



Analytische Methoden Hot Paper

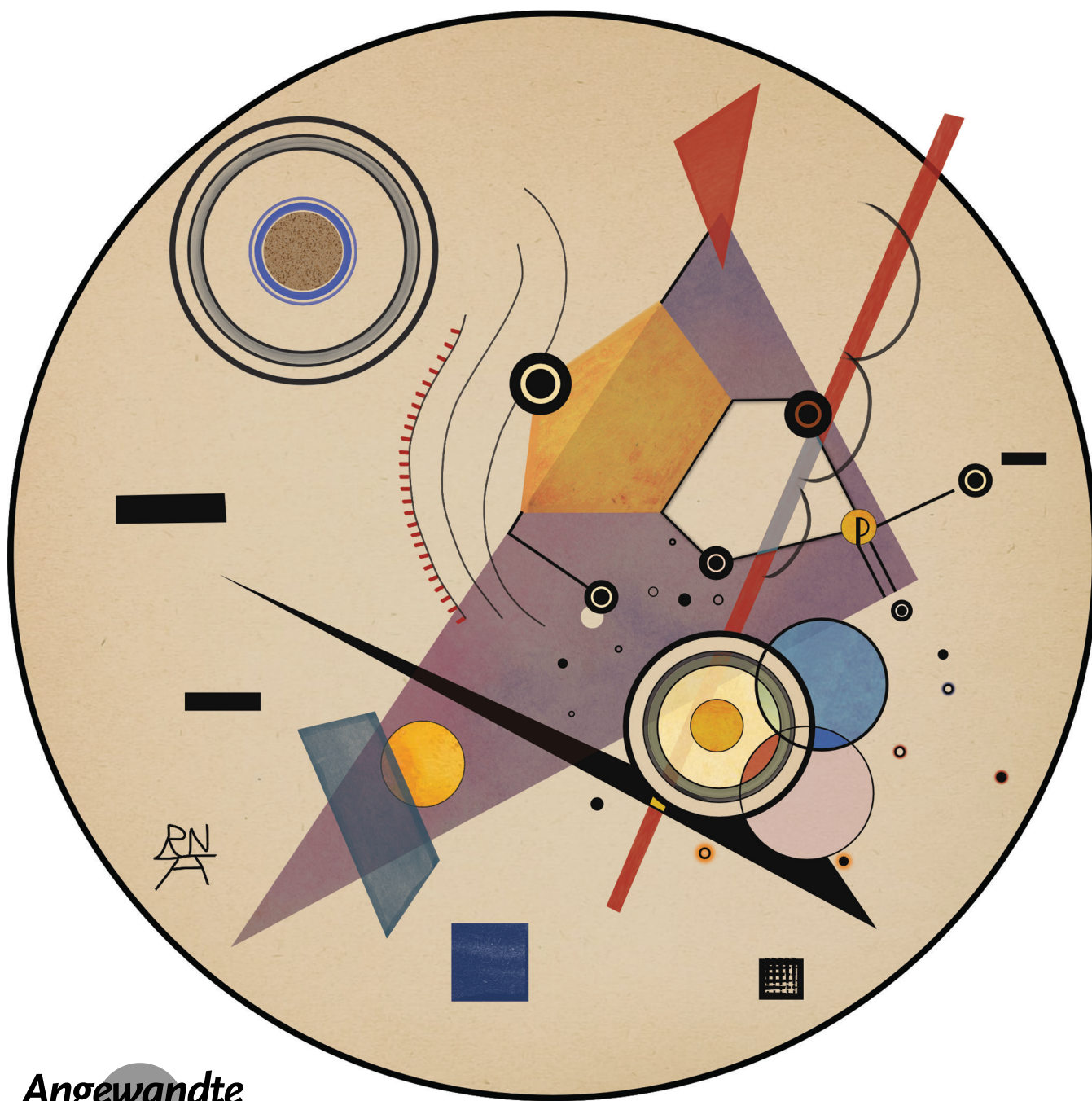
Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, 61, e202115481

Internationale Ausgabe: doi.org/10.1002/anie.202115481

Deutsche Ausgabe: doi.org/10.1002/ange.202115481

Untersuchung des reaktiven Intermediats der RNA Autohydrolyse mittels kryogener Infrarotspektroskopie in der Gasphase

Kim Greis⁺, Carla Kirschbaum⁺, Martín I. Taccone, Michael Götze, Sandy Gewinner, Wieland Schöllkopf, Gerard Meijer, Gert von Helden, und Kevin Pagel*

Angewandte
Chemie

Abstract: Im Laufe der COVID-19 Pandemie haben mRNA-basierte Impfstoffe an immenser Bedeutung gewonnen. Massenspektrometrie ist für die Entwicklung und Analyse von modifizierten RNA Molekülen unerlässlich, setzt jedoch ein grundlegendes Verständnis über Fragmentierungsprozesse voraus. Analog zu der Zersetzung von RNA in Lösung durch Autohydrolyse, kann die Spaltung des RNA Rückgrats ebenso in der Gasphase stattfinden. Bislang sind die Fragmentierungsmechanismen jedoch unzureichend untersucht. In dieser Arbeit wurden Intermediate aus isolierten RNA Dinukleotiden in der Gasphase generiert und mittels kryogener Infrarotspektroskopie in Helium-Nanotröpfchen untersucht. Die experimentellen Daten, unterstützt durch Dichtefunktionaltheorie, liefern Hinweise dafür, dass die Bildung eines fünfgliedrigen zyklischen Phosphat-Intermediats begünstigt ist, während lineare oder sechsgliedrige Strukturen ausgeschlossen werden können. Weiterhin zeigen die Experimente, dass eine zusätzliche, bekannte Reaktion von RNA Nukleotiden in Lösung auch in der Gasphase induziert werden kann: die Tautomerisierung von Cytosin. Die beiden beobachteten Reaktionen spiegeln daher universelle und intrinsische Eigenschaften der untersuchten Moleküle wider.

Durch die weltweite COVID-19 Pandemie hat die Entwicklung von mRNA Impfstoffen einen noch nie da gewesenen Schub erhalten.^[1] Ihr Erfolg kann dadurch erklärt werden, dass RNA Impfstoffe, im Gegensatz zu herkömmlichen Impfstoffen, schnell entwickelt, in großen Mengen produziert und an verschiedene Erreger angepasst werden können.^[2] Die Entwicklung von RNA-basierten Arzneimitteln ist auf fortgeschrittene analytische Methoden wie Massenspektrometrie (MS) angewiesen und erfordert ein tiefes Verständnis für Fragmentierungsmechanismen, um künstliche RNA Strukturen zuverlässig zu identifizieren.^[3]

DNA ist wesentlich stabiler als RNA. Der Stabilitätsunterschied kann auf die unterschiedlichen Zucker im Rückgrat zurückgeführt werden. Ribose in RNA enthält eine Hydroxylgruppe an der C2' Position, wodurch die Phosphodiesterbindung destabilisiert wird. Diese 2'-OH Gruppe

kann die Phosphatgruppe an C3' des Nukleotids intramolekular angreifen. Dies führt selbst in Abwesenheit von zersetzenden Enzymen zur Autohydrolyse der RNA. In Deoxyribose im Rückgrat der DNA ist diese OH Gruppe nicht vorhanden. Daher autohydrolysiert DNA nicht und DNA Fragmente können für Hunderte oder sogar Tausende von Jahren stabil bleiben.^[4]

Der Mechanismus der Autohydrolyse von RNA in vitro wurde umfassend untersucht.^[5] Durch einen nukleophilen Angriff der 2'-OH Gruppe am 3'-Phosphat wird die Reaktion initiiert und führt über ein Phosphoran zu einem zyklischen 2',3'-Phosphat, dem Schlüsselintermediat der RNA Autohydrolyse (Abbildung 1a). Anschließend wird das Intermediat in wässriger Lösung zu 2'- und 3'-Phosphat hydrolysiert. Unter sauren oder basischen Bedingungen kann die Autohydrolyse der RNA, im Vergleich zur spontanen Hydrolyse bei neutralem pH, um das Millionenfache beschleunigt werden.^[6]

Ähnlich wie in Lösung wird durch die 2'-OH Gruppe auch ein charakteristisches Verhalten von RNA in der Gasphase induziert. Die Fragmentierung von Ionen kann mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) in der Gasphase untersucht werden. Somit können Strukturinformationen über Nukleinsäuren erhalten werden.^[7] Der größte Unterschied in der Fragmentierung zwischen DNA und RNA ist die Bildung von *c*-Fragmenten aus RNA, welche nicht für DNA beobachtet werden können.^[8] *c*-Fragmente entstehen durch Spaltung der Bindung zwischen dem 5'-O und dem Phosphoratom (Abbildung S4).^[9] Ohne das mobile Proton der 2'-OH Gruppe kann diese Fragmentierung nicht stattfinden.^[10] Die *c*-Fragmente von RNA Dinukleotiden weisen das gleiche Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (*m/z*) auf wie das Schlüsselintermediat der basenkatalysierten RNA Autohydrolyse in Lösung. Ein Nachweis über den Fragmentierungsmechanismus oder die exakte Struktur der *c*-Fragmente ist allerdings noch ausstehend. In der Literatur wurden Mechanismen vorgeschlagen, die entweder über eine lineare Struktur^[10] oder durch die direkte Bildung eines 2',3'-zyklischen Nukleosidmonophosphats,^[11] analog zur Reaktion in Lösung, ablaufen. Im Falle von Dinukleotiden sind isomere 3',5'-zyklische Nukleosidmonophosphate ebenfalls denkbare Struktur motive der Fragment-Ionen (Abbildung 1b).

Infrarot (IR) Spektroskopie von Ionen in der Gasphase ist eine leistungsfähige Methode zur Strukturanalyse von intakten Molekül-Ionen oder kurzlebigen Fragmenten. Infrarot Multiphotonen Dissoziationsspektroskopie (IRMPD) wurde erfolgreich genutzt, um RNA Bausteine,^[12] Nukleosidtriphosphat-Ionen^[13] und 3',5'-cAMP^[14] zu charakterisieren. Kürzlich wurden intakte DNA Dinukleotid-Anionen mittels kryogener IR Spektroskopie in Heliumtröpfchen analysiert. Durch diese Technik kann eine höhere Auflösung erreicht werden, da die Ionen nicht thermisch angeregt werden.^[15] Bislang wurden jedoch mit keiner der beiden Methoden MS/MS Fragmente von Nukleotiden spektroskopisch charakterisiert.

Hier untersuchen wir *c*-Fragmente, die durch Dissoziation der deprotonierten RNA Dinukleotide ApA, GpG, UpG und CpG (Abbildung 1c) generiert wurden, mittels kryoge-

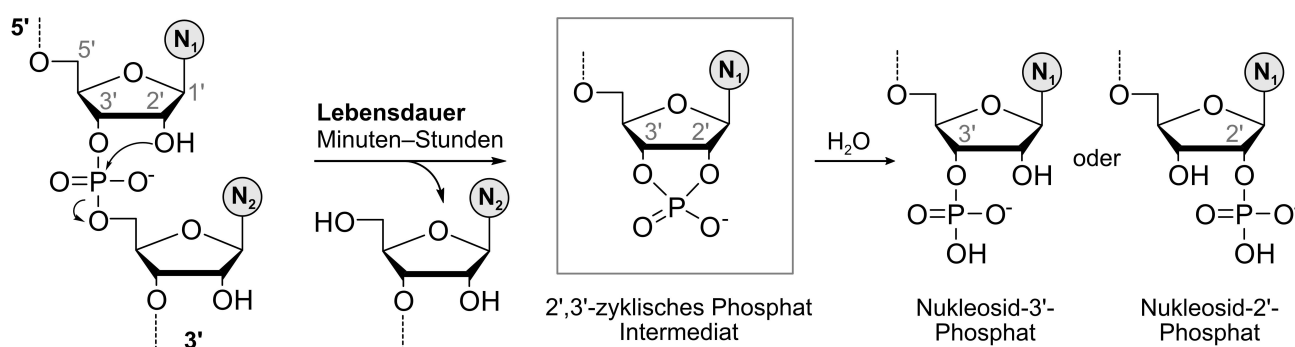
[*] K. Greis,[†] C. Kirschbaum,[†] Dr. M. Götze, Prof. K. Pagel
Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin
Arnimallee 22, 14195 Berlin (Deutschland)
E-mail: kevin.pagel@fu-berlin.de

K. Greis,[†] C. Kirschbaum,[†] Dr. M. I. Taccone, Dr. M. Götze, S. Gewinner, Dr. W. Schöllkopf, Prof. G. Meijer, Prof. G. von Helden,
Prof. K. Pagel
Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft
Faradayweg 4–6, 14195 Berlin (Deutschland)

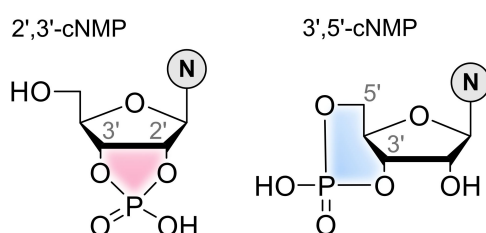
[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

© 2022 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial License, die eine Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird.

a. Autohydrolyse von RNA



b. Zyklische Nukleosidmonophosphate



c. Nukleobasen

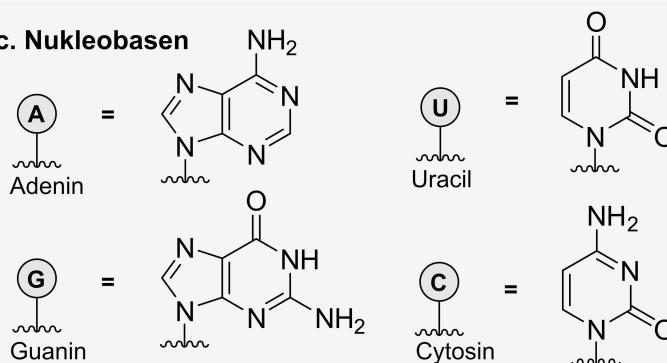


Abbildung 1. Durch Autohydrolyse wird die Stabilität von RNA beeinträchtigt. a) Schema der Autohydrolyse an einem RNA Strang mit dem 2',3'-zyklischen Phosphat Intermediat. Ein intramolekularer nukleophiler Angriff der 2'-OH Gruppe initiiert die Spaltung des Phosphodiesters. Durch die Abwesenheit der 2'-OH Gruppe in DNA wird die Spaltung dort verhindert. b) Strukturen der zyklischen Nukleosidmonophosphat Isomere. c) Nomenklatur und Strukturen der RNA Nukleobasen (N).

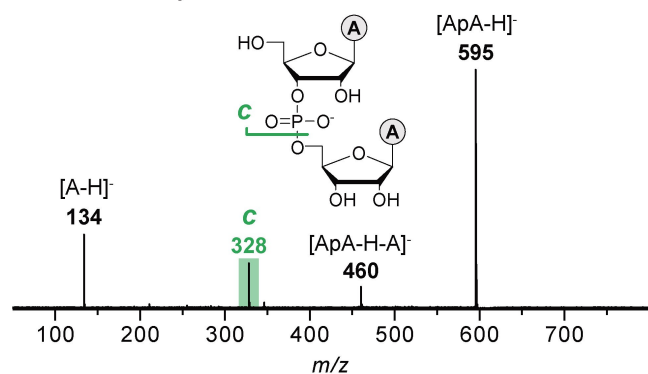
ner IR Spektroskopie in Heliumtröpfchen. Der experimentelle Aufbau wurde in früheren Arbeiten ausführlich beschrieben (siehe Hintergrundinformationen).^[16]

Die untersuchten Ionen wurden durch Nanoelectrosprayionisation und Fragmentierung in der Quelle durch Kollisionen mit Gasmolekülen gebildet. Der Fragmentierungsprozess ist identisch zu kollisionsinduzierter Dissoziation (CID). Die Ionen werden nach ihrem m/z -Verhältnis in einem Quadrupol Massenfilter selektiert und in einer Hexapol-Ionenfalle (90 K) akkumuliert und thermalisiert. Anschließend werden die gefangenen Ionen von Helium-Nanotröpfchen, die von einer Even-Lavie Düse erzeugt werden, aufgenommen.^[17] Innerhalb des Heliumtröpfchens werden die Ionen schnell auf 0.37 K gekühlt und in die Nähe des Detektors transportiert, wo der Heliumtröpfchenstrahl mit dem Infrarotstrahl des Freien Elektronen Lasers des Fritz-Haber-Instituts (FHI FEL)^[18] überlappt. Durch die Absorption von Photonen werden Schwingungsmoden angeregt, was zur Verdampfung der Heliumhülle und anschließender Freisetzung der Ionen führt. Die Ionenintensität wird mit einem Flugzeitmassenspektrometer gemessen und liefert als Funktion der Wellenzahl der Photonen ein Infrarotspektrum. Die experimentellen IR Spektren werden mit berechneten harmonischen Frequenzen verglichen. Dafür wurde der konformere Raum der 2',3'- und 3',5'-zyklischen Nukleo-

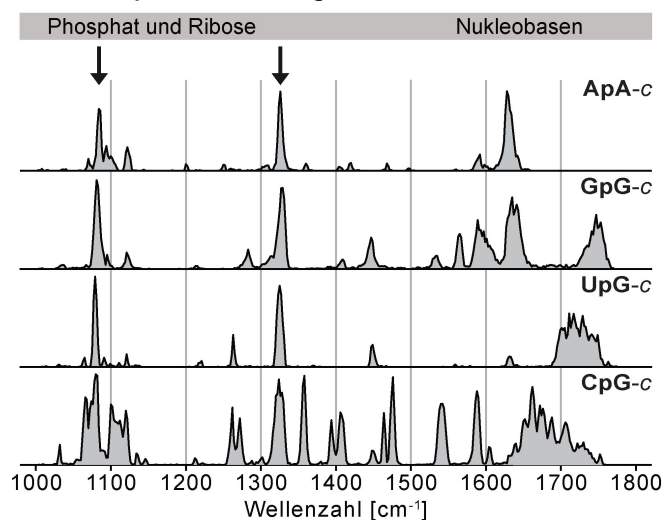
sidmonophosphate für jede Nukleobase mit Hilfe des Programms CREST^[19] mit der semiempirischen Methode GFN2-xTB^[20] untersucht. Unterschiedliche Konformere wurden optimiert und ihre harmonischen Frequenzen mit der PBE0+D3/def2-TZVPP^[21] Methode in Gaussian 16^[22] berechnet und mit einem empirischen Faktor von 0.965 skaliert. Anharmonische Frequenzen (GVPT2^[23]) wurden mit der PBE0+D3/def2-TZVP Methode berechnet. Lineare c -Fragmente wurden anschließend nicht weiter berücksichtigt, da ihre Strukturen bei der benutzten theoretischen Methode keine Minima auf der Potenzialhyperfläche der Ionen sind. Bei der Optimierung konvergieren derartige Strukturen in 2',3'-zyklische Nukleosidmonophosphate.

In Lösung kann die Autohydrolyse in der Abwesenheit von Enzymen oder externen Reaktionspartnern stattfinden (Abbildung 1). In der Gasphase kann die Spaltung von deprotonierten RNA Dinukleotiden durch Fragmentierung in der Quelle (Abbildung S2) induziert werden, was zu c -Fragmenten mit identischem m/z wie das des Intermediats der RNA Autohydrolyse in Lösung führt. Nachdem die Ionen in das Hochvakuum des Massenspektrometers überführt wurden, findet keine weitere Aktivierung statt. Das Molekül-Ion und seine Fragmente wurden mittels Flugzeitmassenspektrometrie (Abbildungen 2a und S3) detektiert. Anschließend wurden für jede Nukleobase kryogene IR

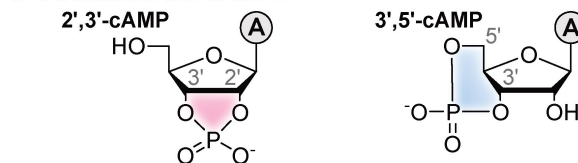
a. MS/MS von ApA



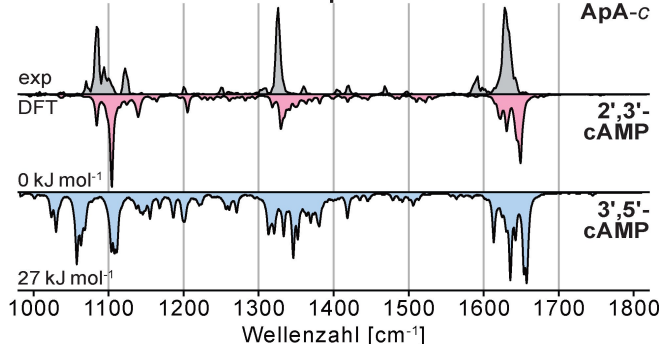
b. Infrarotspektren der c-Fragmente



c. Strukturen der cAMPs



d. Anharmonische DFT Frequenzen der cAMPs



e. Infrarotspektren der cAMPs

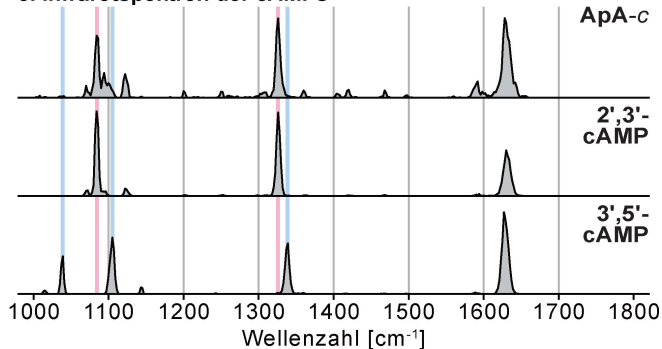


Abbildung 2. Die Fragmentierung von RNA führt zu 2',3'-zyklischen Phosphaten. a) Tandem-Massenspektren von ApA Dinukleotiden im Negativionenmodus unter Bedingungen, die zur Fragmentierung in der Quelle führen. Die dabei gebildeten *c*-Fragmente haben das gleiche *m/z*-Verhältnis wie das zyklische Phosphat-Intermediat, das während der RNA Autohydrolyse gebildet wird. b) Kryogene Infrarotspektren von den ApA, GpG, UpG und CpG *c*-Fragmenten. Banden zwischen 1000 und 1400 cm^{-1} stammen zu großen Teilen von der Ribose und dem Phosphat. Schwingungen zwischen 1400 und 1800 cm^{-1} stammen von den funktionellen Gruppen innerhalb der Nukleobasen. Die Positionen von Absorptionsbanden, die mit einem Pfeil gekennzeichnet sind, sind unabhängig von der Nukleobase und in jedem Spektrum vorhanden. c) Vereinfachte Strukturen von 2',3'- und 3',5'-zyklischen Adenosinmonophosphaten. d) Das experimentelle Spektrum des *c*-Fragments von deprotoniertem ApA (graue Spur) wird mit den berechneten anharmonischen Schwingungsspektren der Niedrigstenergiestrukturen von 2',3'-cAMP (rot) und 3',5'-cAMP (blau) verglichen. Die Spektren sind mit den freien Energien der berechneten Strukturen gekennzeichnet. e) Das experimentelle Spektrum des ApA *c*-Fragments wird mit denen von deprotonierten 2',3'-cAMP und 3',5'-cAMP verglichen. Diagnostische Banden werden mit blauen und roten Linien hervorgehoben. Die Absorptionsbanden zeigen eindeutig, dass fünf- und sechsgliedrige Phosphate unterschieden werden können.

Spektren von den gebildeten *c*-Fragmente aufgenommen, um deren Struktur zu bestimmen (Abbildung 2b). Alle IR Spektren weisen Ähnlichkeiten in der Fingerprintregion (ca. 1000–1400 cm^{-1}) auf, aber sind signifikant unterschiedlich in der Region der funktionellen Gruppen (ca. 1400–1800 cm^{-1}). Die Schwingungen in der Fingerprintregion stammen größtenteils von der Ribose und der Phosphatgruppe im Rückgrat des Nukleotids. Die beiden prominenten Absorptionsbanden bei 1082 und 1326 cm^{-1} können den symmetrischen und antisymmetrischen Streckerschwingungen der Phosphatgruppe zugeordnet werden. Die Nukleobasen absorbieren hauptsächlich zwischen 1400 und 1800 cm^{-1} . Weiterhin weist das IR Spektrum des *c*-Fragments, das

Cytosin (C) enthält, deutlich mehr Absorptionsbanden als die der anderen *c*-Fragmente auf.

Für *c*-Fragmente von Dinukleotiden sind bizyklische Strukturen denkbar, in denen der Phosphodiesterling entweder fünf- oder sechsgliedrig ist, da das Phosphat im Rückgrat sowohl von der 2'- als auch von der 5'-OH Gruppe angegriffen werden kann (Abbildung 2c). Die experimentellen Spektren wurden deshalb mit berechneten Energien und Frequenzen von repräsentativen Strukturen für beide Intermediate verglichen. Aus thermodynamischer Sicht ist die Bildung eines fünfgliedrigen zyklischen Phosphats gegenüber einem sechsgliedrigen Phosphat je nach Nukleobase um 5–27 kJ mol^{-1} (freie Energie, $\Delta F_{90\text{K}}$) bevorzugt (Tabellen S1–S4). Weiterhin stimmen die harmonischen Frequen-

zen der 2',3'-cNMPs gut mit den experimentellen Spektren überein (Abbildung S6). Die Frequenzen der 3',5'-cNMPs weisen weniger Übereinstimmungen mit dem experimentellen Spektrum auf, vor allem wegen zusätzlichen Absorptionsbanden zwischen 1020–1060 cm⁻¹ im berechneten Spektrum. Es ist auffallend, dass einige Absorptionen im experimentellen Spektrum deutlich breiter sind als in den simulierten harmonischen IR Spektren. Anharmonische Frequenzrechnungen zeigen, dass die Verbreiterung der Banden der *c*-Fragmente von ApA, GpG und UpG vor allem durch Anharmonizitäten bedingt ist (Abbildungen 2d und S8). Für *c*-Fragmente von CpG ist das experimentelle Spektrum jedoch deutlich komplexer und kann nicht allein durch Anharmonizitäten erklärt werden.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass es sich bei dem beobachteten Intermediat sehr wahrscheinlich um ein fünfgliedriges zyklisches Phosphat handelt. Um das Ergebnis zu bestätigen, wurden die IR Spektren von kommerziell verfügbaren 2',3'- und 3',5'-zyklischen Adenosinmonophosphat Anionen aufgenommen und mit dem Spektrum des ApA *c*-Fragments verglichen (Abbildungen 2e und S10). Die Spektren bestätigen, dass die Struktur des *c*-Fragments 2',3'-cAMP entspricht. Einige schwache Absorptionsbanden in dem Spektrum des *c*-Fragments von ApA sind im Spektrum von 2',3'-cAMP aufgrund von tagesabhängigen Fluktuationen der Laserenergie schwach aufgelöst, die Hauptabsorptionsbanden stimmen jedoch überein. Die Schwingungen

von 3',5'-cAMP sind stark verschoben und enthalten eine zusätzliche Absorptionsbande bei 1038 cm⁻¹, die zuvor mittels IRMPD Spektroskopie beobachtet wurde.^[14]

Aufgrund der unkomplizierten Zuordnung der Struktur der *c*-Fragmente von ApA mittels zyklischen Standards wurde die gleiche Herangehensweise benutzt, um mehr Informationen zu dem komplexen IR Spektrum des CpG *c*-Fragments zu erhalten. Die Spektren von 2',3'- und 3',5'-zyklischen Cytidinmonophosphat Anionen unter nicht aktivierenden Ionisierungsbedingungen weisen darauf hin, dass das *c*-Fragment von CpG ebenfalls ein fünfgliedriges zyklisches Phosphat enthält. Die Absorptionsbanden des 2',3'-cCMP Anions entsprechen dem Spektrum des *c*-Fragments von CpG (Abbildungen 3a und S11). Einige Banden im Spektrum des Fragments sind allerdings intensiver als für 2',3'-cCMP und die Spektren stimmen allgemein weniger gut überein als im Fall von Adenosin. Um den Ursprung der ungewöhnlichen Komplexität des Fragmentspektrums zu erörtern, wurden die zyklischen Cytidin Anionen vor der Aufnahme der IR Spektren aktiviert (Abbildung 3b). Interessanterweise stimmt das Spektrum von aktiviertem 2',3'-cCMP deutlich besser mit dem des *c*-Fragments überein als ohne Aktivierung. Einige Banden gewinnen an Intensität und die Breite des Signals bei 1600–1800 cm⁻¹ nimmt in Übereinstimmung mit dem Fragmentspektrum deutlich zu. Im Spektrum des 3',5'-cCMP Anions sind einige Banden nach der Aktivierung ebenfalls intensiver, allerdings weist

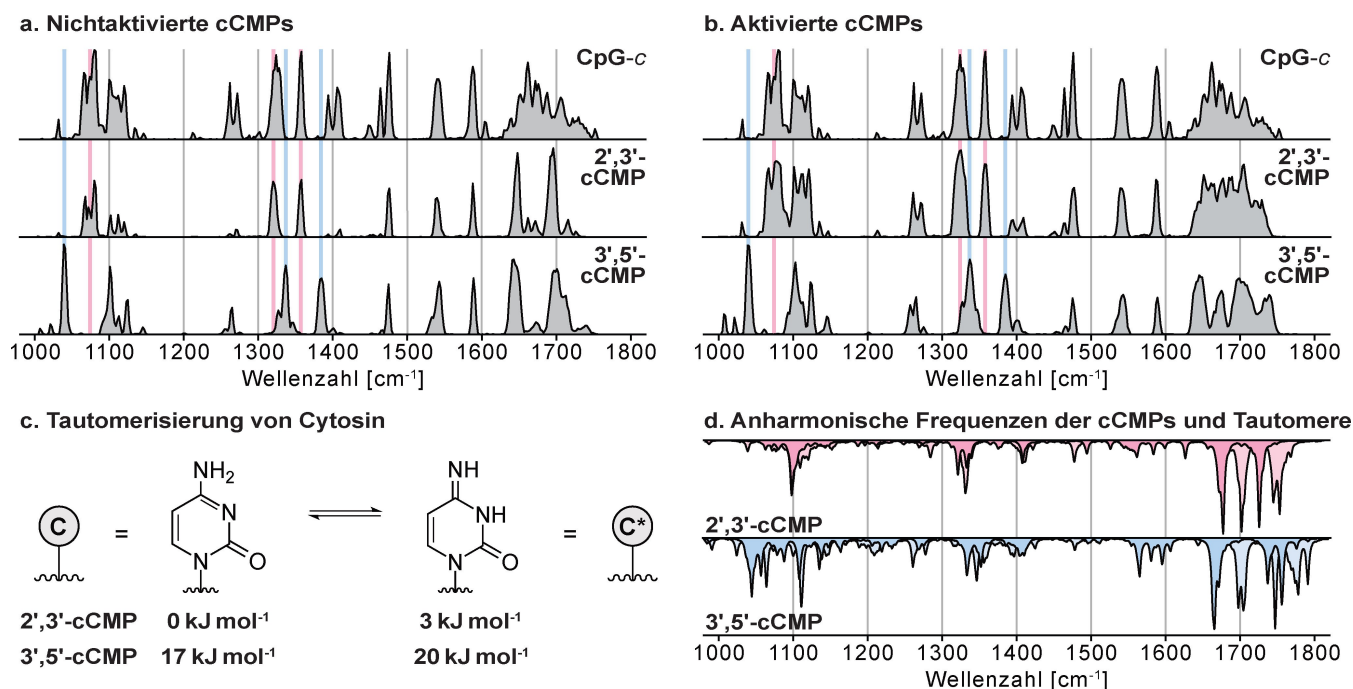


Abbildung 3. Tautomerisierung von Cytosin in der Gasphase. Experimentelles Infrarotspektrum des CpG *c*-Fragments, gebildet unter aktivierenden Ionisierungsbedingungen im Vergleich zu den Spektren von deprotonierten 2',3'- und 3',5'-cCMPs gebildet bei a) nicht-aktivierenden und b) aktivierenden Ionisierungsbedingungen. Die diagnostischen Absorptionsbanden von 2',3'-cCMP und 3',5'-cCMP sind jeweils in blau oder rot gekennzeichnet. Die Absorptionsbanden zeigen, dass das Fragment-Ion eine fünfgliedrige Struktur aufweist. Einige Schwingungsbanden, besonders jene oberhalb von 1400 cm⁻¹, sind komplexer und können nur unter aktivierenden Bedingungen gebildet werden, welche c) die Tautomerisierung der Nukleobase Cytosin induzieren. Laut Berechnungen beträgt die Differenz der freien Energie bei 90 K lediglich 3 kJ mol⁻¹ sowohl für das 2',3' als auch das 3',5' Isomer. d) Anharmonische Frequenzen bestätigen, dass die Koexistenz von tautomerisierten und nicht-tautomerisierten cCMPs in der Ionenfalle zu einer signifikanten Verbreiterung der Absorptionsbanden in der 1600–1800 cm⁻¹ Region führt.

das Infrarotspektrum wesentliche Unterschiede zu dem des Fragment-Ions auf.

Die deutlichsten Änderungen in den Spektren unter aktivierenden Ionisierungsbedingungen treten in der Region der funktionellen Gruppen auf ($1400\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$). Dies impliziert, dass die Aktivierung eher die Struktur der Nukleobase als das Rückgrat des Moleküls beeinflusst. Es ist bekannt, dass Cytosin in Lösung tautomerisieren kann, was zur Umsetzung der Amino-Oxo (C) in die Imino-Oxo (C*) Form führt (Abbildung 3c). In vivo kann dieser Prozess zu Fehlern in der Basenpaarung führen (CG $\rightarrow$ C*A), was Mutationen in dem folgenden Replikationszyklus hervorruft.^[24] In vorherigen Studien konnte Tautomerisierung von protonierten Nukleobasen in der Gasphase mittels IRMPD Spektroskopie und Differentieller Mobilitätsspektrometrie nachgewiesen werden.^[25] Für die physiologisch relevanteren deprotonierten Ionen wurde dieser Prozess jedoch bislang nicht untersucht.

Dichtefunktionaltheorie (DFT) Rechnungen zeigen, dass das C* Tautomer sowohl für deprotonierte 2',3'- als auch 3',5'-zyklische Cytidinmonophosphate um lediglich 3 kJ mol^{-1} destabilisiert ist (Abbildung 3c). Allerdings wurde für das 2',3'-Analogon eine substantielle Aktivierungsenergie von $+156\text{ kJ mol}^{-1}$ berechnet. Diese Barriere kann auf $+47\text{ kJ mol}^{-1}$ reduziert werden, wenn der Prozess durch ein Wassermolekül katalysiert wird. Durch Restwasser in der Ionisierungsquelle kann der Prozess demnach mit geringer Aktivierungsenergie stattfinden (siehe Abbildung S12 und Tabelle S5). Die harmonischen und anharmonischen Frequenzen von tautomerisiertem zyklischen Cytidinmonophosphat komplementieren die des nicht-tautomerisierten Isomers (Abbildungen 3d, S13 und S14), was die Herkunft der zahlreichen Absorptionsbanden erklärt, die für c-Fragmente und aktivierte cCMPs beobachtet wurden.

Zusammenfassend wurde in dieser Studie gezeigt, dass die im Massenspektrometer gebildeten c-Fragmente von RNA eine Struktur aufweisen, die identisch zu der des reaktiven Intermediates der RNA Autohydrolyse ist. Der Vergleich zwischen den Infrarotspektren von c-Fragmenten und denen von synthetischen zyklischen Nukleotiden in Verbindung mit DFT Rechnungen bestätigt eindeutig die charakteristische 2',3'-zyklische Struktur des Intermediates. Dies impliziert, dass die intramolekulare Zyklisierung von RNA Nukleotiden ein Prozess mit einer hohen intrinsischen Triebkraft ist. Die Ergebnisse stützen den vorgeschlagenen Fragmentierungsmechanismus, der einen nukleophilen Angriff der 2'-OH Gruppe an dem Phosphat statt der Bildung eines linearen Intermediates beinhaltet. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass die Tautomerisierung von Cytosin in der Gasphase stattfindet. Diese Tautomerisierung findet spontan in der Ionisierungsquelle unter aktivierenden Bedingungen statt und führt zu komplexeren IR Spektren. In einem breiteren Kontext zeigen unsere Ergebnisse, dass beide Prozesse, die intramolekulare Zyklisierung von RNA Nukleotiden und die Tautomerisierung von Cytidin in vollständiger Isolierung stattfinden können. Dies impliziert, dass beide Reaktionen intrinsisch für die individuellen Moleküle und unabhängig von deren Umgebung sind.

Danksagung

K.G. dankt dem Fonds National de la Recherche, Luxembourg, für die Förderung des Projektes GlycoCat (13549747). C.K. ist dankbar für die finanzielle Unterstützung des Fonds der Chemischen Industrie. M.I.T. dankt der Alexander von Humboldt Stiftung. M.G. und K.P. danken dem Europäischen Forschungsrat, ERC-2019-CoG-863934-GlycoSpec. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

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

Stichwörter: Autohydrolyse · Fragmentierung · Infrarotspektroskopie · Massenspektrometrie · RNA

- [1] J. W. Park, P. N. P. Lagniton, Y. Liu, R. H. Xu, *Int. J. Biol. Sci.* **2021**, *17*, 1446.
- [2] a) N. Pardi, M. J. Hogan, F. W. Porter, D. Weissman, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2018**, *17*, 261; b) C. Zhang, G. Maruggi, H. Shan, J. Li, *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 594; c) N. A. C. Jackson, K. E. Kester, D. Casimiro, S. Gurunathan, F. DeRosa, *NPJ Vaccines* **2020**, *5*, 11.
- [3] a) M. Taucher, K. Breuker, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11289; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11451; b) C. Wetzel, P. A. Limbach, *Analyst* **2016**, *141*, 16; c) K. Thüring, K. Schmid, P. Keller, M. Helm, *Methods* **2016**, *107*, 48; d) R. Lauman, B. A. Garcia, *Mol. Omics* **2020**, *16*, 305.
- [4] S. Pääbo, H. Poinar, D. Serre, V. Jaenicke-Despres, J. Hebler, N. Rohland, M. Kuch, J. Krause, L. Vigilant, M. Hofreiter, *Annu. Rev. Genet.* **2004**, *38*, 645.
- [5] H. Lönnerberg, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1687.
- [6] G. M. Emilsson, S. Nakamura, A. Roth, R. R. Breaker, *RNA* **2003**, *9*, 907.
- [7] S. Schürch, *Mass Spectrom. Rev.* **2016**, *35*, 483.
- [8] T. Y. Huang, A. Kharlamova, J. Liu, S. A. McLuckey, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 1832.
- [9] S. A. McLuckey, G. J. Berkel, G. L. Glish, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, *3*, 60.
- [10] a) S. Schürch, E. Bernal-Méndez, C. J. Leumann, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 936; b) J. M. Tromp, S. Schürch, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 1262.
- [11] a) T. E. Andersen, F. Kirpekar, K. F. Haselmann, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17*, 1353; b) C. Riml, H. Glasner, M. T. Rodgers, R. Micura, K. Breuker, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 5171; c) E. Fuchs, C. Falschlunger, R. Micura, K. Breuker, *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 7223.
- [12] a) Y. W. Nei, K. T. Crampton, G. Berden, J. Oomens, M. T. Rodgers, *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 10634; b) R. R. Wu, B. Yang, G. Berden, J. Oomens, M. T. Rodgers, *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 2795.

- [13] R. E. van Outersterp, J. Martens, G. Berden, J. D. Steill, J. Oomens, A. M. Rijs, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 28319.
- [14] B. Chiavarino, M. E. Crestoni, S. Fornarini, F. Lanucara, J. Lemaire, P. Maître, D. Scuderi, *Int. J. Mass Spectrom.* **2008**, *270*, 111.
- [15] D. A. Thomas, R. Chang, E. Mucha, M. Lettow, K. Greis, S. Gewinner, W. Schöllkopf, G. Meijer, G. von Helden, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22*, 18400.
- [16] a) E. Mucha, A. I. González Flórez, M. Marianski, D. A. Thomas, W. Hoffmann, W. B. Struwe, H. S. Hahm, S. Gewinner, W. Schöllkopf, P. H. Seeberger, G. von Helden, K. Pagel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 11248; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 11400; b) K. Greis, C. Kirschbaum, S. Lechnitz, S. Gewinner, W. Schöllkopf, G. von Helden, G. Meijer, P. H. Seeberger, K. Pagel, *Org. Lett.* **2020**, *22*, 8916; c) C. Kirschbaum, K. Greis, L. Polewski, S. Gewinner, W. Schöllkopf, G. Meijer, G. von Helden, K. Pagel, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 14827.
- [17] U. Even, *EPJ Tech. Instrum.* **2015**, *2*, 17.
- [18] W. Schöllkopf, S. Gewinner, H. Junkes, A. Paarmann, G. von Helden, H. P. Bluem, A. M. M. Todd, *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **2015**, 9512, 95121 L.
- [19] P. Pracht, F. Bohle, S. Grimme, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22*, 7169.
- [20] C. Bannwarth, S. Ehlert, S. Grimme, *J. Chem. Theory Comput.* **2019**, *15*, 1652.
- [21] a) J. P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77*, 3865; b) C. Adamo, V. Barone, *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 6158; c) S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, H. Krieg, *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 154104; d) F. Weigend, R. Ahlrichs, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 3297.
- [22] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, D. J. Fox, Wallingford, CT, **2016**.
- [23] a) V. Barone, *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 014108; b) V. Barone, J. Bloino, C. A. Guido, F. Lipparini, *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *496*, 157; c) J. Bloino, V. Barone, *J. Chem. Phys.* **2012**, *136*, 124108.
- [24] J. Florián, J. Leszczyński, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3010.
- [25] a) J. Y. Salpin, S. Guillaumont, J. Tortajada, L. MacAleese, J. Lemaire, P. Maître, *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 2235; b) A. Anwar, J. Psutka, S. W. C. Walker, T. Dieckmann, J. S. Janizewski, J. Larry Campbell, W. Scott Hopkins, *Int. J. Mass Spectrom.* **2018**, *429*, 174; c) J. M. Bakker, J.-Y. Salpin, P. Maître, *Int. J. Mass Spectrom.* **2009**, *283*, 214.

Manuskript erhalten: 14. November 2021
Akzeptierte Fassung online: 1. März 2022
Endgültige Fassung online: 24. März 2022