Mangan(II) sind in Rosa und Violett dargestellt. Das Mangan(II) ist ein Kristallisationsersatz für Eisen(II). Das m ⁶ A und die mit ihm wechselwirkenden Aminosäuren sind in grün. Das α-Ketoglutarat und die mit ihm wechselwirkenden Aminosäuren sind blau dargestellt. Links: Aktive Tasche von ALKBH5 mit α-Ketoglutarat (PDB: 4NRO). Rechts: Aktive Tasche von FTO mit m ⁶ A und N-Oxalylglycin (PDB: 5ZMD).	8

1.5	Links: Die generalisierte Sekundärstruktur der tRNA. Rechts: Eine schematische Darstellung der tRNA Tertiärstruktur. Beide Abbildungen wurden basierend auf Abbildungen in der Literatur erstellt. ^{108,109}	10
1.6	Gruppe der ms ² A-Modifikationen.	11
1.7	Möglicher Syntheseweg von ms ² A. Oben: Indirekter Weg über i ⁶ A und ms ² i ⁶ A. Unten: Direkter Weg aus Adenosin.	12
1.8	Struktur von Queuosin.	13
1.9	Struktur der Queuosinderivate.	14
1.10	Oben: Verkürzt dargestellte <i>de novo</i> Synthese in Prokaryoten. Mitte: Mögliche Substrate welche von Eukaryoten in die Zelle transportiert werden. Zellkulturexperimente haben gezeigt, dass Zellen in der Lage sind die freie Base Queuine aufzunehmen. Unten: Bisher bekannter Weg in Eukaryoten. Transporter sind nicht bekannt. Die Rolle von DUF2412 ist vermutet, ¹⁷¹ aber nicht experimentell bestätigt. Wege die theoretisch möglich sind, aber Experimentell nicht gezeigt wurden sind in hellem violett gehalten.	16
1.11	Abbildung der vermuteten Regio- und Stereoisomere des Mannosylqueuosins. A zeigt die beiden Stereoisomere der Homoallylvariante und B die der Allylvariante.	23
2.1	Strukturformeln von i ⁶ A, ms ² A und ms ² A.	25
2.2	Massenspektrometrische Messung der i ⁶ A-, ms ² i ⁶ A- und ms ² A-Werte in <i>E.coli</i> BW25113 (Wildtyppreferenz), $\Delta miaA$ und $\Delta miaB$. Zweimalige Messung einer biologischen Probe durch <i>Mirko Wagner</i> . Für die ms ² A-Modifikation gibt es keine Kalibrationskurve, weshalb die Werte auf <i>E.coli</i> Wildtyp (BW25113) normalisiert wurden. Die ms ² A-Werte in den MiaA- und MiaB-Knockout-Stämmen liegen unter dem <i>lower limit of detection</i> (LLOD). Nicht detektierte Modifikation sind mit ND (Nicht detektiert) gekennzeichnet.	26
2.3	Massenspektrometrische Messung der i ⁶ A-, ms ² i ⁶ A- und ms ² A-Werte in <i>E.coli</i> ME5109 (Wildtyppreferenz), LD-1 (ME5110) und LD-16 (ME5125). Einfache Messung einer biologischen Probe durch <i>Mirko Wagner</i> . Für die ms ² A-Modifikation gibt es keine Kalibrationskurve, weshalb die Werte auf den <i>E.coli</i> Wildtyp (ME5109) normalisiert wurden.	27

- 2.4 Level an leichtem (+ 0) und schwerem (+ 6) Galaktosylqueuosin. **A**: Isotopenfütterung mit Galaktose und Glukose. *Links*: Galaktose- $^{13}\text{C}_6$ und Glukose (s-Man-Medium). *Rechts*: Galaktose, Glukose- $^{13}\text{C}_6$ (l-Man-Medium). **B**: Isotopenfütterung mit Mannose und Glukose. *Links*: Mannose- $^{13}\text{C}_6$ und Glukose (s-Man-Medium). *Rechts*: Mannose, Glukose- $^{13}\text{C}_6$ (l-Man-Medium). 30
- 2.5 Stoffwechselwege von Glukose, Mannose und Galaktose im Menschen. Die Abbildung wurde Grundlage der Informationen auf der *KEGG*-Datenbank erstellt.^{240–242} Violette Pfeile beschreiben den direkten Weg der Hexose zu ihrer aktivierten Form. Rosa Pfeile beschreiben einen Umwandlungsweg von einer Hexose zu einer anderen. Der Leloir-Stoffwechselweg ist beige unterlegt. Über ihn wird Galaktose zu UDP-Glukose umgewandelt. Stoffwechselwege in die eine Substanz eingeschleust werden kann sind ebenfalls in beige gehalten. 31
- 2.6 Level an leichtem (+ 0) und schwerem (+ 6) x-Queuosin. **A**: Isotopenfütterung mit Galaktose und Glukose. *Links*: Galaktose- $^{13}\text{C}_6$ und Glukose (s-Man-Medium). *Rechts*: Galaktose, Glukose- $^{13}\text{C}_6$ (l-Man-Medium). **B**: Isotopenfütterung mit Mannose und Glukose. *Links*: Mannose- $^{13}\text{C}_6$ und Glukose (s-Man-Medium). *Rechts*: Mannose, Glukose- $^{13}\text{C}_6$ (l-Man-Medium). 32
- 2.7 Abbildung der vermuteten Regio- und Stereoisomere des Mannosylqueuosins. **A** zeigt die beiden Stereoisomere der Homoallylvariante und **B** die der Allylvariante. 34
- 2.8 Dargestellt sind die Ergebnisse der Koinjektionen für α -manQ und β -manQ. Alle Versuche wurden mit Gesamt-RNA aus Mäuseleber durchgeführt. Von oben nach unten wie folgt abgebildet: UV-VIS-Spektralphotometriespur; Gesamt-RNA-Messung ohne eine Zugabe von einem Standard; Gesamt-RNA-Messung mit Zugabe von α -manQ-Standard; Gesamt-RNA-Messung mit Zugabe von β -manQ-Standard. 35
- 2.9 Dargestellt ist das Ergebnis der Koinjektion β' -manQ-Standard. Alle Versuche wurden mit Gesamt-RNA aus Mäuseleber durchgeführt. In dieser Versuchsreihe wurde ein längerer Gradient eingesetzt. Von oben nach unten wie folgt abgebildet: UV-VIS-Spektralphotometriespur; Gesamt-RNA-Messung ohne eine Zugabe von einem Standard; Gesamt-RNA-Messung mit Zugabe von β' -manQ-Standard. 36

2.10	Bild einer Agarose-Gelelektrophorese und TBE-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. A Agarose-Gelelektrophorese (Gel: 1,5 %, für 60 min bei 100 V), verwendeter Marker: NEB <i>Low Range ssRNA Ladder</i> , Bahn 1: setRNA aus <i>E.coli</i> . B selbes Bild wie in A, allerdings mit erhöhtem lokalen und globalen Kontrast sowie angepassten Schwarzwerten, um schwache Banden sichtbarer zu machen. C TBE-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der selben Probe. TBE-PAGE 12 %, für 80 min bei 15 mA, verwendeter Marker: NEB <i>Low Range ssRNA Ladder</i>	38
2.11	UV-Chromatogramm. Die UV-Spuren sind in integrierter Form dargestellt. Es wurden 15 Fraktionen auf die Enzymaktivität getestet. Der Bereich, der getestet wurde, ist im Chromatogramm beige unterlegt.	39
2.12	Queuosin-, Mannosylqueuosin- und Galaktosylqueuosin-Level in sechs verschiedenen Organen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten. T1: Ein Tag nach der Geburt; M3: Drei Monate nach der Geburt. Die Level wurden in Gesamt-RNA bestimmt. Gezeigt werden die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten. Die Quantifizierung erfolgte über einen β -Allyl-mannosylqueuosin-Standard (dargestellt von <i>Markus Hillmeier</i>). Die Messungen wurden von <i>Mirko Wagner</i> durchgeführt. Bewertung über zweifaktoriellen Anova-Test	40
2.13	Links: Mittelwert der Veränderung (T1/M3) aller Organe über die Zeit. Rechts: Quotient zwischen dem Organ mit dem höchsten und dem niedrigsten Modifikationslevel für jede Modifikation. Eine Abbildung (3.1) die die Modifikationslevel in den verwendeten Organen zeigt, befindet sich im Anhang.	42
2.14	Auf der Grundlage der hier präsentierten Ergebnisse werden die oben abgebildeten Stoffwechselwege für ms ² A beschrieben.	45
2.15	QTRT1 in einem Komplex mit Queuin. A Die Kristallstruktur zeigt, dass die zwei Hydroxylgruppen für ein weiteres Enzym zugänglich wären. B Bildausschnitt von A; Cyclopentendiolrest Violett hervorgehoben. Abbildung mit PDB: 6H45 erstellt.	46
3.1	Abbildung der Organe mit dem jeweils höchsten und niedrigsten Modifikationslevel im adulten Alter (M3) für alle drei Modifikationen.	76

3.2 Referenzabbildung zu Abbildung 1.2. Die Positionen der Basen in der humanen ribosomalen Untereinheit wurden mit Hilfe der Datenbank *3D Ribosomal Modification Maps* ermittelt.²⁶ **A** Abbildung der humanen kleinen Untereinheit aus der Einleitung (PDB: 6QZP). **B** Abbildung der kleinen Untereinheit von *Thermus thermophilus* (PDB: 1J5E). 77

Tabellenverzeichnis

3.1	Geräteliste der in dieser Arbeit verwendeten Geräte.	52
3.2	Medien die Kultivierung von Bakterienkulturen.	54
3.3	Lösungen und Medienkomponenten für die Kultivierung von humanen Zellkulturen. Für die Medien wurden Produkte der Firmen SIGMA ALDRICH (MERCK), THERMO FISHER SCIENTIFIC und SILANTES.	55
3.4	Medien für die Kultivierung von humanen Zellkulturen. Es wurden die in Tabelle 3.3 aufgeführten Komponenten verwendet. Den Medien mit einer speziellen Zuckermischung wurde eine Mischung aus Galaktose und Glukose bzw. Mannose und Glukose hinzugegeben. Die finale Konzentration je Hexose war 11 mM. In den Medien wurde immer ein Paar aus einer $^{13}\text{C}_6$ - und eine nicht markierten Hexose eingesetzt.	55
3.5	Puffer und Lösungen, die für die Agarose-Gelelektrophorese verwendet wurden.	56
3.6	Lösungen für die TBE-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.	56
3.7	Spezielle Puffer für die Proteinreinigung.	56
3.8	Verwendete Größenstandards.	56
3.9	Verwendete <i>E.coli</i> Stämme.	57
3.10	Verwendete Zelllinie.	57

Literaturverzeichnis

- [1] F. Crick, Central Dogma of Molecular Biology, *Nature* **1970**, 227, 561–563.
- [2] F. Gros, H. Hiatt, W. Gilbert, C. G. Kurland, R. W. Risebrough, J. D. Watson, Unstable Ribonucleic Acid Revealed by Pulse Labelling of Escherichia Coli, *Nature* **1961**, 190, 581–585.
- [3] S. Brenner, F. Jacob, M. Meselson, An Unstable Intermediate Carrying Information from Genes to Ribosomes for Protein Synthesis, *Nature* **1961**, 190, 576–581.
- [4] M. B. Hoagland, M. L. Stephenson, J. F. Scott, L. I. Hecht, P. C. Zamecink, A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis., *J. Biol. Chem.* **1958**, 231, 241–257.
- [5] F. Chapeville, F. Lipmann, G. von Ehrenstein, B. Weisblum, W. J. Ray, S. Benzer, On the role of soluble ribonucleic acid in coding for amino acids., *PNAS* **1962**, 48, 1086–1092.
- [6] D. Grunberger, I. B. Weinstein, K. B. Jacobson, Codon recognition by enzymatically mischarged valine transfer ribonucleic acid, *Science* **1969**, 166, 1635–1637.
- [7] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, Proteinsynthese, in Stryer Biochemie, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg **2013**, 899–932.
- [8] F. F. Davis, F. W. Allen, Ribonucleic acids from yeast which contain a fifth nucleotide., *J. Biol. Chem.* **1957**, 227, 907–915.
- [9] W. E. Cohn, 5-Ribosyl uracil, a carbon-carbon ribofuranosyl nucleoside in ribonucleic acids, *Biochim. Biophys. Acta* **1959**, 32, 569–571.
- [10] D. Dunn, Additional components in ribonucleic acid of rat-liver fractions, *Biochim. Biophys. Acta* **1959**, 34, 286–288.

- [11] P. Boccaletto, M. A. Machnicka, E. Purta, P. Piątkowski, B. Bagiński, T. K. Wirecki, V. de Crécy-Lagard, R. Ross, P. A. Limbach, A. Kotter, M. Helm, J. M. Bujnicki, MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update, *Nucleic Acids Res.* **2018**, 46, D303–D307.
- [12] S. K. Natchiar, A. G. Myasnikov, H. Kratzat, I. Hazemann, B. P. Klaholz, Visualization of chemical modifications in the human 80S ribosome structure, *Nature* **2017**, 551, 472–477.
- [13] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, Replikation, Rekombination und Reparatur von DNA, in Stryer Biochemie, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg **2013**, 829–861.
- [14] H. F. Lodish, Processing of rRNA and tRNA, in Molecular Cell Biology, W.H. Freeman **2000**, 36.
- [15] J. Baßler, E. Hurt, Eukaryotic Ribosome Assembly, *Annu. Rev. Biochem.* **2019**, 88, 281–306.
- [16] S. Sharma, D. L. Lafontaine, ‘View From A Bridge’: A New Perspective on Eukaryotic rRNA Base Modification, *Trends Biochem. Sci.* **2015**, 40, 560–575.
- [17] K. E. Sloan, A. S. Warda, S. Sharma, K.-D. Entian, D. L. J. Lafontaine, M. T. Bohnsack, Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function, *RNA Biol.* **2017**, 14, 1138–1152.
- [18] W. A. Decatur, M. J. Fournier, rRNA modifications and ribosome function, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, 27, 344–351.
- [19] B. Meyer, J. P. Wurm, P. Kötter, M. S. Leisegang, V. Schilling, M. Buchhaupt, M. Held, U. Bahr, M. Karas, A. Heckel, M. T. Bohnsack, J. Wöhnert, K.-D. Entian, The Bowen–Conradi syndrome protein Nep1 (Emg1) has a dual role in eukaryotic ribosome biogenesis, as an essential assembly factor and in the methylation of Ψ 1191 in yeast 18S rRNA, *Nucleic Acids Res.* **2011**, 39, 1526–1537.
- [20] C. Peifer, S. Sharma, P. Watzinger, S. Lamberth, P. Kötter, K.-D. Entian, Yeast Rrp8p, a novel methyltransferase responsible for m¹A 645 base modification of 25S rRNA, *Nucleic Acids Res.* **2013**, 41, 1151–1163.

- [21] S. Sharma, P. Watzinger, P. Kötter, K.-D. Entian, Identification of a novel methyltransferase, Bmt2, responsible for the N-1-methyl-adenosine base modification of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res.* **2013**, 41, 5428–5443.
- [22] D. Lafontaine, J. Delcour, A.-L. Glasser, J. Desgres, J. Vandehaute, The DIM1 Gene Responsible for the Conserved m⁶₂Am⁶₂A Dimethylation in the 3-Terminal Loop of 18 S rRNA is Essential in Yeast, *J. Mol. Biol.* **1994**, 241, 492–497.
- [23] C. Zorbas, E. Nicolas, L. Wacheul, E. Huvelle, V. Heurgué-Hamard, D. L. J. Lafontaine, The human 18S rRNA base methyltransferases DIMT1L and WBSCR22-TRMT112 but not rRNA modification are required for ribosome biogenesis., *Mol. Biol. Cell* **2015**, 26, 2080–2095.
- [24] H. Demirci, F. Murphy, R. Belardinelli, A. C. Kelley, V. Ramakrishnan, S. T. Gregory, A. E. Dahlberg, G. Jogl, Modification of 16S ribosomal RNA by the KsgA methyltransferase restructures the 30S subunit to optimize ribosome function., *RNA* **2010**, 16, 2319–2324.
- [25] M. W. Gray, Michael Charette, M. W. Gray, Pseudouridine in RNA: What, Where, How, and Why, *IUBMB Life* **2000**, 49, 341–351.
- [26] D. Piekna-Przybylska, W. A. Decatur, M. J. Fournier, The 3D rRNA modification maps database: with interactive tools for ribosome analysis, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 36, D178–D183.
- [27] J. P. Rife, DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution, in *DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution*, CRC Press, chapter Roles of the ultra-conserved ribosomal RNA methyltransferase KsgA in ribosome biogenesis **2009**, 509–523.
- [28] K. E. Guja, K. Venkataraman, E. Yakubovskaya, H. Shi, E. Mejia, E. Hambardjieva, A. W. Karzai, M. Garcia-Diaz, Structural basis for S-adenosylmethionine binding and methyltransferase activity by mitochondrial transcription factor B1, *Nucleic Acids Res.* **2013**, 41, 7947–7959.
- [29] P. H. van Knippenberg, H. A. Heus, The Conformation of a Conserved Stem-Loop Structure in Ribosomal RNA, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1983**, 1, 371–381.
- [30] M. Helm, Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA, *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 721–733.

- [31] D. L. Lafontaine, T. Preiss, D. Tollervey, Yeast 18S rRNA dimethylase Dim1p: a quality control mechanism in ribosome synthesis?, *Mol. Cell. Biol.* **1998**, 18, 2360–2370.
- [32] W. V. Gilbert, T. A. Bell, C. Schaening, Messenger RNA modifications: Form, distribution, and function., *Science* **2016**, 352, 1408–12.
- [33] B. S. Zhao, I. A. Roundtree, C. He, Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, 18, 31–42.
- [34] I. A. Roundtree, M. E. Evans, T. Pan, C. He, Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation, *Cell* **2017**, 169, 1187–1200.
- [35] R. Desrosiers, K. Friderici, F. Rottman, Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells., *PNAS* **1974**, 71, 3971–3975.
- [36] K. Meyer, Y. Saletore, P. Zumbo, O. Elemento, C. Mason, S. Jaffrey, Comprehensive Analysis of mRNA Methylation Reveals Enrichment in 3 UTRs and near Stop Codons, *Cell* **2012**, 149, 1635–1646.
- [37] D. Dominissini, S. Moshitch-Moshkovitz, S. Schwartz, M. Salmon-Divon, L. Ungar, S. Osenberg, K. Cesarkas, J. Jacob-Hirsch, N. Amariglio, M. Kupiec, R. Sorek, G. Rechavi, Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq, *Nature* **2012**, 485, 201–206.
- [38] H. Shi, X. Wang, Z. Lu, B. S. Zhao, H. Ma, P. J. Hsu, C. Liu, C. He, YTHDF3 facilitates translation and decay of N⁶-methyladenosine-modified RNA, *Cell Res.* **2017**, 27, 315–328.
- [39] X. Wang, Z. Lu, A. Gomez, G. C. Hon, Y. Yue, D. Han, Y. Fu, M. Parisien, Q. Dai, G. Jia, B. Ren, T. Pan, C. He, N⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability, *Nature* **2014**, 505, 117–120.
- [40] S. Schwartz, M. Mumbach, M. Jovanovic, T. Wang, K. Maciag, G. Bushkin, P. Mertins, D. Ter-Ovanesyan, N. Habib, D. Cacchiarelli, N. Sanjana, E. Freinkman, M. Paccold, R. Satija, T. Mikkelsen, N. Hacohen, F. Zhang, S. Carr, E. Lander, A. Regev, Perturbation of m⁶A Writers Reveals Two Distinct Classes of mRNA Methylation at Internal and 5 Sites, *Cell Rep.* **2014**, 8, 284–296.

- [41] B. S. Zhao, X. Wang, A. V. Beadell, Z. Lu, H. Shi, A. Kuuspalu, R. K. Ho, C. He, m⁶A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition, *Nature* **2017**, 542, 475–478.
- [42] H. Huang, H. Weng, W. Sun, X. Qin, H. Shi, H. Wu, B. S. Zhao, A. Mesquita, C. Liu, C. L. Yuan, Y.-C. Hu, S. Hüttelmaier, J. R. Skibbe, R. Su, X. Deng, L. Dong, M. Sun, C. Li, S. Nachtergaele, Y. Wang, C. Hu, K. Ferchen, K. D. Greis, X. Jiang, M. Wei, L. Qu, J.-L. Guan, C. He, J. Yang, J. Chen, Recognition of RNA N⁶-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation, *Nat. Cell Biol.* **2018**, 20, 285–295.
- [43] G. Zheng, J. Dahl, Y. Niu, P. Fedorcsak, C.-M. Huang, C. Li, C. Vågbø, Y. Shi, W.-L. Wang, S.-H. Song, Z. Lu, R. Bosmans, Q. Dai, Y.-J. Hao, X. Yang, W.-M. Zhao, W.-M. Tong, X.-J. Wang, F. Bogdan, K. Furu, Y. Fu, G. Jia, X. Zhao, J. Liu, H. Krokan, A. Klungland, Y.-G. Yang, C. He, ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase that Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility, *Mol. Cell* **2013**, 49, 18–29.
- [44] I. A. Roundtree, G.-Z. Luo, Z. Zhang, X. Wang, T. Zhou, Y. Cui, J. Sha, X. Huang, L. Guerrero, P. Xie, E. He, B. Shen, C. He, YTHDC1 mediates nuclear export of N⁶-methyladenosine methylated mRNAs., *Elife* **2017**, 6, e31311.
- [45] J. Zhou, J. Wan, X. Gao, X. Zhang, S. R. Jaffrey, S.-B. Qian, Dynamic m⁶A mRNA methylation directs translational control of heat shock response, *Nature* **2015**, 526, 591–594.
- [46] X. Wang, B. Zhao, I. Roundtree, Z. Lu, D. Han, H. Ma, X. Weng, K. Chen, H. Shi, C. He, N⁶-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency, *Cell* **2015**, 161, 1388–1399.
- [47] J. Choi, K.-W. Jeong, H. Demirci, J. Chen, A. Petrov, A. Prabhakar, S. E. O’Leary, D. Dominissini, G. Rechavi, S. M. Soltis, M. Ehrenberg, J. D. Puglisi, N⁶-methyladenosine in mRNA disrupts tRNA selection and translation-elongation dynamics, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, 23, 110–115.
- [48] A. Li, Y.-S. Chen, X.-L. Ping, X. Yang, W. Xiao, Y. Yang, H.-Y. Sun, Q. Zhu, P. Baidya, X. Wang, D. P. Bhattarai, Y.-L. Zhao, B.-F. Sun, Y.-G. Yang, Cytoplasmic m⁶A reader YTHDF3 promotes mRNA translation, *Cell Res.* **2017**, 27, 444–447.

- [49] X.-L. Ping, B.-F. Sun, L. Wang, W. Xiao, X. Yang, W.-J. Wang, S. Adhikari, Y. Shi, Y. Lv, Y.-S. Chen, X. Zhao, A. Li, Y. Yang, U. Dahal, X.-M. Lou, X. Liu, J. Huang, W.-P. Yuan, X.-F. Zhu, T. Cheng, Y.-L. Zhao, X. Wang, J. M. R. Danielsen, F. Liu, Y.-G. Yang, Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase, *Cell Res.* **2014**, 24, 177–189.
- [50] X. Zhao, Y. Yang, B.-F. Sun, Y. Shi, X. Yang, W. Xiao, Y.-J. Hao, X.-L. Ping, Y.-S. Chen, W.-J. Wang, K.-X. Jin, X. Wang, C.-M. Huang, Y. Fu, X.-M. Ge, S.-H. Song, H. S. Jeong, H. Yanagisawa, Y. Niu, G.-F. Jia, W. Wu, W.-M. Tong, A. Okamoto, C. He, J. M. R. Danielsen, X.-J. Wang, Y.-G. Yang, FTO-dependent demethylation of N⁶-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis, *Cell Res.* **2014**, 24, 1403–1419.
- [51] N. Liu, Q. Dai, G. Zheng, C. He, M. Parisien, T. Pan, N⁶-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA–protein interactions, *Nature* **2015**, 518, 560–564.
- [52] W. Xiao, S. Adhikari, U. Dahal, Y.-S. Chen, Y.-J. Hao, B.-F. Sun, H.-Y. Sun, A. Li, X.-L. Ping, W.-Y. Lai, X. Wang, H.-L. Ma, C.-M. Huang, Y. Yang, N. Huang, G.-B. Jiang, H.-L. Wang, Q. Zhou, X.-J. Wang, Y.-L. Zhao, Y.-G. Yang, Nuclear m⁶A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing, *Mol. Cell* **2016**, 61, 507–519.
- [53] I. U. Haussmann, Z. Bodi, E. Sanchez-Moran, N. P. Mongan, N. Archer, R. G. Fray, M. Soller, m⁶A potentiates Sxl alternative pre-mRNA splicing for robust Drosophila sex determination, *Nature* **2016**, 540, 301–304.
- [54] T. Lence, J. Akhtar, M. Bayer, K. Schmid, L. Spindler, C. H. Ho, N. Kreim, M. A. Andrade-Navarro, B. Poeck, M. Helm, J.-Y. Roignant, m⁶A modulates neuronal functions and sex determination in Drosophila, *Nature* **2016**, 540, 242–247.
- [55] L. Kan, A. V. Grozhik, J. Vedanayagam, D. P. Patil, N. Pang, K.-S. Lim, Y.-C. Huang, B. Joseph, C.-J. Lin, V. Despic, J. Guo, D. Yan, S. Kondo, W.-M. Deng, P. C. Dedon, S. R. Jaffrey, E. C. Lai, The m⁶A pathway facilitates sex determination in Drosophila, *Nat. Commun.* **2017**, 8, 15737.
- [56] N. Liu, K. I. Zhou, M. Parisien, Q. Dai, L. Diatchenko, T. Pan, N⁶-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein, *Nucleic Acids Res.* **2017**, 45, 6051–6063.

- [57] M. Bartosovic, H. C. Molaes, P. Gregorova, D. Hrossova, G. Kudla, S. Vanacova, N⁶-methyladenosine demethylase FTO targets pre-mRNAs and regulates alternative splicing and 3-end processing, *Nucleic Acids Res.* **2017**, 45, 11356–11370.
- [58] Y. Fu, D. Dominissini, G. Rechavi, C. He, Gene expression regulation mediated through reversible m⁶A RNA methylation, *Nat. Rev. Genet.* **2014**, 15, 293–306.
- [59] P. Narayan, F. M. Rottman, An in vitro system for accurate methylation of internal adenosine residues in messenger RNA., *Science* **1988**, 242, 1159–1162.
- [60] J. E. Harper, S. M. Miceli, R. J. Roberts, J. L. Manley, Sequence specificity of the human mRNA N⁶-adenosine methylase in vitro., *Nucleic Acids Res.* **1990**, 18, 5735–5741.
- [61] J. A. Bokar, M. E. Rath-Shambaugh, R. Ludwiczak, P. Narayan, F. Rottman, Characterization and partial purification of mRNA N⁶-adenosine methyltransferase from HeLa cell nuclei. Internal mRNA methylation requires a multisubunit complex., *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 17697–17704.
- [62] J. A. Bokar, M. E. Shambaugh, D. Polayes, A. G. Matera, F. M. Rottman, Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N⁶-adenosine)-methyltransferase., *RNA* **1997**, 3, 1233–1247.
- [63] K. Horiuchi, T. Kawamura, H. Iwanari, R. Ohashi, M. Naito, T. Kodama, T. Hamakubo, Identification of Wilms' tumor 1-associating protein complex and its role in alternative splicing and the cell cycle., *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 33292–33302.
- [64] J. Liu, Y. Yue, D. Han, X. Wang, Y. Fu, L. Zhang, G. Jia, M. Yu, Z. Lu, X. Deng, Q. Dai, W. Chen, C. He, A METTL3–METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N⁶-adenosine methylation, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10, 93–95.
- [65] X. Wang, J. Feng, Y. Xue, Z. Guan, D. Zhang, Z. Liu, Z. Gong, Q. Wang, J. Huang, C. Tang, T. Zou, P. Yin, Structural basis of N⁶-adenosine methylation by the METTL3–METTL14 complex, *Nature* **2016**, 534, 575–578.
- [66] P. Śledź, M. Jinek, Structural insights into the molecular mechanism of the m⁶A writer complex., *Elife* **2016**, 5.
- [67] P. Wang, K. A. Doxtader, Y. Nam, Structural Basis for Cooperative Function of Mettl3 and Mettl14 Methyltransferases., *Mol. Cell* **2016**, 63, 306–317.

- [68] D. P. Patil, C.-K. Chen, B. F. Pickering, A. Chow, C. Jackson, M. Guttman, S. R. Jaffrey, m⁶A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression, *Nature* **2016**, 537, 369–373.
- [69] K. E. Pendleton, B. Chen, K. Liu, O. V. Hunter, Y. Xie, B. P. Tu, N. K. Conrad, The U6 snRNA m⁶A Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention, *Cell* **2017**, 169, 824–835.
- [70] Y. Yue, J. Liu, X. Cui, J. Cao, G. Luo, Z. Zhang, T. Cheng, M. Gao, X. Shu, H. Ma, F. Wang, X. Wang, B. Shen, Y. Wang, X. Feng, C. He, J. Liu, VIRMA mediates preferential m⁶A mRNA methylation in 3UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation, *Cell Discov.* **2018**, 4, 1–17.
- [71] P. Knuckles, T. Lence, I. U. Haussmann, D. Jacob, N. Kreim, S. H. Carl, I. Masiello, T. Hares, R. Villaseñor, D. Hess, M. A. Andrade-Navarro, M. Biggiogera, M. Helm, M. Soller, M. Bühler, J.-Y. Roignant, Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor Rbm15/Spenito to the m⁶A machinery component Wtap/Fl(2)d., *Genes Dev.* **2018**, 32, 415–429.
- [72] J. Wen, R. Lv, H. Ma, H. Shen, C. He, J. Wang, F. Jiao, H. Liu, P. Yang, L. Tan, F. Lan, Y. G. Shi, C. He, Y. Shi, J. Diao, Zc3h13 Regulates Nuclear RNA m⁶A Methylation and Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal, *Mol. Cell* **2018**, 69, 1028–1038.
- [73] J. Guo, H.-W. Tang, J. Li, N. Perrimon, D. Yan, Xio is a component of the Drosophila sex determination pathway and RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase complex., *PNAS* **2018**, 115, 3674–3679.
- [74] K. D. Meyer, S. R. Jaffrey, Rethinking m⁶A Readers, Writers, and Erasers, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2017**, 33, 319–342.
- [75] Y. Yang, P. J. Hsu, Y.-S. Chen, Y.-G. Yang, Dynamic transcriptomic m⁶A decoration: writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism, *Cell Res.* **2018**, 28, 616–624.
- [76] G. Jia, Y. Fu, X. Zhao, Q. Dai, G. Zheng, Y. Yang, C. Yi, T. Lindahl, T. Pan, Y.-G. Yang, C. He, N⁶-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 885–887.

- [77] J. Mauer, X. Luo, A. Blanjoie, X. Jiao, A. V. Grozhik, D. P. Patil, B. Linder, B. F. Pickering, J.-J. Vasseur, Q. Chen, S. S. Gross, O. Elemento, F. Debart, M. Kiledjian, S. R. Jaffrey, Reversible methylation of m⁶Am in the 5 cap controls mRNA stability, *Nature* **2017**, 541, 371–375.
- [78] J. Wei, F. Liu, Z. Lu, Q. Fei, Y. Ai, P. C. He, H. Shi, X. Cui, R. Su, A. Klungland, G. Jia, J. Chen, C. He, Differential m⁶A, m⁶A_m, and m¹A Demethylation Mediated by FTO in the Cell Nucleus and Cytoplasm, *Mol. Cell* **2018**, 71, 973–985.e5.
- [79] X. Zhang, L.-H. Wei, Y. Wang, Y. Xiao, J. Liu, W. Zhang, N. Yan, G. Amu, X. Tang, L. Zhang, G. Jia, Structural insights into FTO’s catalytic mechanism for the demethylation of multiple RNA substrates., *PNAS* **2019**, 116, 2919–2924.
- [80] T. Gerken, C. A. Girard, Y.-C. L. Tung, C. J. Webby, V. Saudek, K. S. Hewitson, G. S. H. Yeo, M. A. McDonough, S. Cunliffe, L. A. McNeill, J. Galvanovskis, P. Rorsman, P. Robins, X. Prieur, A. P. Coll, M. Ma, Z. Jovanovic, I. S. Farooqi, B. Sedgwick, I. Barroso, T. Lindahl, C. P. Ponting, F. M. Ashcroft, S. O’Rahilly, C. J. Schofield, The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase., *Science* **2007**, 318, 1469–1472.
- [81] G. Jia, C.-G. Yang, S. Yang, X. Jian, C. Yi, Z. Zhou, C. He, Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO, *FEBS Lett.* **2008**, 582, 3313–3319.
- [82] S. Zou, J. D. W. Toh, K. H. Q. Wong, Y.-G. Gao, W. Hong, E. C. Y. Woon, N⁶-Methyladenosine: a conformational marker that regulates the substrate specificity of human demethylases FTO and ALKBH5, *Sci. Rep.* **2016**, 6, 25677.
- [83] S. C. Trewick, T. F. Henshaw, R. P. Hausinger, T. Lindahl, B. Sedgwick, Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage, *Nature* **2002**, 419, 174–178.
- [84] P. Ø. Falnes, R. F. Johansen, E. Seeberg, AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*, *Nature* **2002**, 419, 178–182.
- [85] P. A. Aas, M. Otterlei, P. Ø. Falnes, C. B. Vågbø, F. Skorpen, M. Akbari, O. Sundheim, M. Bjørås, G. Slupphaug, E. Seeberg, H. E. Krokan, Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA, *Nature* **2003**, 421, 859–863.

- [86] M. A. Kurowski, A. S. Bhagwat, G. Papaj, J. M. Bujnicki, Phylogenomic identification of five new human homologs of the DNA repair enzyme AlkB, *BMC Genomics* **2003**, 4, 48.
- [87] F. Liu, W. Clark, G. Luo, X. Wang, Y. Fu, J. Wei, X. Wang, Z. Hao, Q. Dai, G. Zheng, H. Ma, D. Han, M. Evans, A. Klungland, T. Pan, C. He, ALKBH1-Mediated tRNA Demethylation Regulates Translation, *Cell* **2016**, 167, 816–828.
- [88] M.-M. Li, A. Nilsen, Y. Shi, M. Fusser, Y.-H. Ding, Y. Fu, B. Liu, Y. Niu, Y.-S. Wu, C.-M. Huang, M. Olofsson, K.-X. Jin, Y. Lv, X.-Z. Xu, C. He, M.-Q. Dong, J. M. Rendtlew Danielsen, A. Klungland, Y.-G. Yang, ALKBH4-dependent demethylation of actin regulates actomyosin dynamics, *Nat. Commun.* **2013**, 4, 1832.
- [89] D. Fu, J. J. Jordan, L. D. Samson, Human ALKBH7 is required for alkylation and oxidation-induced programmed necrosis., *Genes Dev.* **2013**, 27, 1089–10100.
- [90] G. Wang, Q. He, C. Feng, Y. Liu, Z. Deng, X. Qi, W. Wu, P. Mei, Z. Chen, The atomic resolution structure of human AlkB homolog 7 (ALKBH7), a key protein for programmed necrosis and fat metabolism., *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 27924–27936.
- [91] Y. Fu, Q. Dai, W. Zhang, J. Ren, T. Pan, C. He, The AlkB Domain of Mammalian ABH8 Catalyzes Hydroxylation of 5-Methoxycarbonylmethyluridine at the Wobble Position of tRNA, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2010**, 49, 8885–8888.
- [92] Y.-F. Wei, K. C. Carter, R.-P. Wang, B. K. Shell, Molecular Cloning and Functional Analysis of a Human cDNA Encoding an Escherichia Coli AlkB Homolog, a Protein Involved in DNA Alkylation Damage Repair, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 931–937.
- [93] The UniProt Consortium, UniProt: a worldwide hub of protein knowledge, *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47, D506–D515.
- [94] S. Martinez, R. P. Hausinger, Catalytic Mechanisms of Fe(II)- and 2-Oxoglutarate-dependent Oxygenases., *J. Biol. Chem.* **2015**, 290, 20702–20711.
- [95] W. Aik, M. A. McDonough, A. Thalhammer, R. Chowdhury, C. J. Schofield, Role of the jelly-roll fold in substrate binding by 2-oxoglutarate oxygenases, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, 22, 691–700.
- [96] M. S. Islam, T. M. Leissing, R. Chowdhury, R. J. Hopkinson, C. J. Schofield, 2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases, *Annu. Rev. Biochem.* **2018**, 87, 585–620.

- [97] C. Feng, Y. Liu, G. Wang, Z. Deng, Q. Zhang, W. Wu, Y. Tong, C. Cheng, Z. Chen, Crystal structures of the human RNA demethylase Alkbh5 reveal basis for substrate recognition., *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 11571–11583.
- [98] W. Aik, J. S. Scotti, H. Choi, L. Gong, M. Demetriades, C. J. Schofield, M. A. McDonough, NAR Breakthrough Article Structure of human RNA N⁶-methyladenine demethylase ALKBH5 provides insights into its mechanisms of nucleic acid recognition and demethylation, *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42, 4741.
- [99] Y. Fu, G. Jia, X. Pang, R. N. Wang, X. Wang, C. J. Li, S. Smemo, Q. Dai, K. A. Bailey, M. A. Nobrega, K.-L. Han, Q. Cui, C. He, FTO-mediated formation of N⁶-hydroxymethyladenosine and N⁶-formyladenosine in mammalian RNA, *Nat. Commun.* **2013**, 4, 1798.
- [100] W. Chen, L. Zhang, G. Zheng, Y. Fu, Q. Ji, F. Liu, H. Chen, C. He, Crystal structure of the RNA demethylase ALKBH5 from zebrafish, *FEBS Lett.* **2014**, 588, 892–898.
- [101] T. Carell, C. Brandmayr, A. Hienzsch, M. Müller, D. Pearson, V. Reiter, I. Thoma, P. Thumbs, M. Wagner, Struktur und Funktion nicht-kanonischer Nukleobasen, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 7220–7242.
- [102] P. F. Agris, E. R. Eruysal, A. Narendran, V. Y. P. Väre, S. Vangaveti, S. V. Ranganathan, Celebrating wobble decoding: Half a century and still much is new, *RNA Biol.* **2018**, 15, 537–553.
- [103] C. Brandmayr, M. Wagner, D. T. Brückl, D. D. Globisch, D. D. Pearson, A. C. Kneuttinger, V. Reiter, D. A. Hienzsch, S. Koch, I. Thoma, P. Thumbs, D. S. Michalakis, D. M. Müller, P. D. M. Biel, P. D. T. Carell, Isotope-Based Analysis of Modified tRNA Nucleosides Correlates Modification Density with Translational Efficiency, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 11162–11165.
- [104] W. C. Clark, M. E. Evans, D. Dominissini, G. Zheng, T. Pan, tRNA base methylation identification and quantification via high-throughput sequencing., *RNA* **2016**, 22, 1771–1784.
- [105] C. T. Y. Chan, M. Dyavaiah, M. S. DeMott, K. Taghizadeh, P. C. Dedon, T. J. Begley, A Quantitative Systems Approach Reveals Dynamic Control of tRNA Modifications during Cellular Stress, *PLoS Genet.* **2010**, 6, e1001247.

- [106] C. T. Chan, Y. L. J. Pang, W. Deng, I. R. Babu, M. Dyavaiah, T. J. Begley, P. C. Dedon, Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins, *Nat. Commun.* **2012**, 3, 937.
- [107] L. Kawarada, T. Suzuki, T. Ohira, S. Hirata, K. Miyauchi, T. Suzuki, ALKBH1 is an RNA dioxygenase responsible for cytoplasmic and mitochondrial tRNA modifications, *Nucleic Acids Res.* **2017**, 45, 7401–7415.
- [108] P. Schimmel, The emerging complexity of the tRNA world: mammalian tRNAs beyond protein synthesis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, 19, 45–58.
- [109] M. Vinayak, C. Pathak, Queuosine modification of tRNA: its divergent role in cellular machinery., *Biosci. Rep.* **2009**, 30, 135–48.
- [110] A. Rich, U. L. RajBhandary, Transfer RNA: Molecular Structure, Sequence, and Properties, *Annu. Rev. Biochem.* **1976**, 45, 805–860.
- [111] F. Crick, Codon—anticodon pairing: The wobble hypothesis, *J. Mol. Biol.* **1966**, 19, 548–555.
- [112] J. Zschocke, Molekulare Grundlagen, in Basiswissen Humangenetik, Springer, Berlin, Heidelberg **2018**, 7–38.
- [113] F. Harada, S. Nishimura, Possible anticodon sequences of tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, and tRNA^{Asp} from *Escherichia coli*. Universal presence of nucleoside O in the first position of the anticodons of these transfer ribonucleic acid, *Biochemistry* **1972**, 11, 301–308.
- [114] N. Horie, Z. Yamaizumi, Y. Kuchino, K. Takai, E. Goldman, T. Miyazawa, S. Nishimura, S. Yokoyama, Modified Nucleosides in the First Positions of the Anticodons of tRNA and tRNA from *Escherichia coli*†, *Biochemistry* **1998**, 38, 207–217.
- [115] A.-L. Glasser, C. El Adlouni, G. Keith, E. Sochacka, A. Malkiewicz, M. Santos, M. F. Tuite, J. Desgrès, Presence and coding properties of 2-O-methyl-5-carbamoylmethyluridine (ncm⁵Um) in the wobble position of the anticodon of tRNA^{Leu} (U*AA) from brewer’s yeast, *FEBS Lett.* **1992**, 314, 381–385.
- [116] M. Rogalski, D. Karcher, R. Bock, Superwobbling facilitates translation with reduced tRNA sets, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, 15, 192–198.

- [117] J. E. Heckman, J. Sarnoff, B. Alzner-DeWeerd, S. Yin, U. L. RajBhandary, Novel features in the genetic code and codon reading patterns in *Neurospora crassa* mitochondria based on sequences of six mitochondrial tRNAs, *PNAS* **1980**, 77, 3159–3163.
- [118] F. Harada, H. Gross, F. Kimura, S. Chang, S. Nishimura, U. RajBhandary, 2-Methylthio N⁶-(Δ^2 -isopentenyl) adenosine: A component of *E. coli* tyrosine transfer RNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, 33, 299–306.
- [119] W. J. Burrows, D. J. Armstrong, F. Skoog, S. M. Hecht, J. T. A. Boyle, N. J. Leonard, J. Occolowitz, Cytokinin from Soluble RNA of *Escherichia coli*: 6-(3-Methyl-2-butenylamino)-2-methylthio-9- β -D-ribofuranosylpurine, *Science* **1968**, 161, 691–693.
- [120] G. B. Chheda, R. H. Hall, D. I. Magrath, J. Mozejko, M. P. Schweizer, L. Stasiuk, P. R. Taylor, Aminoacyl nucleosides. VI. Isolation and preliminary characterization of threonyladenine derivatives from transfer ribonucleic acid, *Biochemistry* **1969**, 8, 3278–3282.
- [121] M. P. Schweizer, G. B. Chheda, L. Baczynskyj, R. H. Hall, Aminoacyl nucleosides. VII. N-(purin-6-ylcarbamoyl)threonine. A new component of transfer ribonucleic acid, *Biochemistry* **1969**, 8, 3283–3289.
- [122] H. Ishikura, Y. Yamada, K. Murao, M. Saneyoshi, S. Nishimura, The presence of N-[9-(β -D-ribofuranosyl)purin-6-ylcarbamoyl]threonine in serine, methionine and lysine transfer RNA's from *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1969**, 37, 990–995.
- [123] S. H. Blobstein, D. Grunberger, I. B. Weinstein, K. Nakanishi, Isolation and structure determination of the fluorescent base from bovine liver phenylalanine transfer ribonucleic acid, *Biochemistry* **1973**, 12, 188–193.
- [124] H. J. Li, K. Nakanishi, D. Grunberger, I. Bernard Weinstein, Biosynthetic studies of the Y base in yeast phenylalanine tRNA. Incorporation of guanine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, 55, 818–823.
- [125] R. Thiebe, K. Poralla, Origin of the nucleoside Y in yeast tRNAPhe, *FEBS Lett.* **1973**, 38, 27–28.

- [126] H. Grosjean, M. Sprinzl, S. Steinberg, Posttranscriptionally modified nucleosides in transfer RNA: Their locations and frequencies, *Biochemie* **1995**, 77, 139–141.
- [127] F. V. Murphy, V. Ramakrishnan, A. Malkiewicz, P. F. Agris, The role of modifications in codon discrimination by tRNA^{Lys}_{UUU}, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, 11, 1186–1191.
- [128] P. C. Durant, A. C. Bajji, M. Sundaram, R. K. Kumar, D. R. Darrell, Structural Effects of Hypermodified Nucleosides in the Escherichia coli and Human tRNA^{Lys} Anticodon Loop: The Effect of Nucleosides s²U, mcm⁵U, mcm⁵s²U, mnm⁵s²U, t⁶A, and ms²t⁶A†, *Biochemistry* **2005**, 44, 8078–8089.
- [129] J. W. Stuart, Z. Gdaniec, R. Guenther, M. Marszalek, E. Sochacka, A. Malkiewicz, P. F. Agris, Functional Anticodon Architecture of Human tRNA^{Lys3} Includes Disruption of Intraloop Hydrogen Bonding by the Naturally Occurring Amino Acid Modification, t⁶A†, *Biochemistry* **2000**, 39, 13396–13404.
- [130] A. P. Denmon, J. Wang, E. P. Nikonowicz, Conformation effects of base modification on the anticodon stem-loop of Bacillus subtilis tRNA^{Tyr}., *J. Mol. Biol.* **2011**, 412, 285–303.
- [131] B. S. Vold, J. M. Lazar, A. M. Gray, Characterization of a deficiency of N⁶-(delta 2-isopentenyl)-2-methylthioadenosine in the Escherichia coli mutant trpX by use of antibodies to N⁶-(delta 2-isopentenyl)adenosine., *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 7362–7367.
- [132] D. M. Reddy, P. F. Crain, C. G. Edmonds, R. Gupta, T. Hashizume, K. O. Stetter, F. Widdel, J. A. McCloskey, Structure determination of two new amino acid-containing derivatives of adenosine from tRNA of thermophilic bacteria and archaea., *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, 5607–5615.
- [133] B. C. Persson, G. R. Björk, Isolation of the gene (miaE) encoding the hydroxylase involved in the synthesis of 2-methylthio-cis-ribozeatin in tRNA of Salmonella typhimurium and characterization of mutants., *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 7776–7785.
- [134] B. S. Vold, M. E. Longmire, D. E. Keith, Thiolation and 2-methylthio- modification of Bacillus subtilis transfer ribonucleic acids., *J. Bacteriol.* **1981**, 148, 869–876.

- [135] S. Kellner, J. Neumann, D. Rosenkranz, S. Lebedeva., R. F. Ketting, H. Zischler, D. Schneider, M. Helm, Profiling of RNA modifications by multiplexed stable isotope labelling, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 3516–3518.
- [136] T. Suzuki, T. Suzuki, A complete landscape of post-transcriptional modifications in mammalian mitochondrial tRNAs, *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42, 7346–7357.
- [137] K. H. Kaminska, U. Baraniak, M. Boniecki, K. Nowaczyk, A. Czerwoniec, J. M. Bujnicki, Structural bioinformatics analysis of enzymes involved in the biosynthesis pathway of the hypermodified nucleoside ms²io⁶A37 in tRNA, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2007**, 70, 1–18.
- [138] S. Arragain, S. K. Handelman, F. Forouhar, F.-Y. Wei, K. Tomizawa, J. F. Hunt, T. Douki, M. Fontecave, E. Mulliez, M. Atta, Identification of eukaryotic and prokaryotic methylthiotransferase for biosynthesis of 2-methylthio-N⁶-threonylcarbamoyladenine in tRNA., *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 28425–28433.
- [139] F. Pierrel, T. Douki, M. Fontecave, M. Atta, MiaB protein is a bifunctional radical-S-adenosylmethionine enzyme involved in thiolation and methylation of tRNA., *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 47555–47563.
- [140] J. Caillet, L. Droogmans, Molecular cloning of the Escherichia coli miaA gene involved in the formation of delta 2-isopentenyl adenosine in tRNA., *J. Bacteriol.* **1988**, 170, 4147–4152.
- [141] J. A. Moore, C. D. Poulter, Escherichia coli Dimethylallyl Diphosphate: tRNA Dimethylallyltransferase: A Binding Mechanism for Recombinant Enzyme†, *Biochemistry* **1997**, 36, 604–614.
- [142] B. Esberg, H. C. Leung, H. C. Tsui, G. R. Björk, M. E. Winkler, Identification of the miaB gene, involved in methylthiolation of isopentenylated A37 derivatives in the tRNA of Salmonella typhimurium and Escherichia coli., *J. Bacteriol.* **1999**, 181, 7256–7265.
- [143] F. Pierrel, G. R. Björk, M. Fontecave, M. Atta, Enzymatic modification of tRNAs: MiaB is an iron-sulfur protein., *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 13367–13370.
- [144] F. Pierrel, H. L. Hernandez, M. K. Johnson, M. Fontecave, M. Atta, MiaB Protein from Thermotoga maritima, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 29515–29524.

- [145] H. L. Hernández, F. Pierrel, E. Elleingand, R. García-Serres, B. H. Huynh, M. K. Johnson, M. Fontecave, M. Atta, MiaB, a Bifunctional Radical-S-Adenosylmethionine Enzyme Involved in the Thiolation and Methylation of tRNA, Contains Two Essential [4Fe-4S] Clusters†, *Biochemistry* **2007**, 46, 5140–5147.
- [146] A. Golovko, G. Hjälml, F. Sitbon, B. Nicander, Cloning of a human tRNA isopentenyl transferase, *Gene* **2000**, 258, 85–93.
- [147] V. Reiter, D. M. Matschkal, M. Wagner, D. Globisch, A. C. Kneuttinger, M. Müller, T. Carell, The CDK5 repressor CDK5RAP1 is a methylthiotransferase acting on nuclear and mitochondrial RNA, *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40, 6235–6240.
- [148] F.-Y. Wei, B. Zhou, T. Suzuki, K. Miyata, Y. Ujihara, H. Horiguchi, N. Takahashi, P. Xie, H. Michiue, A. Fujimura, T. Kaitsuka, H. Matsui, Y. Koga, S. Mohri, T. Suzuki, Y. Oike, K. Tomizawa, Cdk5rap1-Mediated 2-Methylthio Modification of Mitochondrial tRNAs Governs Protein Translation and Contributes to Myopathy in Mice and Humans, *Cell Metab.* **2015**, 21, 428–442.
- [149] S. Geiger, Untersuchungen zu den Interaktionspartnern modifizierter Nukleoside in messenger RNA, *Ludwig-Maximilians-Universität München* **2017**.
- [150] B. P. Anton, S. P. Russell, J. Vertrees, S. Kasif, E. A. Raleigh, P. A. Limbach, R. J. Roberts, Functional characterization of the YmcB and YqeV tRNA methylthiotransferases of *Bacillus subtilis*., *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38, 6195–205.
- [151] B. D. McLennan, Enzymatic demodification of transfer RNA species containing N⁶-(Δ^2 -isopentenyl) adenosine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, 65, 345–351.
- [152] H. Kasai, Y. Kuchino, K. Nihei, S. Nishimura, Distribution of the modified nucleoside Q and its derivatives in animal and plant transfer RNA's, *Nucleic Acids Res.* **1975**, 2, 1931–1940.
- [153] A. Costa, J.-P. Pais de Barros, G. Keith, W. Baranowski, J. Desgrès, Determination of queuosine derivatives by reverse-phase liquid chromatography for the hypomodification study of Q-bearing tRNAs from various mammal liver cells, *J. Chromatogr. B* **2004**, 801, 237–247.
- [154] D. Globisch, D. Pearson, A. Hienzsch, T. Brückl, M. Wagner, I. Thoma, P. Thumbs, V. Reiter, A. C. Kneuttinger, M. Müller, S. A. Sieber, T. Carell, Systems-Based Analysis of Modified tRNA Bases, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2011**, 50, 9739–9742.

- [155] W. R. Farkas, Effects of a Diet Deficient in Tyrosine and Queuine on Germfree Mice, *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 6832–6835.
- [156] J. P. Reyniers, J. R. Pleasants, B. S. Wostmann, J. R. Katze, W. R. Farkas, Administration of exogenous queuine is essential for the biosynthesis of the queuosine-containing transfer RNAs in the mouse., *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 11591–11594.
- [157] J. R. Katze, B. Basile, J. A. McCloskey, Queuine, a modified base incorporated posttranscriptionally into eukaryotic transfer RNA: wide distribution in nature., *Science* **1982**, 216, 55–56.
- [158] S. D. Skolnick, N. H. Greig, Microbes and Monoamines: Potential Neuropsychiatric Consequences of Dysbiosis, *Trends Neurosci.* **2019**, 42, 151–163.
- [159] H. M. Goodman, J. Abelson, A. Landy, S. Brenner, J. D. Smith, Amber Suppression: a Nucleotide Change in the Anticodon of a Tyrosine Transfer RNA, *Nature* **1968**, 217, 1019–1024.
- [160] B. P. Doctor, J. E. Loebel, M. A. Sodd, D. B. Winter, Nucleotide Sequence of Escherichia coli Tyrosine Transfer Ribonucleic Acid, *Science* **1969**, 163, 693–695.
- [161] H. M. Goodman, J. N. Abelson, A. Landy, S. Zadrazil, J. D. Smith, The Nucleotide Sequences of Tyrosine Transfer RNAs of Escherichia coli. Sequences of the Amber Suppressor su^+_{III} Transfer RNA, the Wild Type su^-_{III} Transfer RNA and Tyrosine Transfer RNAs Species I and II, *Eur. J. Biochem.* **1970**, 13, 461–483.
- [162] H. Kasai, Z. Ohashi, F. Harada, S. Nishimura, N. J. Oppenheimer, P. F. Crain, J. G. Liehr, D. L. Von Minden, J. A. McCloskey, Structure of the modified nucleoside Q isolated from Escherichia coli transfer ribonucleic acid. 7-(4,5-cis-Dihydroxy-1-cyclopenten-3-ylaminomethyl)-7-deazaguanosine, *Biochemistry* **1975**, 14, 4198–4208.
- [163] H. Kasai, K. Nakanishi, R. D. Macfarlane, D. F. Torgerson, Z. Ohashi, J. A. McCloskey, H. J. Gross, S. Nishimura, The structure of Q* nucleoside isolated from rabbit liver transfer ribonucleic acid, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 5044–5046.
- [164] D. W. Phillipson, C. G. Edmonds, P. F. Crain, D. L. Smith, D. R. Davis, J. A. McCloskey, Isolation and structure elucidation of an epoxide derivative of the hypermodified nucleoside queuosine from Escherichia coli transfer RNA., *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 3462–3471.

- [165] J. C. Salazar, A. Ambrogelly, P. F. Crain, J. A. McCloskey, D. Söll, A truncated aminoacyl-tRNA synthetase modifies RNA., *PNAS* **2004**, 101, 7536–7541.
- [166] Z. D. Miles, R. M. McCarty, G. Molnar, V. Bandarian, Discovery of epoxyqueuosine (oQ) reductase reveals parallels between halorespiration and tRNA modification., *PNAS* **2011**, 108, 7368–7372.
- [167] R. Zallot, R. Ross, W.-H. Chen, S. D. Bruner, P. A. Limbach, V. de Crécy-Lagard, Identification of a Novel Epoxyqueuosine Reductase Family by Comparative Genomics, *ACS Chem. Biol.* **2017**, 12, 844–851.
- [168] N. Okada, N. Shindo-Okada, S. Nishimura, Isolation of mammalian tRNA^{Asp} and tRNA^{Tyr} by lectin-Sepharose affinity column chromatography, *Nucleic Acids Res.* **1977**, 4, 415–423.
- [169] P. Thumbs, Synthese der natürlichen tRNA-Modifikation Galaktosylqueuosin und Untersuchungen zur Struktur der natürlichen tRNA-Modifikation Mannosylqueuosin, *Ludwig-Maximilians-Universität München* **2013**.
- [170] G. Ott, H. Kersten, Differential turnover of tRNAs of the queuosine family in *Dictyostelium discoideum* and its possible role in regulation., *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* **1985**, 366, 69–76.
- [171] R. Zallot, C. Brochier-Armanet, K. W. Gaston, F. Forouhar, P. A. Limbach, J. F. Hunt, Valerie de Crecy-Lagard, Plant, Animal, and Fungal Micronutrient Queuosine Is Salvaged by Members of the DUF2419 Protein Family, *Eur. J. Biochem.* **2014**, 168, 219–225.
- [172] G. Phillips, B. El Yacoubi, B. Lyons, S. Alvarez, D. Iwata-Reuyl, V. de Crécy-Lagard, Biosynthesis of 7-deazaguanosine-modified tRNA nucleosides: a new role for GTP cyclohydrolase I., *J. Bacteriol.* **2008**, 190, 7876–7884.
- [173] J. S. Reader, D. Metzgar, P. Schimmel, V. de Crécy-Lagard, Identification of four genes necessary for biosynthesis of the modified nucleoside queuosine., *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 6280–6285.
- [174] R. M. McCarty, A. Somogyi, V. Bandarian, *Escherichia coli* QueD Is a 6-Carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin Synthase †, *Biochemistry* **2009**, 48, 2301–2303.

- [175] R. M. McCarty, A. Somogyi, G. Lin, N. E. Jacobsen, V. Bandarian, The Deazapurine Biosynthetic Pathway Revealed: In Vitro Enzymatic Synthesis of PreQ₀ from Guanosine 5-Triphosphate in Four Steps, *Biochemistry* **2009**, 48, 3847–3852.
- [176] M. Watanabe, M. Matsuo, S. Tanaka, H. Akimoto, S. Asahi, S. Nishimura, J. R. Katze, T. Hashizume, P. F. Crain, J. A. McCloskey, N. Okada, Biosynthesis of archaeosine, a novel derivative of 7-deazaguanosine specific to archaeal tRNA, proceeds via a pathway involving base replacement on the tRNA polynucleotide chain., *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 20146–20151.
- [177] D. P. Dowling, N. A. Bruender, A. P. Young, R. M. McCarty, V. Bandarian, C. L. Drennan, Radical SAM enzyme QueE defines a new minimal core fold and metal-dependent mechanism, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10, 106–112.
- [178] N. Okada, N. Shindo-Okada, S. Sato, Y. H. Itoh, K. Oda, S. Nishimura, Detection of unique tRNA species in tumor tissues by Escherichia coli guanine insertion enzyme., *PNAS* **1978**, 75, 4247–4251.
- [179] N. Okada, S. Nishimura, Isolation and characterization of a guanine insertion enzyme, a specific tRNA transglycosylase, from Escherichia coli., *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 3061–3066.
- [180] N. Okada, S. Noguchi, H. Kasai, N. Shindo-Okada, T. Ohgi, T. Goto, S. Nishimura, Novel mechanism of post-transcriptional modification of tRNA. Insertion of bases of Q precursors into tRNA by a specific tRNA transglycosylase reaction., *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 3067–3073.
- [181] K. Reuter, R. Slany, F. Ullrich, H. Kersten, Structure and organization of Escherichia coli genes involved in biosynthesis of the deazaguanine derivative queuine, a nutrient factor for eukaryotes., *J. Bacteriol.* **1991**, 173, 2256–2264.
- [182] R. Slany, M. Bösl, H. Kersten, Transfer and isomerization of the ribose moiety of AdoMet during the biosynthesis of queuosine tRNAs, a new unique reaction catalyzed by the QueA protein from Escherichia coli, *Biochimie* **1994**, 76, 389–393.
- [183] F. Tuorto, C. Legrand, C. Cirzi, G. Federico, R. Liebers, M. Müller, A. E. Ehrenhofer-Murray, G. Dittmar, H. Gröne, F. Lyko, Queuosine-modified tRNAs confer nutritional control of protein translation, *EMBO J.* **2018**, 37, e99777.

- [184] V. de Crécy-Lagard, P. Boccaletto, C. G. Mangleburg, P. Sharma, T. M. Lowe, S. A. Leidel, J. M. Bujnicki, Matching tRNA modifications in humans to their known and predicted enzymes, *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47, 2143–2159.
- [185] W. R. Farkas, R. D. Singh, Guanylation of transfer ribonucleic acid by a cell-free lysate of rabbit reticulocytes, *J. Biol. Chem.* **1973**, 248, 7780–7785.
- [186] N. K. Howes, W. R. Farkas, Studies with a homogeneous enzyme from rabbit erythrocytes catalyzing the insertion of guanine into tRNA., *J. Biol. Chem.* **1978**, 253, 9082–9087.
- [187] C. Boland, P. Hayes, I. Santa-Maria, S. Nishimura, V. P. Kelly, Queuosine formation in eukaryotic tRNA occurs via a mitochondria-localized heteromeric transglycosylase., *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 18218–18227.
- [188] T. Ritschel, C. Atmanene, K. Reuter, A. Van Dorsselaer, S. Sanglier-Cianferani, G. Klebe, An Integrative Approach Combining Noncovalent Mass Spectrometry, Enzyme Kinetics and X-ray Crystallography to Decipher Tgt Protein-Protein and Protein-RNA Interaction, *J. Mol. Biol.* **2009**, 393, 833–847.
- [189] F. R. Ehrmann, J. Kalim, T. Pfaffeneder, B. Bernet, C. Hohn, E. Schäfer, T. Botzanowski, S. Cianféroni, A. Heine, K. Reuter, F. Diederich, G. Klebe, Austausch der Proteinkontaktflächen in der homodimeren tRNA-Guanin-Transglycosylase: ein Weg der funktionellen Regulation, *Angew. Chem.* **2018**, 130, 10242–10247.
- [190] I. Biela, N. Tidten-Luksch, F. Immekus, S. Glinca, T. X. P. Nguyen, H.-D. Gerber, A. Heine, G. Klebe, K. Reuter, Investigation of Specificity Determinants in Bacterial tRNA-Guanine Transglycosylase Reveals Queuine, the Substrate of Its Eucaryotic Counterpart, as Inhibitor, *PLoS One* **2013**, 8, e64240.
- [191] A. C. Kessler, S. S. Kulkarni, M. J. Paulines, M. A. T. Rubio, P. A. Limbach, Z. Paris, J. D. Alfonzo, Retrograde nuclear transport from the cytoplasm is required for tRNA^{Tyr} maturation in *T. brucei*, *RNA Biol.* **2018**, 15, 528–536.
- [192] E. Haumont, L. Droogmans, H. Grosjean, Enzymatic formation of queuosine and of glycosyl queuosine in yeast tRNAs microinjected into *Xenopus laevis* oocytes. The effect of the anticodon loop sequence, *Eur. J. Biochem.* **1987**, 168, 219–225.

- [193] N. Okada, S. Nishimura, Enzymatic synthesis of Q nucleoside containing mannose in the anticodon of tRNA: isolation of a novel mannosyltransferase from a cell-free extract of rat liver., *Nucleic Acids Res.* **1977**, 4, 2931–2937.
- [194] K. Zerfass, H. Beier, Pseudouridine in the anticodon G psi A of plant cytoplasmic tRNA^{Tyr} is required for UAG and UAA suppression in the TMV-specific context., *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, 5911–5918.
- [195] M. Bienz, E. Kubli, Wild-type tRNA^{Tyr}_G reads the TMV RNA stop codon, but Q base-modified tRNA^{Tyr}_Q does not, *Nature* **1981**, 294, 188–190.
- [196] H. Beier, M. Barciszewska, H.-D. Sicking, The molecular basis for the differential translation of TMV RNA in tobacco protoplasts and wheat germ extracts, *EMBO J.* **1984**, 3, 1091–1096.
- [197] D. R. Davis, C. A. Veltri, L. Nielsen, An RNA model system for investigation of pseudouridine stabilization of the codon-anticodon interaction in tRNA^{Lys}, tRNA^{His} and tRNA^{Tyr}, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1998**, 15, 1121–1132.
- [198] G. A. Hudson, R. J. Bloomingdale, B. M. Znosko, Thermodynamic contribution and nearest-neighbor parameters of pseudouridine-adenosine base pairs in oligoribonucleotides, *RNA* **2013**, 19, 1474–1482.
- [199] M. G. Goll, F. Kirpekar, K. A. Maggert, J. A. Yoder, C.-L. Hsieh, X. Zhang, K. G. Golic, S. E. Jacobsen, T. H. Bestor, Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2., *Science* **2006**, 311, 395–398.
- [200] M. Müller, M. Hartmann, I. Schuster, S. Bender, K. L. Thüring, M. Helm, J. R. Katze, W. Nellen, F. Lyko, A. E. Ehrenhofer-Murray, Dynamic modulation of Dnmt2-dependent tRNA methylation by the micronutrient queuine, *Nucleic Acids Res.* **2015**, 43, 10952–10962.
- [201] S. Johannsson, P. Neumann, A. Wulf, L. M. Welp, H.-D. Gerber, M. Krull, U. Diederichsen, H. Urlaub, R. Ficner, Structural insights into the stimulation of *S. pombe* Dnmt2 catalytic efficiency by the tRNA nucleoside queuosine, *Sci. Rep.* **2018**, 8, 1–10.
- [202] M. Schaefer, T. Pollex, K. Hanna, F. Tuorto, M. Meusbürger, M. Helm, F. Lyko, RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage., *Genes Dev.* **2010**, 24, 1590–1595.

- [203] F. Tuorto, R. Liebers, T. Musch, M. Schaefer, S. Hofmann, S. Kellner, M. Frye, M. Helm, G. Stoecklin, F. Lyko, RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, 19, 900–905.
- [204] B. Y. Lin, P. P. Chan, T. M. Lowe, tRNAviz: explore and visualize tRNA sequence features, *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47, W542–W547.
- [205] T. Pan, Modifications and functional genomics of human transfer RNA, *Cell Res.* **2018**, 28, 395–404.
- [206] M. Müller, C. Legrand, F. Tuorto, V. P. Kelly, Y. Atlasi, F. Lyko, A. E. Ehrenhofer-Murray, Queuine links translational control in eukaryotes to a micronutrient from bacteria, *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47, 3711–3727.
- [207] P. P. Chan, T. M. Lowe, GtRNADB 2.0: an expanded database of transfer RNA genes identified in complete and draft genomes, *Nucleic Acids Res.* **2016**, 44, D184–D189.
- [208] F. Meier, B. Suter, H. Grosjean, G. Keith, E. Kubli, Queuosine modification of the wobble base in tRNA^{His} influences ‘*in vivo*’ decoding properties., *EMBO J.* **1985**, 4, 823–827.
- [209] J. M. Zaborske, V. L. Bauer DuMont, E. W. J. Wallace, T. Pan, C. F. Aquadro, D. A. Drummond, A Nutrient-Driven tRNA Modification Alters Translational Fidelity and Genome-wide Protein Coding across an Animal Genus, *PLoS Biol.* **2014**, 12, e1002015.
- [210] H. Kersten, Alteration of tRNA Modification in Eukaryotes: Causes and Consequences, in *Modified Nucleosides and Cancer*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg **1983**, 255–263.
- [211] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, Biosynthese der Aminosäuren, in *Stryer Biochemie*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg **2013**, 714–743.
- [212] S. Kaufman, A new cofactor required for the enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine., *J. Biol. Chem.* **1958**, 230, 931–939.
- [213] S. Kaufman, Studies on the mechanism of the enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine., *J. Biol. Chem.* **1959**, 234, 2677–2682.

- [214] S. Kaufman, The structure of the phenylalanine-hydroxylation cofactor., *PNAS* **1963**, 50, 1085–1093.
- [215] S. Kaufman, Metabolism of the phenylalanine hydroxylation cofactor., *J. Biol. Chem.* **1967**, 242, 3934–3943.
- [216] T. Marks, W. Farkas, Effects of a Diet Deficient in Tyrosine and Queuine on Germ-free Mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 230, 233–237.
- [217] T. Rakovich, C. Boland, I. Bernstein, V. M. Chikwana, D. Iwata-Reuyl, V. P. Kelly, Queuosine Deficiency in Eukaryotes Compromises Tyrosine Production through Increased Tetrahydrobiopterin Oxidation, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 19354–19363.
- [218] C. Pathak, Y. K. Jaiswal, M. Vinayak, Queuine promotes antioxidant defence system by activating cellular antioxidant enzyme activities in cancer., *Biosci. Rep.* **2008**, 28, 73–81.
- [219] T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, H. Mori, Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection., *Mol. Syst. Biol.* **2006**, 2, 2006.0008.
- [220] N. Yamamoto, K. Nakahigashi, T. Nakamichi, M. Yoshino, Y. Takai, Y. Touda, A. Furubayashi, S. Kinjyo, H. Dose, M. Hasegawa, K. A. Datsenko, T. Nakayashiki, M. Tomita, B. L. Wanner, H. Mori, Update on the Keio collection of *Escherichia coli* single-gene deletion mutants, *Mol. Syst. Biol.* **2009**, 5, 335.
- [221] M. Hashimoto, T. Ichimura, H. Mizoguchi, K. Tanaka, K. Fujimitsu, K. Keyamura, T. Ote, T. Yamakawa, Y. Yamazaki, H. Mori, T. Katayama, J.-i. Kato, Cell size and nucleoid organization of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome, *Mol. Microbiol.* **2004**, 55, 137–149.
- [222] C. Bausch, N. Peekhaus, C. Utz, T. Blais, E. Murray, T. Lowary, T. Conway, Sequence analysis of the GntII (subsidiary) system for gluconate metabolism reveals a novel pathway for L-idonic acid catabolism in *Escherichia coli*., *J. Bacteriol.* **1998**, 180, 3704–3710.
- [223] M. K. Akhtar, N. J. Turner, P. R. Jones, Carboxylic acid reductase is a versatile enzyme for the conversion of fatty acids into fuels and chemical commodities., *PNAS* **2013**, 110, 87–92.

- [224] A. Pick, B. Rühmann, J. Schmid, V. Sieber, Novel CAD-like enzymes from *Escherichia coli* K-12 as additional tools in chemical production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97, 5815–5824.
- [225] J. L. Reed, T. R. Patel, K. H. Chen, A. R. Joyce, M. K. Applebee, C. D. Herring, O. T. Bui, E. M. Knight, S. S. Fong, B. O. Palsson, Systems approach to refining genome annotation., *PNAS* **2006**, 103, 17480–17484.
- [226] J. Kuivanen, P. Richard, The yjjN of *E. coli* codes for an l-galactonate dehydrogenase and can be used for quantification of l-galactonate and l-gulonate, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, 173, 1829–1835.
- [227] J. L. Dreyer, The role of iron in the activation of mannonic and altronic acid hydratases, two Fe-requiring hydro-lyases., *Eur. J. Biochem.* **1987**, 166, 623–630.
- [228] X. Qiu, Y. Tao, Y. Zhu, Y. Yuan, Y. Zhang, H. Liu, Y. Gao, M. Teng, L. Niu, Structural insights into decreased enzymatic activity induced by an insert sequence in mannonate dehydratase from Gram negative bacterium, *J. Struct. Biol.* **2012**, 180, 327–334.
- [229] T. V. McCarthy, T. Lindahl, Methyl phosphotriesters in alkylated DNA are repaired by the Ada regulatory protein of *E. coli*, *Nucleic Acids Res.* **1985**, 13, 2683–2698.
- [230] D. Mielecki, E. Grzesiuk, Ada response - a strategy for repair of alkylated DNA in bacteria., *FEMS Microbiol. Lett.* **2014**, 355, 1–11.
- [231] L. Zimmermann, K. Hantke, V. Braun, Exogenous induction of the iron dicitrate transport system of *Escherichia coli* K-12., *J. Bacteriol.* **1984**, 159, 271–277.
- [232] U. Pressler, H. Staudenmaier, L. Zimmermann, V. Braun, Genetics of the iron dicitrate transport system of *Escherichia coli*., *J. Bacteriol.* **1988**, 170, 2716–2724.
- [233] M. L. Guerinot, Microbial iron transport., *Annu. Rev. Microbiol.* **1994**, 48, 743–772.
- [234] V. Braun, M. Braun, Iron transport and signaling in *Escherichia coli*, *FEBS Lett.* **2002**, 529, 78–85.
- [235] A. H. Rosenberg, M. L. Gefter, An iron-dependent modification of several transfer RNA species in *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.* **1969**, 46, 581–584.

- [236] B. McLennan, M. Buck, J. Humphreys, E. Griffiths, Iron-related modification of bacterial transfer RNA, *Nucleic Acids Res.* **1981**, 9, 2629–2640.
- [237] M. Buck, E. Griffiths, Iron mediated methylthiolation of tRNA as a regulator of operon expression in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.* **1982**, 10, 2609–2624.
- [238] S. I. Patzer, M. R. Baquero, D. Bravo, F. Moreno, K. Hantke, The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IronN, *Microbiology* **2003**, 149, 2557–2570.
- [239] X. Thomas, D. Destoumieux-Garzón, J. Peduzzi, C. Afonso, A. Blond, N. Birlirakis, C. Goulard, L. Dubost, R. Thai, J. C. Tabet, S. Rebuffat, Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 28233–28242.
- [240] M. Kanehisa, S. Goto, KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 27–30.
- [241] M. Kanehisa, Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms, *Protein Sci.* **2019**, 28, 1947–1951.
- [242] M. Kanehisa, Y. Sato, M. Furumichi, K. Morishima, M. Tanabe, New approach for understanding genome variations in KEGG, *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47, D590–D595.
- [243] G. T. Berry, S. Segal, R. Gitzelmann, Disorders of galactose metabolism, in *Inborn Metab. Dis. Diagnosis Treat.*, Springer Berlin Heidelberg **2006**, 121–130.
- [244] C. A. Sellick, R. N. Campbell, R. J. Reece, Chapter 3 Galactose Metabolism in Yeast—Structure and Regulation of the Leloir Pathway Enzymes and the Genes Encoding Them, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2008**, 269, 111–150.
- [245] K. Lai, L. J. Elsas, K. J. Wierenga, Galactose toxicity in animals, *IUBMB Life* **2009**, 61, 1063–1074.
- [246] G. Novelli, J. K. Reichardt, Molecular Basis of Disorders of Human Galactose Metabolism: Past, Present, and Future, *Mol. Genet. Metab.* **2000**, 71, 62–65.
- [247] L. F. Leloir, The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative, *Arch. Biochem. Biophys.* **1951**, 33, 186–190.

- [248] D. M. Kingsley, K. F. Kozarsky, L. Hobbie, M. Krieger, Reversible defects in O-linked glycosylation and LDL receptor expression in a UDP-Gal UDP-GalNAc 4-epimerase deficient mutant, *Cell* **1986**, 44, 749–759.
- [249] J. M. I. Daenzer, R. D. Sanders, D. Hang, J. L. Fridovich-Keil, UDP-Galactose 4-Epimerase Activities toward UDP-Gal and UDP-GalNAc Play Different Roles in the Development of *Drosophila melanogaster*, *PLoS Genet.* **2012**, 8, e1002721.
- [250] M. Ichikawa, D. A. Scott, M.-E. Losfeld, H. H. Freeze, The metabolic origins of mannose in glycoproteins., *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 6751–6761.
- [251] V. Sharma, H. H. Freeze, Mannose Efflux from the Cells, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 10193–10200.
- [252] V. Sharma, M. Ichikawa, H. H. Freeze, Mannose metabolism: More than meets the eye, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, 453, 220–228.
- [253] E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R. D. Appel, A. Bairoch, ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 3784–3788.
- [254] L. Jeske, S. Placzek, I. Schomburg, A. Chang, D. Schomburg, BRENDA in 2019: a European ELIXIR core data resource, *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47, D542–D549.
- [255] A. B. Rogers, R. Z. Dintzis, Hepatobiliary System, *Comp. Anat. Histol.* **2018**, 229–239.
- [256] K. A. Dittmar, J. M. Goodenbour, T. Pan, Tissue-Specific Differences in Human Transfer RNA Expression, *PLoS Genet.* **2006**, 2, e221.
- [257] C. Kutter, G. D. Brown, Â. Gonçalves, M. D. Wilson, S. Watt, A. Brazma, R. J. White, D. T. Odom, Pol III binding in six mammals shows conservation among amino acid isotypes despite divergence among tRNA genes, *Nat. Genet.* **2011**, 43, 948–955.
- [258] E. B. Fern, P. J. Garlick, The specific radioactivity of the precursor pool for estimates of the rate of protein synthesis., *Biochem. J.* **1973**, 134, 1127–1130.
- [259] M. A. McNurlan, E. B. Fern, P. J. Garlick, Failure of leucine to stimulate protein synthesis in vivo., *Biochem. J.* **1982**, 204, 831–838.

- [260] P. J. Garlick, M. A. McNurlan, V. R. Preedy, A rapid and convenient technique for measuring the rate of protein synthesis in tissues by injection of [3H]phenylalanine, *Biochem. J.* **1980**, 192, 719–723.
- [261] P. Garlick, T. Burk, R. Swick, Protein synthesis and RNA in tissues of the pig, *Am. J. Physiol. Content* **1976**, 230, 1108–1112.
- [262] E. B. Fern, M. A. McNurlan, P. J. Garlick, Effect of malaria on rate of protein synthesis in individual tissues of rats., *Am. J. Physiol.* **1985**, 249, E485–E493.
- [263] S. Noguchi, Y. Nishimura, Y. Hirota, S. Nishimura, Isolation and characterization of an Escherichia coli mutant lacking tRNA-guanine transglycosylase. Function and biosynthesis of queuosine in tRNA., *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 6544–6550.
- [264] K. C. Stein, J. Frydman, The stop-and-go traffic regulating protein biogenesis: How translation kinetics controls proteostasis., *J. Biol. Chem.* **2019**, 294, 2076–2084.
- [265] Q. Gueranger, A. Kia, D. Frith, P. Karran, Crosslinking of DNA repair and replication proteins to DNA in cells treated with 6-thioguanine and UVA, *Nucleic Acids Res.* **2011**, 39, 5057–5066.
- [266] S. Johannsson, P. Neumann, R. Ficner, Crystal Structure of the Human tRNA Guanine Transglycosylase Catalytic Subunit QTRT1., *Biomolecules* **2018**, 8, 81.