

**NMR-spektroskopische Methodenentwicklung an RNA  
und strukturelle Charakterisierung des transkriptionellen  
Adenin-RNA-Schalters**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim  
Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
**Senada Nozinovic**  
aus Zvornik/Bosnien und Herzegowina

Frankfurt am Main

2011

(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Thomas Prisner

Gutachter: Prof. Dr. Harald Schwalbe  
Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Datum der Disputation: 17.02.2012

Meiner Familie.







## Zusammenfassung

Die Untersuchung von RNA mittels NMR-Spektroskopie hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen, weil die Zahl der neu entdeckten RNA-Funktionen, wie z.B. RNA-Schalter in Bakterien, stark gestiegen ist. Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe der NMR-Spektroskopie einen Beitrag zum besseren Verständnis der biochemischen Prozesse, in die RNA-Moleküle involviert sein können, zu leisten.

**Im ersten Teil** dieser Arbeit (Kapitel 2, 3 und 4) werden zum einen die Entwicklung neuer Methoden für die RNA-Strukturbestimmung vorgestellt und zum anderen die Leistungsfähigkeit der modernen NMR-spektroskopischen Strukturaufklärung demonstriert.

**Im zweiten Teil** dieser Arbeit (Kapitel 5) wird die NMR-Spektroskopie zur Untersuchung der RNA-Schalter-Funktion eingesetzt. Die biologische Funktion von RNA oder Proteinen setzt oftmals eine dynamische Struktur voraus und involviert Konformationsänderungen infolge biochemischer Signalweiterleitung. Für die Charakterisierung solcher Prozesse eignet sich die NMR-Spektroskopie insbesondere gut, weil sie in Lösung unter verschiedenen Reaktionsbedingungen angewandt werden kann. Durch den direkten NMR-spektroskopischen Nachweis von Basenpaarungen können wichtige strukturelle Eigenschaften (Faltung, Strukturhomogenität und Dynamik) entschlüsselt und in einen Zusammenhang mit der Funktion gebracht werden.

Im Folgenden werden die einzelnen Kapitel vorgestellt.

Nachdem das **erste Kapitel** eine allgemeine Einleitung in die NMR-Spektroskopie, RNA-Struktur und Funktion der RNA-Schalter darstellt, folgt im **Kapitel 2** die Einführung einer neuen Methode, die eine quantitative Bestimmung der Torsionswinkel  $\alpha$  und  $\zeta$  in RNA/DNA mittels NMR-Spektroskopie ermöglicht (Abb. 1). Sie basiert auf der Wechselwirkung zwischen dem CH-Dipol und der  $^{31}\text{P}$ -CSA, die von der relativen Orientierung

abhängig ist. Die Methode wurde für die CH- und  $\text{CH}_2$ -Gruppen in Form von zwei Pulssequenzen (2D- und 3D- $\Gamma$ -HCP) zur Messung von insgesamt fünf kreuz-korrelierten Relaxationsraten entlang des RNA/DNA-Rückgrats optimiert. Die Funktionsfähigkeit der Methode wurde zunächst an der 14mer cUUCGg-Tetraloop RNA getestet und zur Bestimmung der Torsionswinkel  $\alpha$  und  $\zeta$  genutzt. Die Ergebnisse flossen in die Strukturrechnung der 14mer RNA, die im Kapitel 3 vorgestellt wird, mit ein.

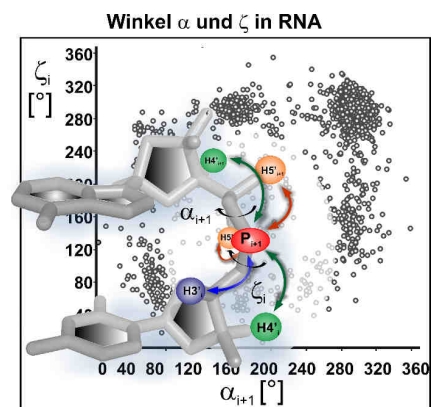


Abb. 1.:  $\zeta_i/\alpha_{i+1}$ -Verteilung in ribosomaler RNA.

Des Weiteren gelang es die Anwendbarkeit der Experimente an einer größeren 27mer RNA zu demonstrieren. Die neue Methode ist deswegen von Bedeutung, weil die Winkel  $\alpha$  und  $\zeta$  nicht über  $^3J$ -Kopplungskonstanten gemessen werden können.

(Nozinovic, S., Richter, C., Rinnenthal, J., Fürtig, B., Duchardt-Ferner, E., Weigand, J. E., Schwalbe, H. (2010), *J. Am. Chem. Soc.* 132, 10318-10329.)

Im **Kapitel 3** wird die NMR-spektroskopische Bestimmung der Struktur einer Model-RNA, der 14mer cUUCGg-Tetra-loop RNA, vorgestellt (Abb.2). Die Strukturrechnung wurde mit verschiedenen NMR-Datensätzen, die in der Arbeitsgruppe einschließlich dieser Doktorarbeit gesammelt wurden, durchgeführt.

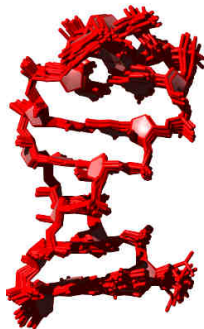


Abb. 2. : 14mer RNA.

Zusammen mit den Ergebnissen aus dem Kapitel 2 konnte eine sehr präzise Struktur mit einem RMSD von 0,37 Å (20 Strukturen) in sehr guter Übereinstimmung mit experimentellen Daten ermittelt werden. Die gerechnete Struktur repräsentiert eine der gegenwärtig genauesten und umfassendsten Strukturbestimmungen einer RNA, bei der jeder Torsionswinkel quantitativ bestimmt wurde. Einen besonderen Höhepunkt stellt die strukturelle Analyse der 2'OH-Gruppen dar, die im anschließenden Kapitel 4 weiter vertieft wurde.

(Nozinovic, S., Fürtig, B., Jonker, H. R. A., Richter, C., Schwalbe, H. (2010), *Nucleic Acids Res.* 38, 683-694)

Über Jahre war bekannt, dass die Größe der  $^1J(C1',H1')$ - und  $^1J(C2',H2')$ -Kopplungskonstanten innerhalb der Ribonukleotide von der lokalen Struktur des Zuckers und der Orientierung der Nukleobase beeinflusst wird. In dieser Arbeit (**Kapitel 4**) wurde zum ersten Mal ein systematischer Vergleich zwischen NMR-Messungen und DFT-Rechnungen durchgeführt, der eine eindeutige Zuordnung der Hauptkonformationen des Zuckers ( $C3'$ - oder  $C2'$ -endo) und der Nukleobase (*anti* oder *syn*) anhand der  $^1J(C,H)$ -Kopplungskonstanten erlaubt. Die beschriebene Methode wurde an einer größeren 27mer RNA erfolgreich erprobt. Weiterhin wurde erstmalig entdeckt, dass zudem die Orientierung der 2'OH-Gruppe einen signifikanten Einfluss auf die  $^1J(C,H)$ -Kopplungen hat (Abb. 3). Mithilfe von NMR-Messungen und DFT-Rechnungen konnte aus  $^1J(C,H)$ -Kopplungskonstanten die Orientierung von allen 2'OH-Gruppen in der 14mer cUUCGg-Tetra-loop RNA bestimmt werden. Die Methode hat den großen Vorteil, dass 2'OH-Gruppen, die aufgrund des schnellen Austauschs mit Wasser oder  $D_2O$  keine NMR-Signale liefern, analysiert werden können.

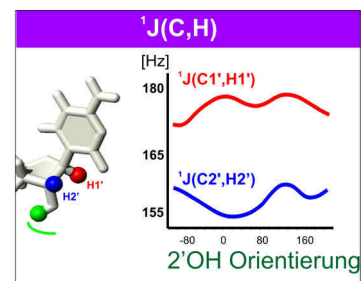


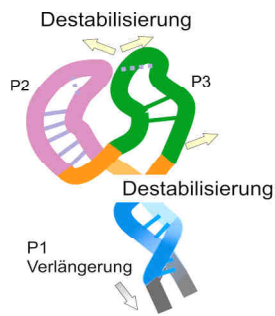
Abb. 3:  $^1J(C,H)$  in Abhängigkeit von der 2'OH-Orientierung.

(Nozinovic, S., Gupta, P., Fürtig, B., Richter, C., Tüllmann, S., Duchardt-Ferner, E., Holthausen, M. C., Schwalbe, H. (2011), *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 5397-5400)



Im **Kapitel 5** wird eine NMR-spektroskopische Untersuchung an der Aptamerdomäne des Adeninbindenden RNA-Schalters (*pbuE*) vorgestellt. Im Fokus der Forschung stand die Frage: *Welchen Einfluss hat die Länge der P1-Helix auf die Struktur und die Ligandbindung der freien Aptamerdomäne?*

Durch den Vergleich von zwei Konstrukten mit unterschiedlich langer P1-Helix war es möglich, intrinsische Scherkräfte, die durch die Ausbildung der P1-Helix in der freien Aptamerdomäne entstehen, festzustellen. Es hat sich im Konstrukt mit der verlängerten P1-Helix gezeigt, dass diese zur Destabilisierung der P3-Helix und des Schlaufenkontakts führen (Abb. 4).



Diese strukturellen Änderungen haben außerdem zur Folge, dass die Bindungsstärke des Liganden reduziert wird. Die Ergebnisse zeigen, dass ein strukturelles Gleichgewicht zwischen Sekundärstrukturelementen die tertiäre Faltung beeinflusst und die Funktion moduliert.

(Nozinovic, S., Reining, A., Noeske, J., Wöhnert, J., Schwalbe, H. (2011), in Vorbereitung)

Abb. 4: Einfluss der Verlängerung der P1-Helix auf die Aptamerstruktur.



---

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Zusammenfassung</b>	<b>I</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>1 Allgemeine Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Anwendung der NMR-Spektroskopie	1
1.1.1 NMR-Spektroskopie in der Strukturbiologie	1
1.1.2 NMR-Spektroskopie in der Wirkstoffentwicklung und Medizin	4
1.1.3 NMR-Spektroskopie & RNA	4
1.1.4 Grundlagen der NMR-Spektroskopie	6
1.1.5 NMR-Strukturparameter	7
1.1.6 Strukturrechnung	18
1.1.7 Untersuchung der Moleküldynamik	20
1.1.8 Literatur	21
1.2 Aufbau und Struktur von RNA/DNA	24
1.2.1 Primäre Struktur	24
1.2.2 Sekundäre Struktur	27
1.2.3 Tertiäre Struktur	29
1.2.4 Literatur	31
1.3 RNA-Schalter: Mechanismus und Struktur	33
1.3.1 Geschichte	33
1.3.2 Verwendung der RNA-Schalter	34
1.3.3 Regulationsmechanismen und Vorkommen der RNA-Schalter	35
1.3.4 Struktur und Bindungsmodus der Ligand-gebundenen Aptamerdomänen der RNA-Schalter	40
1.3.5 Kopplung zwischen Struktur und Funktion: <i>Ligand-induzierte</i> Faltung	42
1.3.6 Wettlauf mit der Transkription - Zeitliche Aspekte der Ligand-Bindung und RNA-Faltung	43
1.3.7 Purin-bindende RNA-Schalter – Stand der Forschung	44
1.3.8 Literatur	46
<b>2 <math>\Gamma</math>-HCP Pulssequenz zur Bestimmung der Torsionswinkel <math>\alpha</math> und <math>\zeta</math> in RNA/DNA</b>	<b>49</b>

2.1	Einleitung	51
2.2	Material und Methoden	52
2.2.1	NMR-Spektroskopie und Probe	52
2.2.2	Theoretische Grundlagen der Pulssequenz	53
2.2.3	Datenanalyse	59
2.3	Ergebnisse	62
2.4	Diskussion	69
2.5	Zusammenfassung	71
2.6	Literatur	73
<b>3</b>	<b>NMR-Lösungsstruktur der 14mer cUUCGg-Tetraloop RNA</b>	<b>75</b>
3.1	Einleitung	77
3.2	Material und Methoden	79
3.2.1	Probe und NMR-Spektroskopie	79
3.2.2	Strukturrechnung	81
3.3	Ergebnisse	81
3.3.1	NMR-Daten und Strukturparameter	81
3.3.2	NOE-Abstandsbeschränkungen	86
3.3.3	Winkelbeschränkungen und dipolare Restkopplungen (RDC)	87
3.3.4	Basenplanarität und Temperaturabhängigkeit der $^hJ(N,N)$ -Kopplungen	90
3.3.5	Lösungsstruktur der 14mer cUUCGg-Tetraloop RNA	92
3.3.6	Zuordnung und Konformationsanalyse der 2'OH-Gruppen	97
3.4	Diskussion	99
3.4.1	Konformationsanalyse der 14mer cUUCGg-Tetraloop RNA	99
3.4.2	Vergleich mit anderen Strukturen des cUUCGg-Tetraloops	101
3.4.3	Austausch mit Wasser	101
3.4.4	Schlussfolgerung	102
3.5	Literatur	103
<b>4</b>	<b>Konformationsbestimmung der 2'OH-Gruppe in RNA mittels NMR-Spektroskopie und DFT-Rechnungen</b>	<b>105</b>
4.1	Einleitung	107
4.2	Material und Methode	109
4.2.1	Probe	109
4.2.2	Messung der $^1J(C,H)$ -Kopplungskonstanten	109
4.2.3	DFT-Rechnungen	110
4.3	Ergebnisse	110
4.4	Temperaturabhängigkeit der $^1J(C,H)$ -Kopplungskonstanten	116
4.5	Zusammenfassung und Diskussion	117
4.6	Literatur	118

<b>5</b>	<b>Einfluss der Länge der P1-Helix auf Struktur und Bindung des <i>pbuE</i> Adenin-RNA-Schalters</b>	<b>121</b>
5.1	Einleitung	123
5.2	Material und Methoden	125
5.2.1	RNA-Konstrukte	125
5.2.2	Chemisch synthetisierte RNA-Konstrukte	126
5.2.3	DNA-Templat und -Synthese	127
5.2.4	DNA-Aufreinigung	127
5.2.5	RNA-Synthese durch <i>in vitro</i> Transkription	128
5.2.6	HPLC-Reinigung	128
5.2.7	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	129
5.2.8	Faltung der RNA/NMR-Puffer	130
5.2.9	Native Polyacrylamidgelelektrophorese	130
5.3	Ergebnisse	130
5.3.1	NMR-Probe	130
5.3.2	Teilstrukturen der Aptamerdomäne: Apt-P2, Apt-P3, Apt-P2-3	130
5.3.3	Aptamerdomänen mit der stabilisierten P1-Helix (A-Apt-P1 <sup>S</sup> )	133
5.3.4	Aptamerdomänen mit der nativen P1-Helix (A-Apt-P1 <sup>N</sup> )	136
5.3.5	Untersuchung der thermischen Stabilität	140
5.4	Interpretation der Ergebnisse	142
5.5	Zusammenfassung und Ausblick	147
5.6	Literatur	148
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>151</b>
6.1	Anhang I: $\Gamma$ -HCP-Pulssequenzen und <i>Mathematica</i> -Skripte	151
6.1.1	A - 2D- $\Gamma$ -HC(P): CH-Gruppe, Referenzexperiment	151
6.1.2	B - 2D- $\Gamma$ -HC(P): CH-Gruppe, Kreuzexperiment	153
6.1.3	C - 2D- $\Gamma$ -H(C)P: C4'H4'-Gruppe, Referenzexperiment	155
6.1.4	D - 2D- $\Gamma$ -H(C)P: C4'H4'-Gruppe, Kreuzexperiment	157
6.1.5	E - 3D- $\Gamma$ -HC(P): CH <sub>2</sub> -Gruppe, Referenzexperiment	159
6.1.6	F - 3D- $\Gamma$ -HC(P): CH <sub>2</sub> -Gruppe, Kreuzexperiment	162
6.1.7	G ( <i>Mathematica</i> : Geometrie C3'-H3'-P5' <sub>i</sub> )	165
6.1.8	H ( <i>Mathematica</i> : Geometrie C4'-H4'-P5' <sub>i</sub> + Rechnung: $\alpha/\beta$ aus H4'- $\Gamma$ -Raten)	166
6.1.9	I ( <i>Mathematica</i> : Geometrie C4'-H4'-P3' <sub>i+1</sub> )	167
6.1.10	J ( <i>Mathematica</i> : Geometrie C5'-H5'(proR)-P5' <sub>i</sub> + Rechnung: $\alpha/\beta$ aus H5'- $\Gamma$ -Raten)	168
6.1.11	K ( <i>Mathematica</i> : Geometrie C5'-H5'(proS)-P5' <sub>i</sub> + Rechnung: $\alpha/\beta$ aus H5'- $\Gamma$ -Raten)	169
6.1.12	L ( <i>Mathematica</i> : Rechnung: $\epsilon/\zeta$ aus H3'- $\Gamma$ -Raten)	170
6.1.13	M ( <i>Mathematica</i> : Rechnung: $\epsilon/\zeta$ aus H4'- $\Gamma$ -Raten)	171
6.1.14	N ( <i>Mathematica</i> : Rechnung: $\epsilon/\zeta$ aus H3'/H4'- $\Gamma$ -Raten)	172
6.1.15	Anhang I-O: Definition der RNA-Konformationsklassen	174

6.2	Anhang II: Pulssequenzen(HNN-COSY) / NOE-Intensitäten	175
6.3	Anhang III: DFT-Rechnungen	185
6.4	Anhang IV: NMR-Resonanzzuordnung der RNA-Schalter	188
	<b>Danksagung</b>	<b>191</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>193</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>195</b>

# Abkürzungsverzeichnis

°C	Temperatur in Grad Celsius
1D, 2D,...,nD	ein-, zweidimensional,..., n-dimensional
2'-dG	2'-Deoxyguanosin
5'-UTR	5'- <i>untranslated region</i> , 5'-nichttranslierter Bereich
A, Ade	Adenin
Abb.	Abbildung
B <sub>0</sub>	Feldstärke des magnetischen Hauptfeldes
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C, <sup>13</sup> C	<i>carbon</i> , Kohlenstoff
C, Cyt	Cytosin
CD	<i>circular dichroism</i> , Circulardichroismus
c-di-GMP	<i>cyclic diguanylate</i> , zyklisches Diguanosinmonophosphat
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CSA	<i>chemical shift anisotropy</i> , Chemische Verschiebungsanisotropie
δ	chemische Verschiebung oder Torsionswinkel
δ <sub>xx</sub>	axiale Komponente der CSA
D <sub>2</sub> O	deutერიertes Wasser
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DD	Dipol-Dipol
DEAE	<i>diethylaminoethyl-sepharose</i> , Anionenaustauschermatrix
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DQC/ZQC	<i>double quantum /zero quantum coherence</i> , Doppelquanten-Kohärenz/Nullquanten-Kohärenz
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> , Ethylendiaminotetraessigsäure
eq	equivalent, Äquivalente
et al.	und andere
FID	<i>free induction decay</i> , freier Induktionszerfall
FMN	Flavinmononukleotid
FT	Fourier-Transformation
Γ	Gamma, kreuzkorrelierte Relaxationsraten
G, Gua	Guanin
GARP	<i>globally optimized alternating phase rectangular pulse</i>
h	Stunde
H, <sup>1</sup> H	<i>hydrogen</i> , Wasserstoff
hetNOE	NOE zwischen heteronuklearen Kernen
H <sub>2</sub> O	Wasser

HPLC	<i>high pressure (performance) liquid chromatography</i> , Hochdruck(leistungs)-Flüssigchromatographie
Hyp	Hypoxantin
Hz	Hertz
J	skalare Kopplungskonstante
k	Geschwindigkeitskonstante
$K_D$	Dissoziationskonstante
KCl	Kaliumchlorid
$KH_2PO_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
$K_2HPO_4$	Dikaliumhydrogenphosphat
$K_xK_yPO_4$	Mischung aus Kaliumdihydrogenphosphat und Dikaliumhydrogenphosphat
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
M	Molar
m	Meter
$Mg^{2+}$	Magnesium-Kation
$MgCl_2$	Magnesiumdichlorid
min	Minute
mRNA	Messenger RNA, Boten-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
n.d.	nicht definiert
N, $^{15}N$	nitrogen, Stickstoff
N, Nuk	Nukleotid, A, G, C oder U
NaOAc	Natrium-Acetat
NMP	Nukleotidmonophosphat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernmagnetische Resonanz
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i> , Kern-Overhauser-Effekt
NOESY	<i>nuclear Overhauser and exchange spectroscopy</i>
nt	Nukleotid
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	optische Dichte
ODxxx	optische Dichte bei xxx nm
P, $^{31}P$	Phosphor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
pdb	<i>protein data bank</i> , Proteindatenbank
pH	Maß für die saure und alkalische Reaktion einer wässrigen Lösung
ppm	<i>parts per million</i> , Einheit der chemischen Verschiebung
PRE	<i>paramagnetic relaxation enhancement</i> , paramagnetische Relaxationserhöhung
preQ <sub>1</sub>	Pre-Queosine <sub>1#</sub>
rCSA	<i>residual chemical shift anisotropy</i> , restliche Anisotropie der chemischen Verschiebung
RDC	<i>residual coupling constants</i> , dipolare Restkopplung
RMSD	<i>root mean square deviation</i> , Standardabweichung
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
ROE	<i>rotating frame Overhauser effect</i>
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunde
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-adenosylmethionin
SD	Shine-Dalgarno
SELEX	<i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
S/N	<i>Single-to-noise ratio</i> , Singal-zu-Rausch Verhältnis



T, Thy	Thymin
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBE	Tris/Borat/EDTA
TP	Thiaminmonophosphat
TPP	Thiaminopyrophosphat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
T <sub>1</sub>	longitudinale Relaxationszeit
T <sub>2</sub>	transversale Relaxationszeit
U, Ura	Uracil
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WATERGATE	<i>water suppression by gradient-tailored excitation</i> , Technik zur Unterdrückung des H <sub>2</sub> O-NMR-Signals
%	Prozent







# 1 Allgemeine Einleitung

---

## 1.1 Anwendung der NMR-Spektroskopie

### 1.1.1 NMR-Spektroskopie in der Strukturbiologie

Proteine und RNAs sind biologische Polymere, die verschiedene Aufgaben in der Zelle übernehmen. Ihr Bauplan ist in der DNA als Sequenz der Einzelkomponenten hinterlegt. Die durch Evolution perfektionierte Reihung der Aminosäuren bzw. Nukleotide führt zu einer definierten räumlichen Struktur, die durch das Gerüst aus Wasserstoffbrücken, elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen zusammengehalten wird. Erst durch die räumliche Anordnung erhält das Molekül seine Funktion. Strukturbiologie versucht deshalb den detaillierten Aufbau der Zellbestandteile zu entschlüsseln und jene molekularen Mechanismen zu verstehen, die die Grundlage für lebenserhaltende Vorgänge und für Krankheiten bilden.

Die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*) ist seit den 80er Jahren als eine analytische Methode in der Chemie zur Aufklärung der Konstitution und der Reinheit von Verbindungen etabliert. Darüber hinaus wurden zu der Zeit neue Verfahren zur Untersuchung von Proteinen und biochemischen Prozessen erarbeitet. Die Entwicklung mehrdimensionaler Experimente, der Bau von stärkeren Magneten und die Optimierung der Synthese NMR-aktiver Proben verhalfen der NMR-Spektroskopie zum Durchbruch in der Strukturbiologie (1991 Nobelpreise für R. R. Ernst, 2002 für K. Wüthrich). Ein Blick auf die aktuelle Statistik der Strukturdatenbank verdeutlicht diesen Aufstieg (Abbildung 1-1). Die NMR-Spektroskopie ist neben der Röntgenstrukturanalyse als zweite wichtige Methode zur Strukturaufklärung etabliert und hat sich einen festen Platz in den interdisziplinären Feldern der Biochemie und -physik erobert.

Die NMR-Spektroskopie hat gegenüber anderen Methoden einen klaren Vorteil, weil sie eine Untersuchung unter nahezu physiologischen Bedingungen erlaubt und dabei störungsfrei bzw. nicht-invasiv ist. In der wässrigen Lösung können Temperatur, pH-Wert und Salzkonzentrationen genau eingestellt werden, um ferner Extrembedingungen zu testen.

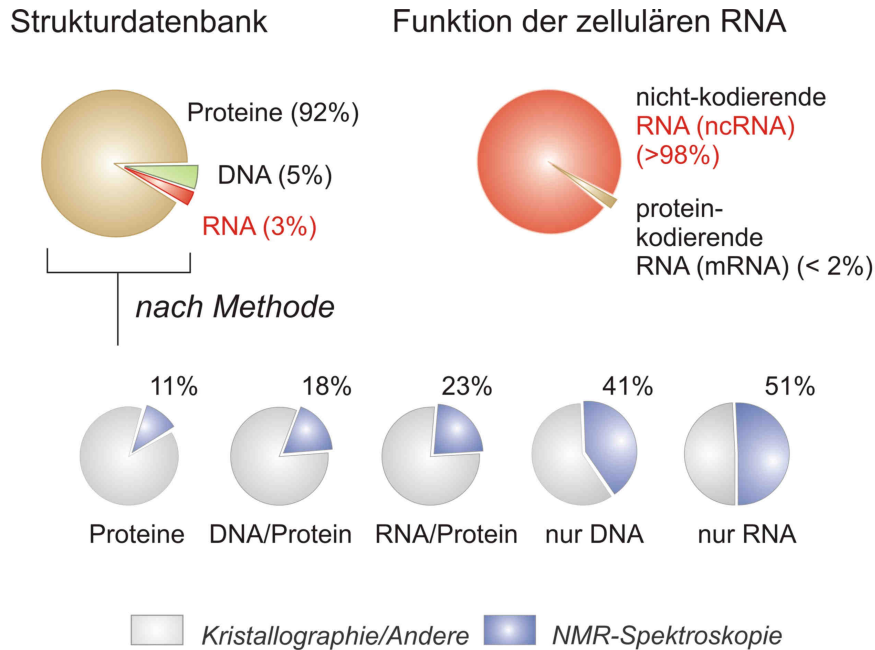


Abbildung 1-1: Statistik aus der Protein-Datenbank [1]. Funktion der transkribierten RNA in humaner Zelle aus „The amazing complexity of the human transcriptome“, 2005 [2].

Eine starke Einschränkung erfährt die Anwendung der NMR-Spektroskopie durch die Größe des zu untersuchenden Moleküls. Hierbei treten zwei grundlegende Probleme auf:

- Verlust der Empfindlichkeit bzw. Verbreiterung der Linien bedingt durch das größenabhängige Relaxationsverhalten der NMR-Signale.
- Überlagerung der Resonanzen durch die steigende Zahl NMR-aktiver Kerne in einem größeren System und aufgrund der Linienverbreiterung. Dadurch werden die eindeutige Zuordnung der Resonanzen und gleichzeitig die quantitative Interpretation der NMR-Spektren erschwert.

Zwar bietet die Aufnahme mehrdimensionaler Spektren eine Möglichkeit, das Problem der Signalüberlagerung zu überwinden, jedoch können sie wegen der unverhältnismäßig steigenden Aufnahmedauer aufgrund der reduzierten Empfindlichkeit nicht realisiert werden. Aus diesem Grund müssen andere Entwicklungen vorangetrieben werden, welche die Aufnahmedauer reduzieren und die Empfindlichkeit erhöhen. Eine neue Generation heteronuklearen Experimente profitiert von der Filterung langsam relaxierender Übergänge (TROSY<sup>1</sup>-Experiment [3]). Speziell für größere Moleküle eröffnet sich die Möglichkeit, einen alternativen Weg für den Magnetisierungstransfer zu nutzen, um damit die Empfindlichkeit weiter zu steigern (CRINEPT [4]). Während das TROSY-Experiment zu den Standardanwendungen avanciert ist, befindet sich der Einsatz von CRINEPT noch in der Entwicklung.

<sup>1</sup> TROSY (Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy)

Die höhere Rechenleistung der Computer, neue Pulssequenzen (z.B. SOFAST-HMQC [5]) und Aufnahmemethoden (z.B. HADAMARD [6]) ermöglichen eine Beschleunigung der Datenaufnahme. Weiterhin werden die zeitaufwendigen Arbeitsprozesse der Auswertung durch vollautomatisierte Prozesse ersetzt (z.B. FLYA-CYANA [7]). Die Qualität der Strukturrechnung wird entscheidend erhöht durch die Verwendung neuer NMR-Parameter wie z.B. RDCs [8], PRE und PCS<sup>1</sup> [9], die wichtige Informationen über weitreichende Abstände und Orientierungen von Domänen liefern. Vielversprechend ist außerdem der Ansatz, dass eine vollständige Proteinstrukturanalyse allein aus der Information der chemischen Verschiebung gewonnen wird [10]. Diese stellt den am einfachsten zu messenden und gleichzeitig empfindlichsten NMR-Parameter dar. Durch den Einsatz dieser Methode in Kombination mit den empfindlichen TROSY-Experimenten [3] kann die Grenze bei der Proteingröße (~ 100 kD) weiter nach oben verschoben werden.

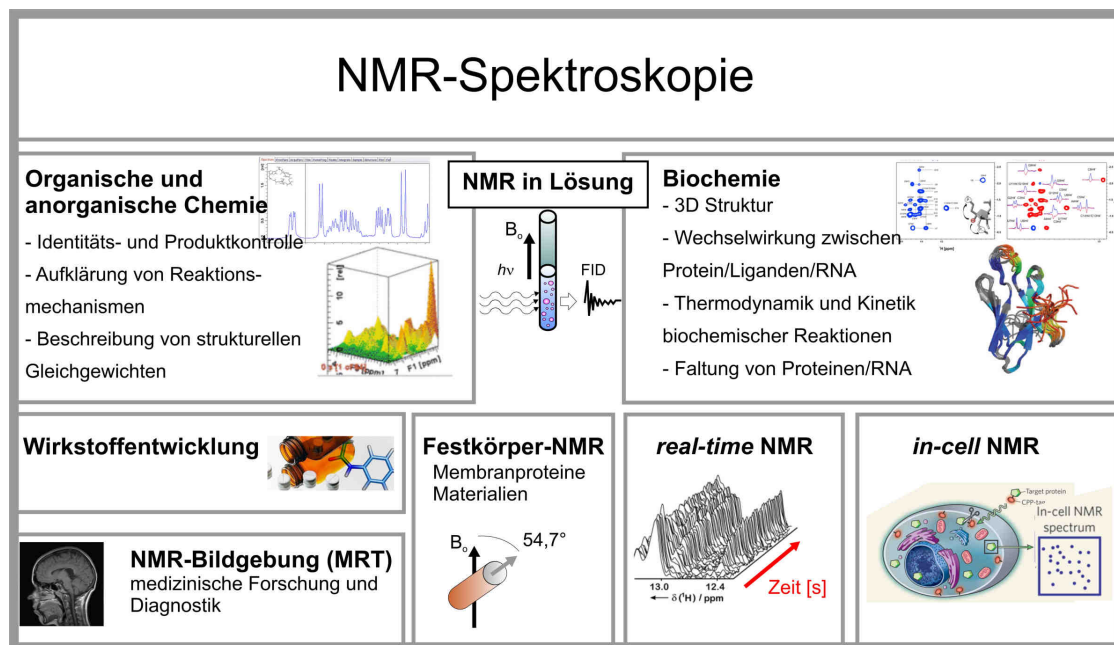


Abbildung 1-2: Anwendungsgebiete der NMR-Spektroskopie.

Die Anwendung der NMR-Spektroskopie reicht weit über die Strukturanalyse hinaus (Abbildung 1-2). Von besonderer Bedeutung ist die Möglichkeit, Informationen über die Dynamik und Flexibilität der Moleküle zu ermitteln [11]. Über Jahre wurde eine Vielzahl an Experimenten optimiert, die es ermöglicht Dynamiken und Flexibilität auf allen Zeitskalen zu analysieren. Eine interessante Anwendung stellt die Strukturbestimmung eines Faltungsintermediats, der nur zu 1% vorhanden ist, dar [12]. Insgesamt kann die Kenntnis über die Dynamik und Flexibilität dazu beitragen, dass unser Verständ-

<sup>1</sup> RDC (*residual dipolar coupling*), PRE (*paramagnetic relaxation enhancement*), PCS (*pseudo contact shifts*)

nis über die Beziehung zwischen Struktur und Funktion vertieft wird. Bei dieser fundamentalen Frage sind weiterhin die Untersuchungen der Faltung und Umfaltung von Proteinen und RNA von großer Bedeutung. Die NMR-Spektroskopie kann als einzige Methode durch zeitaufgelöste Experimente einen Einblick auf atomarer Ebene gewähren (*real-time* NMR-Spektroskopie). Eine der eindrucksvollen Arbeiten zu diesem Thema ist die direkte Beobachtung der Faltung, während das Protein am Ribosom gebunden ist und synthetisiert wird [13].

Durch *in-cell* NMR-Spektroskopie gelingt es, Moleküle in einer zellulären Umgebung auf atomarer Ebene zu untersuchen. Jüngste Arbeiten auf diesem Gebiet demonstrieren die Anwendung moderner *in-cell* NMR-Methoden, um die Struktur eines Proteins oder einer RNA innerhalb der Zelle zu bestimmen [14-15].

Festkörper-NMR-Spektroskopie schließt eine wichtige Lücke bei der Untersuchung von Materialien und Membranproteinen, die in Lösung nicht immer ihre stabile Form bzw. native Struktur annehmen [15-16]. Die Tatsache, dass 25-30 % der exprimierten Proteine in Zellmembranen eingelagert sind, verdeutlicht die Bedeutung der Festkörper-NMR-Spektroskopie [17].

### 1.1.2 NMR-Spektroskopie in der Wirkstoffentwicklung und Medizin

In den 90er Jahren stiegen vermehrt Forscher und Pharmaunternehmen auf die neue Methode des struktur-basierten Wirkstoffdesigns um [18-19]. In der NMR-Spektroskopie wurden spezielle Methoden entwickelt [20-21], wie z.B. die Methode *SAR (structure activity relationship) by NMR*, die auf der Beobachtung von Unterschieden in den Spektren des Proteins mit und ohne Ligand basiert [22]. Die Bindung des Liganden kann orts aufgelöst ermittelt werden. Die kurz später entwickelte Methode STD (Sättigungstransfer-Differenz)-NMR verlagert die Detektion der Bindung auf den Liganden und profitiert dadurch von einer deutlichen Steigerung der Empfindlichkeit [23].

Das Nutzen der NMR-Spektroskopie außerhalb der biochemischen und pharmazeutischen Forschung hat sich insbesondere in der Entwicklung der magnetischen Kernspintomographie für die Anwendung in der Medizin manifestiert (2003 Nobelpreis für P. C. Lauterbur und P. Mansfield). Bei dieser bildgebenden Methode wird das im Gewebe befindliche Wasser detektiert. Der Kontrast zwischen den Gewebearten resultiert aus dem unterschiedlichen Relaxationsverhalten des Wassersignals abhängig von der Umgebung.

### 1.1.3 NMR-Spektroskopie & RNA

Die aktuelle Statistik der Strukturdatenbank zeigt, dass die große Mehrheit der untersuchten Moleküle Proteine sind (Abbildung 1-1). Dem gegenüber steht eine zweite Zahl, die sich auf die Funktion der RNA in humaner Zelle bezieht. Sie zeigt, dass 98% des humanen Genoms in nicht-kodierende RNA



(ncRNA, *non coding RNA*) übersetzt wird [2]. Der Anteil der nicht-kodierenden DNA einer Spezies ist außerdem die einzige Eigenschaft des Erbguts, die eine eindeutige Korrelation zu der Komplexität der Lebensform aufweist. Obwohl dieser Zusammenhang bekannt war, wurde RNA lange Zeit auf die passive Funktion als mRNA, tRNA und rRNA reduziert. Erst in den 90er Jahren häufen sich Entdeckungen von RNA-Formen, die Aufgaben in der Regulation der Genexpression übernehmen. Zu den bahnbrechenden Entdeckungen gehört die RNA-Interferenz (2001 Nobelpreise für A. Fire, C. C. Mello) [24]; ein Mechanismus zur Stilllegung von Genen durch doppelsträngige RNA, der ausschließlich in eukaryotischen Zellen gefunden wird. Weiterhin zu erwähnen sind Ribozyme und das Ribosom als katalytisch aktive RNA [25-28], künstlich hergestellte RNA-Aptamere [29-30], regulative Elemente in Retroviren-RNA (z.B. TAR-RNA [31]), RNA-Thermometer [32-33] und RNA-Schalter [34], die alle eine Relation zwischen Struktur und Funktion aufweisen. RNA-Schalter binden als Bestandteil der mRNA einen Metaboliten und kontrollieren dadurch die weitere Translation oder Transkription ohne Beteiligung von Proteinen. Im Gegensatz zur RNA-Interferenz basiert dieser Mechanismus auf dem allosterischen Effekt, der eine definierte räumliche Struktur der RNA voraussetzt.

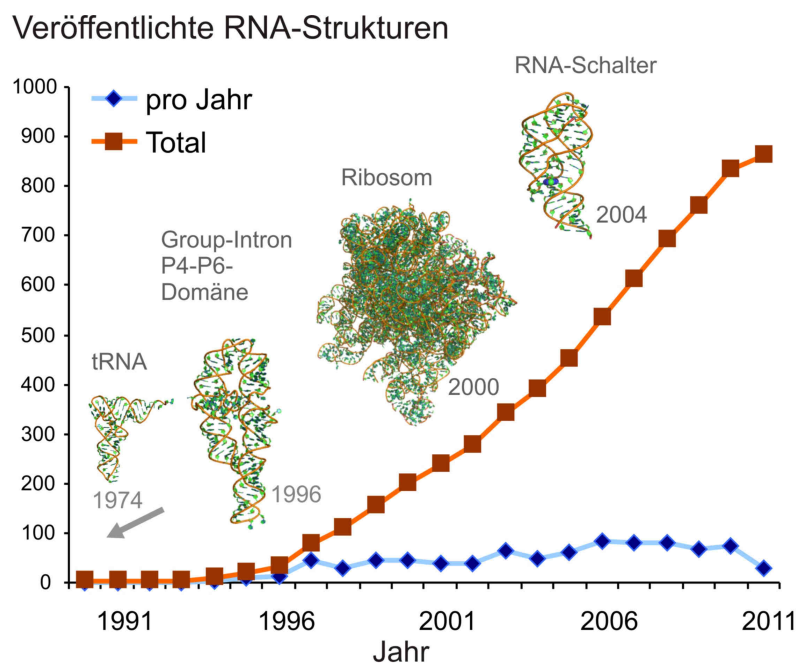


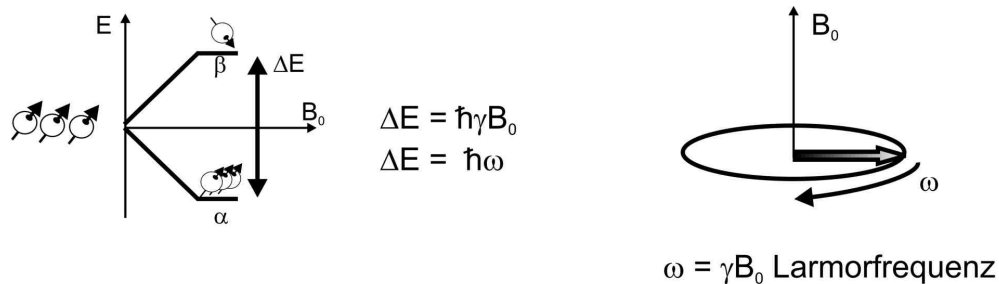
Abbildung 1-3: Anstieg der veröffentlichten RNA-Strukturen seit 1990 mit der Darstellung ausgewählter RNA-Strukturen [1].

In den Kristallstrukturen der RNA-Schalter und vieler anderer RNA-Molekülen wird deutlich, welche unerwartete strukturelle Vielfalt und Komplexität von RNA-Strukturen verwirklicht werden kann (Abbildung 1-3). Die NMR-Spektroskopie hat bei der Untersuchung von RNA-Molekülen und RNA-Protein-Wechselwirkungen eine zentrale Bedeutung, weil RNA, insbesondere kurze Sequenzen, schwer zu kristallisieren sind. Außerdem ermöglicht der modulare Aufbau von RNA-Strukturen eine

Fragment-basierte Untersuchung mit Molekülgrößen, die für die NMR-Spektroskopie gut zugänglich sind. Die Zahl der gelösten RNA-Strukturen ist insgesamt seit 1990 stark gestiegen (Abbildung 1-3), wobei mehr als die Hälfte der Strukturen, die nur RNA enthalten, mittels NMR-Spektroskopie ermittelt wurden (Abbildung 1-1).

### 1.1.4 Grundlagen der NMR-Spektroskopie<sup>1</sup>

NMR-Spektroskopie nutzt die Eigenschaft, dass bestimmte Atomkerne ein magnetisches Moment (Kernspin) haben und im Magnetfeld angeregt werden können. Für die NMR-Spektroskopie haben Kerne mit dem Spin 1/2 die größte Bedeutung, weil sie günstige Relaxationseigenschaften besitzen.



Besetzungsunterschied für $^1\text{H}$ mit $\omega = 600$ MHz:	Nachteil:	Vorteil:
$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\frac{\hbar\omega}{kT}} = \frac{99,9999985}{100}$ $N_\beta = 49,9999996 \%$ $N_\alpha = 50,0000004 \%$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- unempfindlich</li> <li>- großer technischer Aufwand</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>atomare Auflösung</b></li> <li>- lange Lebensdauer des angeregten Zustands</li> <li>- scharfe Resonanzlinie (<math>\sim 1</math> Hz)</li> <li>- hohe Meßgenauigkeit von schwachen Interaktionen</li> <li>- empfindlich für Dynamik auf verschiedenen Zeitskalen (ps - s)</li> </ul>

Abbildung 1-4: Energieniveaus und Besetzungsunterschied für Protonen im 600 MHz Magnetfeld bei 298K. Vor- und Nachteile der NMR-Spektroskopie.

Die Energiedifferenz zwischen den beiden Energiezuständen eines Kernspins hängt von dem gyromagnetischen Verhältnis ( $\gamma$ ) des Kerns und der Magnetfeldstärke ( $B_0$ ) ab. Für Protonen liegt die Ener-

<sup>1</sup> Grundlagen der NMR-Spektroskopie in Anlehnung an folgende Bücher:  
*Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy*, G. S. Rule, T. K. Hitchens, 2006 Springer  
*Spin Dynamics*, M. H. Levitt, 2008 Wiley  
*Understanding NMR Spectroscopy*, James Keeler, 2010 Wiley

giedifferenz (bei 298 K und 600 MHz) bei  $4 \cdot 10^{-10}$  eV und damit weit unter der thermischen Energie ( $2.7 \cdot 10^{-2}$  eV). Nach der Boltzmann-Verteilung fällt der Besetzungsunterschied zwischen den beiden Zuständen deshalb sehr gering aus (Abbildung 1-4). Daraus folgt der große Nachteil, dass die NMR-Spektroskopie eine sehr unempfindliche Methode ist und mit hohem technischen Aufwand betrieben werden muss. Doch diesen Nachteilen stehen mehrere Vorteile gegenüber, die dieser Methode zum großen Anwendungspotential in der Chemie und Strukturbiologie verhelfen. Der geringe Energieunterschied liefert eine lange Lebensdauer des angeregten Zustandes (ms-s) und somit scharfe Resonanzlinien (Linienbreite bis zu 1 Hz), die eine Unterscheidung der Signale auf atomarer Ebene erlauben. Weiterhin können schwache Wechselwirkungen (1-35 Hz) zwischen dem Kernspin und der nahen Umgebung (0,1-5 Å) sehr genau detektiert werden. Allen voran können auf diese Weise einzelne Kerne durch eine spezifische chemische Verschiebung unterschieden werden. Die lange Lebensdauer des angeregten Zustands ist außerdem dafür verantwortlich, dass das NMR-Signal für Dynamiken über verschiedene Zeitskalen hinweg empfindlich ist.

### 1.1.5 NMR-Strukturparameter

Die Kristallographie oder Mikroskopie sind Methoden, welche die Materie durchleuchten und ein statisches Bild aufnehmen. Die NMR-Spektroskopie dagegen muss aus der Fülle der Wechselwirkungen zwischen den Kernen und der Umgebung eine bestimmte Information herausfiltern. Für diesen Zweck werden Pulssequenzen entwickelt, die durch ein bestimmtes Anregungsprofil die Magnetisierung manipulieren und eine gewählte Wechselwirkung isolieren. Auf diese Weise kann im Idealfall die gewünschte Information auf eine der folgenden NMR-Meßgrößen projiziert werden:

- 1) chemische Verschiebung
- 2) Signalintensität
- 3) Linienaufspaltung
- 4) Linienbreite

Es können drei Typen von NMR-Experimenten unterschieden werden:

- 1) Resonanzzuordnung
- 2) Messung der Strukturparameter
- 3) Messung der Dynamikparameter

Ein wesentlicher Teil der Arbeit stellt die Resonanzzuordnung des zu untersuchenden Moleküls dar. Dafür wurden mehrdimensionale Experimente entwickelt, welche die Konnektivität zwischen den Kernen durch den Raum (NOE), kovalente Bindungen (J) oder Wasserstoffbrücken herstellen [35-36]. Nach einer möglichst vollständigen Resonanzzuordnung der aktiven Kerne ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) können Strukturparameter ermittelt und für eine Strukturrechnung verwendet werden (Abbildung 1-5).

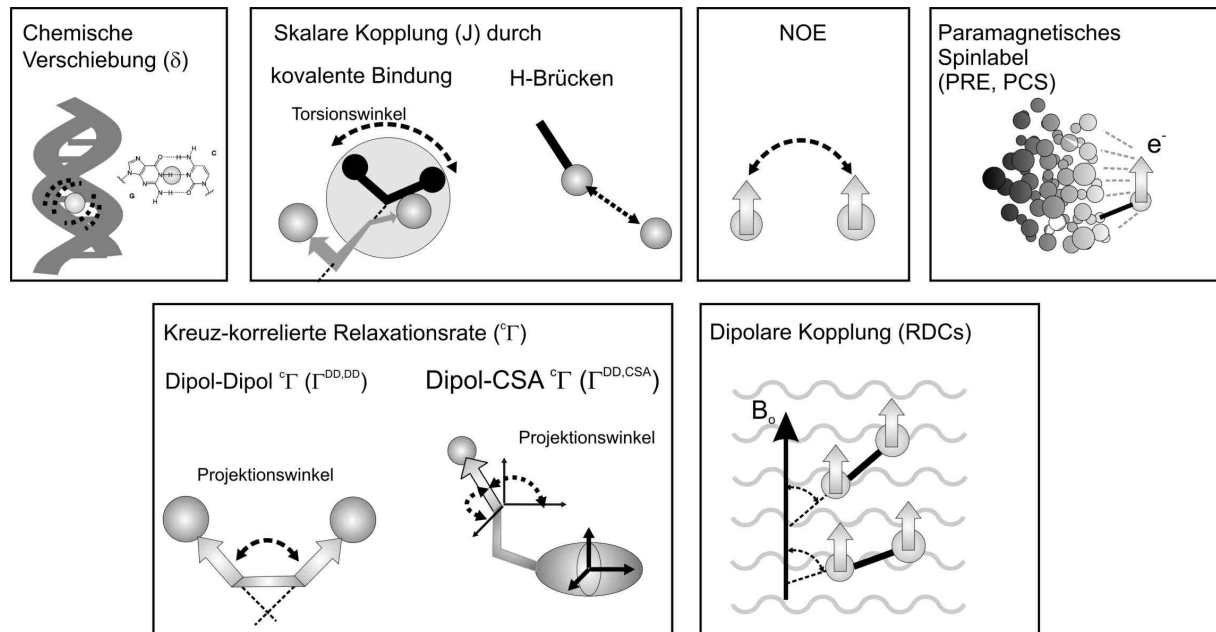


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der NMR-Strukturparameter.

### 1.1.5.1 Chemische Verschiebung

Die chemische Verschiebung hängt von der Elektronendichte am Kern ab und wird von der lokalen Umgebung beeinflusst. Die Abschirmung durch Elektronen wird sowohl von Substituenten an benachbarten Atomen als auch von den lokalen Konformationen bestimmt.

Wichtige Informationen über die Sekundärstrukturelemente der RNA wird durch die Resonanzen der Iminoprotonen erhalten. Iminosignale kommen im Bereich von 10-15 ppm zur Resonanz und sind nur sichtbar, wenn sie in stabile Wasserstoffbrücken involviert sind. Die Anwesenheit und Anzahl der Iminosignale reflektiert die Anzahl der Basenpaare und kann deshalb zur Analyse und Überprüfung einer Sekundärstruktur herangezogen werden. Die Aufnahme von  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren erlaubt anhand der  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebung zusätzlich die Unterscheidung zwischen GC, AU und nicht-kanonischen Basenpaaren (z.B. GU, UU) (Abbildung 1-6).

Die chemische Verschiebung der Riboseatome ist von der Position im Ring abhängig und wird zusätzlich von der Zuckerkonformation beeinflusst. Anhand der  $^{13}\text{C}$ -chemischen Verschiebung kann die Zuckerkonformation und der exzyklische Winkel  $\gamma$  abgeschätzt werden [37]. Des Weiteren kann über die Analyse der  $^{31}\text{P}$ -chemischen Verschiebung eine *trans* Konformation der Torsionswinkel  $\alpha$  und  $\zeta$  ausgeschlossen werden [38].

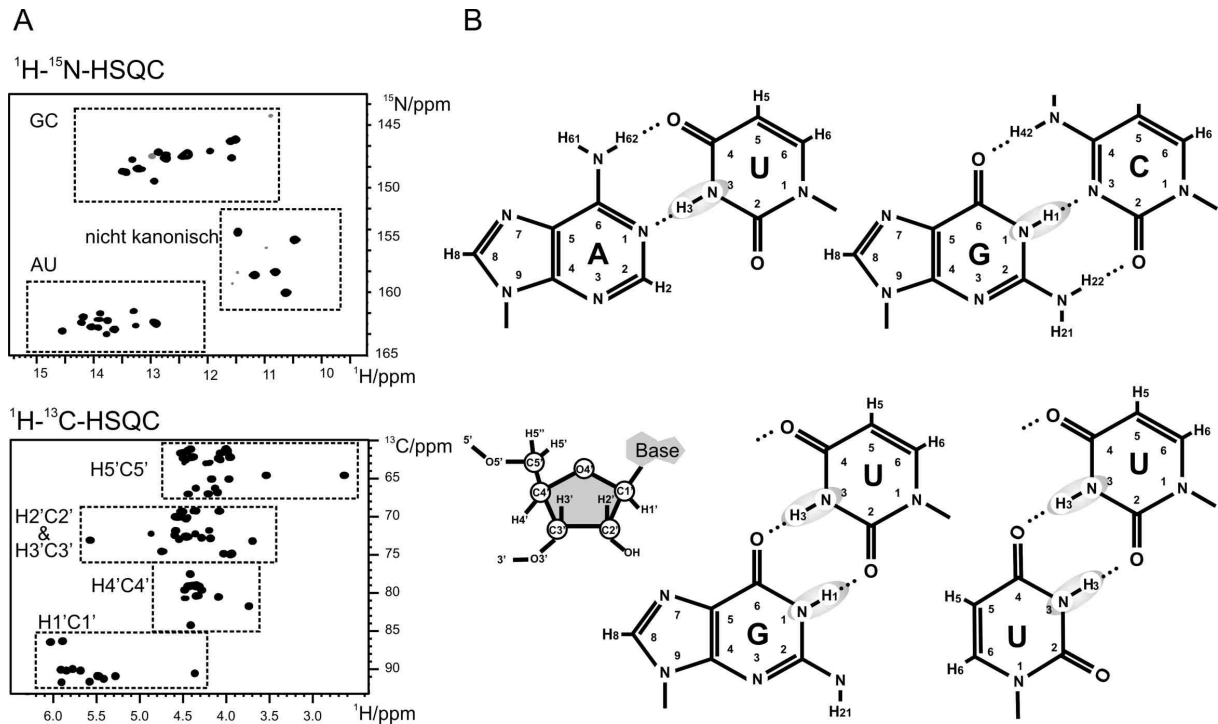


Abbildung 1-6: Charakteristische chemische Verschiebungen in RNA. A. Oben:  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC einer 66mer RNA. Iminosignale der kanonischen (AU, GC) und nicht-kanonischen (z.B. GU, UU) Basenpaare sind mit einer gestrichelten Linie hervorgehoben. Unten:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC einer 14mer RNA. Signale der einzelnen Ringpositionen sind mit einer gestrichelten Linie hervorgehoben. B. Struktur der Basenpaare GC, AU, GU und UU. Struktur der Riboseeinheit.

### 1.1.5.2 NOE

Der NOE (*Nuclear Overhauser Effect*) [39] entwickelt sich zwischen zwei räumlich benachbarten ( $< 5 \text{ \AA}$ ) Spins und wird über die dipolare Kopplung vermittelt. Die Voraussetzung für den NOE-Effekt sind Relaxationsübergänge ( $\beta \rightarrow \alpha$ ), die für ein gekoppeltes IS-System neben Einquantenübergängen ( $W_1$ ) auch über Doppel- oder Nullquantenübergänge stattfinden können ( $W_2/W_0$ ). Nur durch letztere wird der Besetzungsunterschied ( $\alpha/\beta$ -Verhältnis) von dem gekoppelten Kern (S) verändert (Abbildung 1-7). Die Relaxation verläuft bei großen Molekülen über die Nullquantenübergänge ( $W_0$ ) und resultiert in einer Reduktion des Besetzungsunterschieds vom Kern S (negativer NOE). Für kleine Moleküle ist die Relaxation über Doppelquantenübergänge ( $W_2$ ) effizienter und führt zu einem positiven NOE am Kern S. Mittelgroße Moleküle besitzen eine Frequenz der Bewegung, die für keinen der Übergänge effizient ist. Um dennoch einen NOE zu messen, wird ein zusätzliches Magnetfeld  $B_1$  (*Spinlock*) angelegt. Der so erhaltene ROE (*Rotating frame Overhauser Effect*) ist immer positiv und schwächer als der NOE.

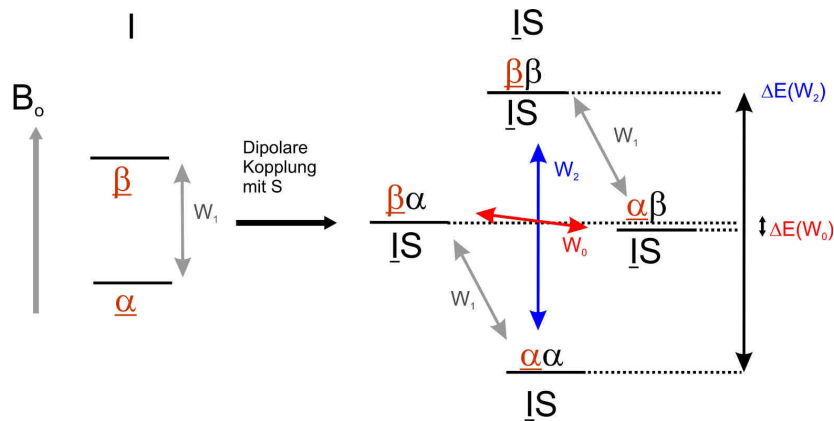


Abbildung 1-7: Energieniveauschema für dipolar gekoppeltes IS-System.  $W_1$  - Einquantenübergang,  $W_0$  - Nullquantenübergang,  $W_2$  - Doppelquantenübergang.

In der NMR-Spektroskopie und insbesondere der Strukturrechnung ist der NOE einer der wichtigsten Strukturparameter [40]. Das NOE-Signal ist mit  $r^{-6}$  von der Entfernung zwischen den Kernen abhängig und kann in eine definierte Abstandsbeschränkung übersetzt werden. Die erste NMR-Proteinstruktur basiert auf der Verwendung des NOEs und wurde von Prof. Dr. K. Wüthrich in den 80er Jahren veröffentlicht (2002 Nobelpreis) [41]. Die 2D-NOESY- oder 3D-HSQC-NOESY-Experimente werden weiterhin für die Resonanzzuordnung genutzt. In RNA und DNA sind NOE-Signale zwischen den Iminprotonen der benachbarten Basenpaare sichtbar und liefern daher den Startpunkt für die sequenzielle Zuordnung (Abbildung 1-8).

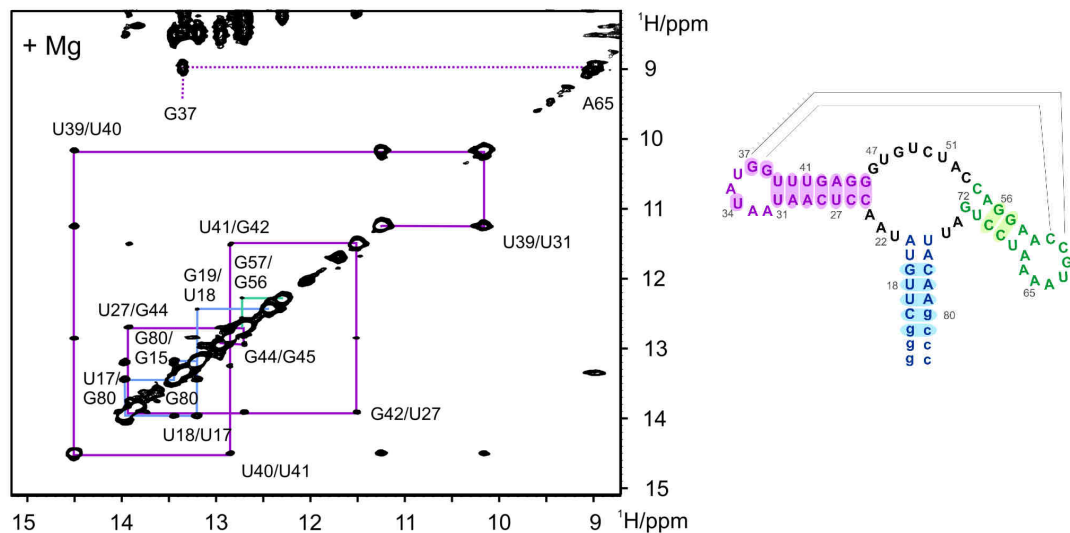


Abbildung 1-8: Zuordnung der Iminosignale im  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum. Links:  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum eines Adenin-bindenden RNA-Schalters (71mer, 0,5 mM) mit  $\text{Mg}^{2+}$  (5 mM), 800 MHz, 283 K, Mischzeit 100 ms. Sequentielle Kreuzsignale zwischen Iminprotonen der benachbarten Basen sind mit farblichen Linien verbunden. Rechts: Sequenz und Sekundärstruktur eines RNA-Schalters (71 nt). Basenpaare mit zugeordneten Iminosignalen sind mit einem farblichen Hintergrund hervorgehoben.

## 1.1.5.3 Skalare Kopplung

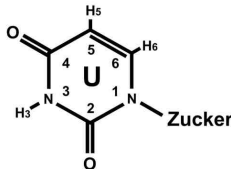
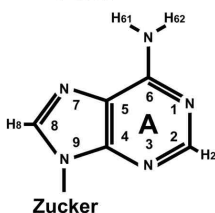
Die skalare Kopplung beschreibt die Wechselwirkung zwischen zwei Spins, die durch die Elektronen einer kovalenten Bindung (J) oder einer Wasserstoffbrücke vermittelt wird ( $^hJ$ ). Sie ist für das Aufspalten der Linien im Spektrum verantwortlich und kann für die Ermittlung der Konnektivität von Kernen und die weitere Resonanzzuordnung eingesetzt werden. Skalare Kopplung durch eine oder mehrere Bindungen wird für den gezielten Transfer der Magnetisierung von einem Kern zum anderen verwendet. In der Strukturrechnung ist insbesondere die  $^3J$ -Kopplung von großer Bedeutung. Die Kopplung entlang dreier kovalenter Bindungen ist von dem eingebundenen Torsionswinkel abhängig (Karplus-Gleichung [42]), aber auch  $^2J$ - und  $^1J$ -Kopplungen weisen eine Abhängigkeit von der Konformation auf [43-46].

Die Parametrisierung beruht auf empirischen Untersuchungen und muss deshalb für jeden Torsionswinkeltyp spezifisch ermittelt werden (Tabelle 1-1). Ihre Genauigkeit kann aufgrund weniger Referenzdaten ungenau sein oder für nicht-kanonische Konformationen abweichen.

Tabelle 1-1: Parametrisierung von  $^3J$ -Kopplungen in RNA/DNA.

Kopplung/ Torsionswinkel	Karplus- Parametrisierung	Referenz	Rückgrat und Ribose
$^3J(H,H) = 13,24\cos^2\theta - 0,91\cos^2\theta + \sum\Delta\chi_i\{0,53 - 2,41\cos^2(\zeta_i\theta + 15,51 \Delta\chi_i \)}$ $^3J(H,P) = A\cos^2\theta + B\cos\theta + C$ $^3J(C,P) = A\cos^2\theta + B\cos\theta + C$			
$\theta$ = Torsionswinkel, $\Delta\chi_i$ ist die Differenz der Elektronegativitäten zwischen dem Substituenten i und dem Proton ( $\Delta\chi_i$ : Sauerstoff = 1,3; Kohlenstoff = 0,4; Stickstoff=0,9), $\zeta_i$ ist der relative Orientierungsfaktor ( $\pm 1$ )			
$^3J(H1',H2')/\phi_{12}$	$\Delta\chi_1 = 0,6980, \zeta_1 = 1$ $\Delta\chi_2 = 0,0770, \zeta_1 = -1$ $\Delta\chi_3 = 1,2240, \zeta_1 = 1$ $\Delta\chi_4 = 1,3000, \zeta_1 = -1$	[47]	
$^3J(H2',H3')/\phi_{23}$	$\Delta\chi_1 = -0,0085, \zeta_1 = 1$ $\Delta\chi_2 = 0,0770, \zeta_1 = -1$ $\Delta\chi_3 = 1,3000, \zeta_1 = 1$ $\Delta\chi_4 = 1,3095, \zeta_1 = -1$	[47]	
$^3J(H3',H4')/\phi_{134}$	$\Delta\chi_1 = 0,0770, \zeta_1 = 1$ $\Delta\chi_2 = 0,1530, \zeta_1 = -1$ $\Delta\chi_3 = 1,3095, \zeta_1 = 1$ $\Delta\chi_4 = 1,2240, \zeta_1 = -1$	[47]	
$^3J(H5',P_i), ^3J(H5'',P_i)/\beta$	A = 15,3; B=-6,1; C=1,6	[48]	
$^3J(C4',P_i)/\beta$	A = 6,9; B=-3,4; C=0,7	[48]	
$^3J(C3',P_{i+1})/\epsilon$	A = 8,0; B=-3,4; C=0,5	[49]	
	A = 9,1; B=-1,9; C=0,8	[50]	

Tabelle 1-2:  $^3\text{J}$ -Kopplungen für die Bestimmung der Torsionswinkel in RNA/DNA.

Torsionswinkel		$^3\text{J}$ -Kopplungen	Referenz	Struktur der Nucleobasen
Rückgrat	$\beta$ (P5'-O5'-C5'-C4')	$^3\text{J}(\text{H5}'_i, \text{P}_i), ^3\text{J}(\text{H5}''_i, \text{P}_i),$ $^3\text{J}(\text{C4}'_i, \text{P}_i)$	[51-58]	<p>Pyrimidin</p>  <p>Purin</p> 
	$\gamma$ (O5'-C5'-C4'-C3')	$^3\text{J}(\text{H4}', \text{H5}'), ^3\text{J}(\text{H4}', \text{H5}''),$ $^2\text{J}(\text{C4}', \text{H5}'), ^2\text{J}(\text{C4}', \text{H5}'')$	[43, 59-60]	
	$\epsilon$ (C4'-C3'-O3'-P3')	$^3\text{J}(\text{H3}'_i, \text{P}_{i+1}), ^3\text{J}(\text{C4}'_i, \text{P}_{i+1}),$ $^3\text{J}(\text{C2}'_i, \text{P}_{i+1})$	[51-58]	
Glykosidische Bindung	$\chi$ Pyrimidin: (C2'-C1'-N1-C2) Purin: (C2'-C1'-N9-C4)	$^3\text{J}(\text{C2}/4, \text{H1}'), ^3\text{J}(\text{C6}/8, \text{H1}')$	[43, 53, 61-62]	
	Zucker-konformation	$\text{P}, \nu_{\text{max}}, \nu_0-\nu_4, \phi_{12}, \phi_{23}, \phi_{34}$	$^3\text{J}(\text{H1}', \text{H2}'), ^3\text{J}(\text{H2}', \text{H3}'),$ $^3\text{J}(\text{H3}', \text{H4}')$	[59]

Für die Messung der Kopplungen in RNA/DNA wurden spezielle Experimente entwickelt (Tabelle 1-2). Ist die Parametrisierung bekannt, so kann sowohl aus homonuklearen als auch heteronuklearen  $^3\text{J}$ -Kopplungen der Torsionswinkel ermittelt werden (Tabelle 1-2). Oft werden für einen Torsionswinkel mehrere Kopplungen benötigt, um die Schwierigkeit der mehrfachen Entartung zu überwinden.

In der RNA können alle Winkel der Zuckereinheit und der glykosidischen Bindung über  $^3\text{J}$ -Kopplungen ermittelt werden. Im Rückgrat sind die Winkel  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\epsilon$  über die Analyse der skalaren Kopplungen zugänglich. Wegen des nicht NMR-aktiven Sauerstoffkerns können die Torsionswinkel  $\alpha$  und  $\zeta$  nicht über  $^3\text{J}$ -Kopplungen analysiert werden. Für diese beiden Winkel wird im Kapitel 2 eine neue Methode zur quantitativen Winkelbestimmung eingeführt.

Skalare  $^1\text{J}$ -Kopplung ist im Vergleich zu der  $^3\text{J}$ -Kopplung um eine Größenordnung größer (z.B.  $^1\text{J}(\text{C}, \text{H})=130-190 \text{ Hz}$ ) und einer der am einfachsten zu messenden NMR-Parameter. Da die Größe von vielen Faktoren der lokalen Struktur beeinflusst wird, wurde die  $^1\text{J}$ -Kopplung bisher nicht als Strukturparameter verwendet. In dieser Arbeit (Kapitel 4) ist es zusammen mit DFT-Rechnungen erstmals gelungen, die Konformationsabhängigkeit der  $^1\text{J}(\text{C}, \text{H})$ -Kopplung im Zucker ( $\text{H1}'\text{C1}'$ ,  $\text{H2}'\text{C2}'$ ) zu quantifizieren und für die Strukturanalyse zu nutzen. Beide Kopplungen werden von der Zuckerkonformation, der Orientierung der Nucleobase und der 2'OH-Gruppe auf eine bestimmte Weise beeinflusst. Im HNN-COSY-Experiment wird die Kopplung durch die Wasserstoffbrücke ( $^{\text{h}2}\text{J}$ -Kopplung) verwendet, um Basenpaare zu identifizieren. Im Kapitel 3 wird die Temperaturabhängigkeit der  $^{\text{h}2}\text{J}$ -Kopplung untersucht.



## 1.1.5.4 Kreuz-korrelierte Relaxationsraten

**Einfluss der CSA- und Dipol-Wechselwirkung auf die transversale Relaxation**

Der Energieunterschied zwischen dem  $\alpha$ - und  $\beta$ -Spinzustand des Kerns S hängt von der Abschirmung durch die Elektronenhülle (und induzierte Elektronenströme) am Ort des Atomkerns ab. Bei einer kugelsymmetrischen (isotropen) Verteilung der Elektronendichte ( $\delta_{zz} = \delta_{xx} = \delta_{yy}$ ) erfährt der Kernspin in allen Orientierungen die gleiche Abschirmung. Dies ändert sich, wenn eine asymmetrische (anisotrope) Verteilung der Elektronendichte vorliegt (z.B. axial-symmetrisch:  $\delta_{zz} \neq \delta_{xx} = \delta_{yy}$ ) (Abbildung 1-9). Daraus resultiert eine Fluktuation ( $\pm$ ) des lokalen Magnetfeldes und damit eine Unschärfe der Larmorfrequenz als Folge der unterschiedlichen Orientierungen relativ zum äußeren Magnetfeld  $B_0$  (Winkel  $\theta$  in der Abbildung 1-9). Diese Abhängigkeit wird als die Anisotropie der chemischen Verschiebung (*Chemical Shift Anisotropy* – CSA) bezeichnet. Der Tensor der CSA lässt sich als Linearkombination zwei orthogonaler Kugelflächenfunktionen darstellen ( $H^{CSA}$ ) und ist in der Abbildung als Bündel dieser zwei graphisch dargestellt.

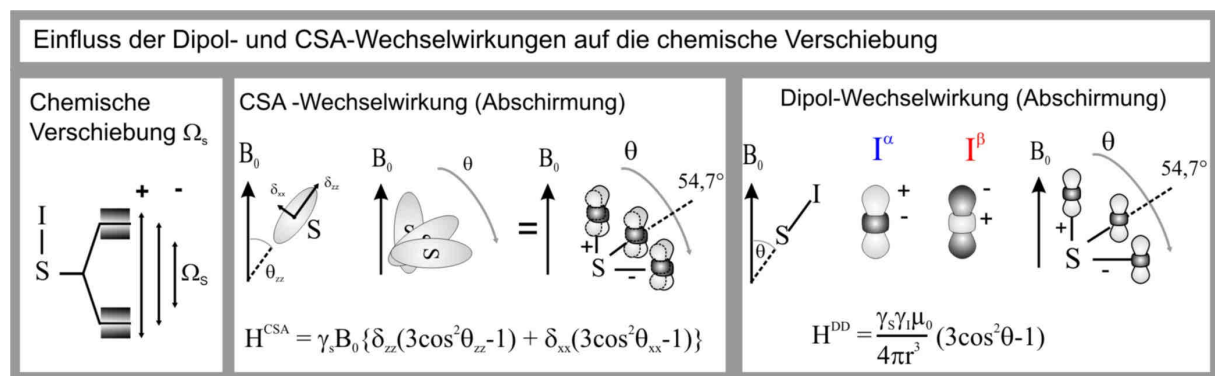


Abbildung 1-9: Einfluss der CSA- und Dipol-Wechselwirkung auf die chemische Verschiebung der Singelquantenkohärenz  $S_x$  in Abhängigkeit von der relativen Orientierung zum Magnetfeld  $B_0$ . Der Nulldurchgang bzw. ein Vorzeichenwechsel der Wechselwirkung findet bei einer Orientierung mit dem Winkel  $54,7^\circ$  statt.

Eine weitere Form der Abschirmung kann durch einen benachbarten oder gebundenen Kern (I) durch eine dipolare Wechselwirkung (IS-Dipol) verursacht werden. Die Abschirmung durch den Kernspin I ist von der Orientierung der IS-Verbindungsachse zu dem Magnetfeld  $B_0$  und dem Spinzustand des Kerns I abhängig (Abbildung 1-9). Die Wirkung der beiden Spinzustände ist entgegengesetzt, so dass der IS-Dipol-Tensor mit einem unterschiedlichen Vorzeichen formuliert werden kann.

Um den Effekt der CSA- und der Dipol-Wechselwirkung in der Flüssig-NMR-Spektroskopie zu verstehen, muss die Entstehung des NMR-Signals für den Einquantenübergang  $S_x$  ( $S^+$ - und  $S^-$ -Übergang) in einem verlangsamteten Zeitmodus („Zeitlupe“) analysiert werden, damit verschiedene Orientierungen

## 1 Allgemeine Einleitung

des Moleküls relativ zum Magnetfeld getrennt betrachtet werden können. In der Abbildung 1-10 sind die Effekte der CSA- und Dipol-Wechselwirkung an drei aneinander folgenden Zeitpunkten ( $t_1, t_2, t_3$ ) dargestellt. Sie repräsentieren die Orientierungen mit den Winkel  $0^\circ, 54,7^\circ$  und  $90^\circ$ . Bei der Analyse der dipolaren Wechselwirkung ist es sinnvoll, den Einfluss in Abhängigkeit von dem Spinzustand von dem Kern I getrennt zu betrachten.

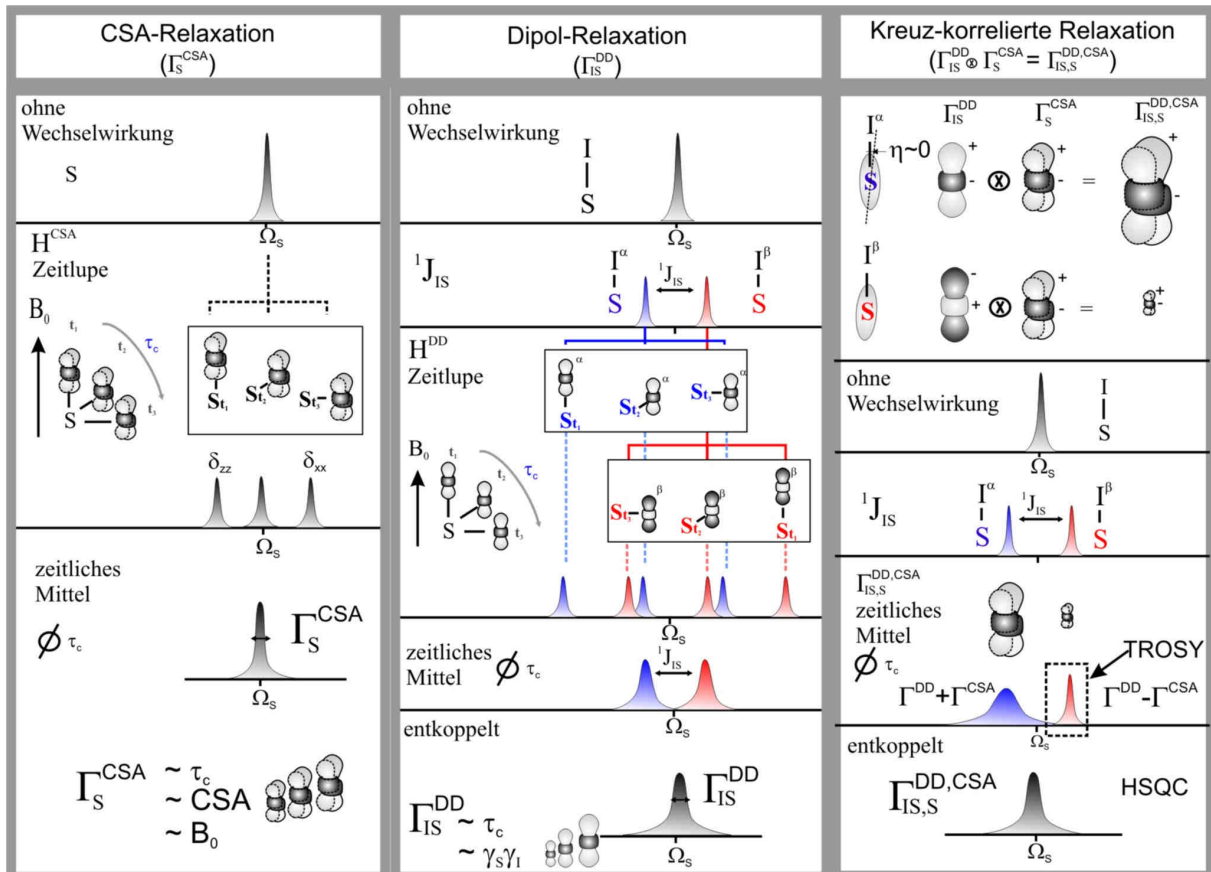


Abbildung 1-10: Einfluss der CSA- und Dipol-Wechselwirkung auf die Linienbreite durch zeitliche Mittelung (links und Mitte) und gegenseitige Wechselwirkung (rechts).

Tatsächlich wird im NMR-Spektrum immer ein zeitliches Mittel über die Dauer des Experimentes bezogen auf die Molekülbewegung aufgenommen. Die Mittelung führt zu einer Linienverbreiterung ( $\Gamma$ ) und beschreibt die Unschärfe der Larmorfrequenz (Abbildung 1-10). Das Ausmaß der Linienverbreiterung korreliert mit der Geschwindigkeit der Molekülbewegung, der sogenannten Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  (vgl. Austauschrate beim konformationellen Austausch), und wird durch die Tensorgröße der CSA- und Dipol-Wechselwirkung skaliert.

Praktisch bedeutet es, dass die transversale Magnetisierung einer Kernsorte aufgrund der Unschärfe der Larmorfrequenz mit der Zeit immer stärker dephasiert (Verlust der Kohärenz). Dies wird am exponentiellen Fall des detektierten Signals sichtbar. Der Verlust der Kohärenz durch die Unschärfe der

Larmorfrequenz wird als der säkulare Anteil der transversalen Relaxation bezeichnet. Der nicht-säkulare Anteil der transversalen Relaxation basiert auf Spin-Übergängen, die durch die Fluktuationen des lokalen Feldes verursacht werden. Jedoch spielt dieser Teil für Systeme mit  $\omega_0\tau_c \gg 1$  keine wesentliche Rolle. Die gesamte transversale Relaxation wird mit der  $T_2$ -Relaxationsrate quantifiziert. Die CSA- und Dipol-Wechselwirkungen können sich beim gleichzeitigen Auftreten gegenseitig verstärken oder abschwächen (kreuz-korrelierte Relaxation). Die resultierende kreuz-korrelierte Relaxationsrate hängt von dem Vorzeichen, der Größe und der relativen Orientierung der beiden Tensoren ab (IS-Dipol und CSA, Projektionswinkel  $\eta$  in Abbildung 1-10). Im Folgenden wird angenommen, dass die CSA axialsymmetrisch vorliegt ( $\delta_{zz} \neq \delta_{xx} = \delta_{yy}$ ) und zur IS-Bindung parallel ausgerichtet ( $\eta=0$ ) ist. Für das Duplett von dem Kern S, das zu einem Kern I skalar und dipolar koppelt ( $S_x I^\alpha$ ,  $S_x I^\beta$ ), können deshalb unterschiedliche kreuz-korrelierte Relaxationsraten entstehen, weil sich im  $S_x I^\beta$ -Übergang die CSA- und Dipol-Wechselwirkung gegenseitig aufheben, dagegen im  $S_x I^\alpha$ -Übergang verstärken (Abbildung 1-10).

Die gegenseitige Aufhebung der CSA- und Dipol-Wechselwirkung wird im TROSY-Experiment [3] ausgenutzt, um die Auflösung und Empfindlichkeit der heteronuklearen Spektren zu erhöhen, indem nur die langsamere relaxierende Komponente des Einquantenübergangs ( $S_x I^\beta$ ) selektiert wird.

### Kreuz-korrelierte Relaxationsrate als Strukturparameter

Die Messung von skalaren  $^3J$ -Kopplungen hat sich als sehr nützlich bei der Bestimmung der lokalen Torsionswinkeln sowohl in Biomolekülen (Proteine, RNA) als auch in organischen Verbindungen erwiesen. Die Genauigkeit ist jedoch abhängig von der empirischen Parametrisierung der Karplus-Gleichung und kann für ungewöhnliche Konformationen abweichen. Außerdem ist die Analyse von Torsionswinkeln, die nicht NMR-aktive Kerne enthalten (z.B. Sauerstoff), nicht über  $^3J$ -Kopplung zugänglich. Eine Alternative stellt die Messung der kreuz-korrelierten Relaxationsraten dar, die keine empirische Parametrisierung benötigen [63-66]. Allerdings setzt es die genaue Kenntnis des CSA-Tensors voraus, die durch Festkörper-NMR-Spektroskopie erhalten werden kann. Prinzipiell können kreuz-korrelierte Relaxationsraten zwischen zwei Dipolen, zwischen Dipol und CSA oder zwei CSAs unterschieden werden, wobei Variationen in den Kombinationen in Abhängigkeit von der selektierten Kohärenz entstehen. Generell ist die resultierende kreuz-korrelierte Relaxationsrate abhängig von den relativen Orientierungen der CSA- und Dipol-Tensoren, die letztlich von der Geometrie des Moleküls bestimmt werden. Diese Eigenschaft macht die kreuz-korrelierten Relaxationsraten zu einem wertvollen Strukturparameter, der im Folgenden anhand der  $\Gamma_{IS,P}^{DD,CSA}$  verdeutlicht wird.

In der Konstitution, wie in der Abbildung 1-11 dargestellt, kann der Operator  $S_x P_x$  über die skalare Kopplung zwischen den Kernen S und P hergestellt werden. Dieser Operator beschreibt die Null- und Doppelquantenkohärenzen, die unter dem Einfluss beider chemischen Verschiebungen evolvieren.

Doppelquantenkohärenz evolviert mit der Summe ( $\Omega_S + \Omega_P$ ), Nullquantenkohärenz mit der Differenz ( $\Omega_S - \Omega_P$ ) beider chemischen Verschiebungen.

Auf die einzelnen chemischen Verschiebungen wirken jeweils eine Dipol-Wechselwirkung ( $\Gamma_{IS}^{DD}$  auf  $\Omega_S$ ,  $\Gamma_{IP}^{DD}$  auf  $\Omega_P$ ;  $\Gamma_{SP}^{DD} = 0$  für  $S_xP_x$ ) und eine CSA-Wechselwirkung ( $\Gamma_S^{CSA}$  auf  $\Omega_S$ ,  $\Gamma_P^{CSA}$  auf  $\Omega_P$ ). Diese Terme können als vier linear kombinierte kreuz-korrelierte Relaxationsraten betrachtet werden (Abbildung 1-11).  $\Gamma_{IP}^{DD}$  fällt aufgrund des großen und nicht konstanten Abstandes zwischen den Kernen I und P klein aus. Es lässt sich schlussfolgern, dass nur die kreuz-korrelierte Relaxationsrate  $\Gamma_{IS,P}^{DD,CSA}$  für die Strukturbestimmung vom Interesse sein kann. Aus diesem Grund werden die übrigen durch  $180^\circ$ -Pulse refokussiert und nicht detektiert.

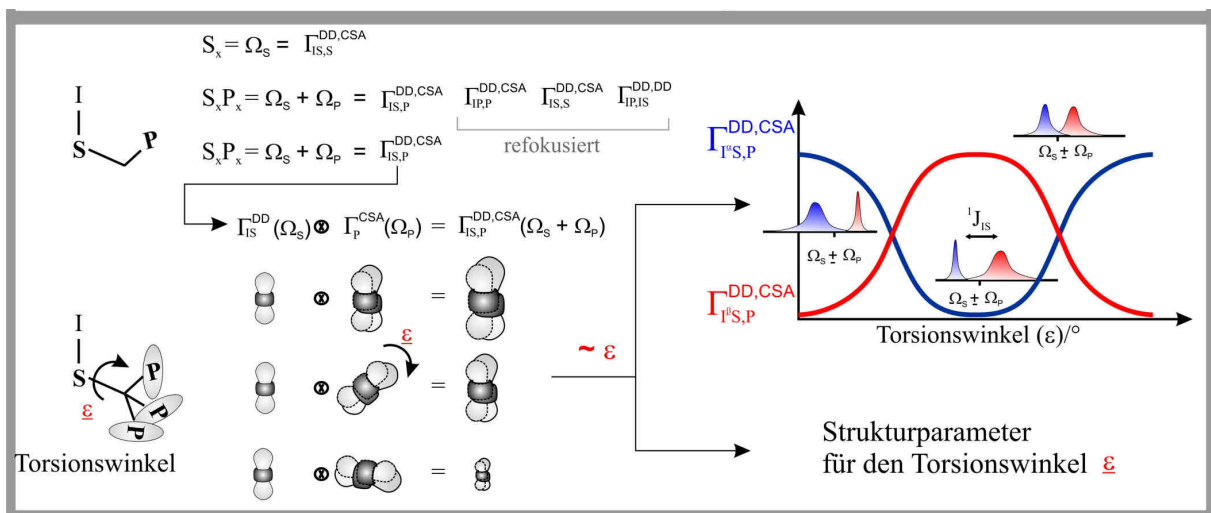


Abbildung 1-11: Verwendung der kreuz-korrelierten Relaxationsraten als Strukturparameter für den Torsionswinkel. Im Diagramm ist der Verlauf der  $\Gamma_{IS,P}^{DD,CSA}$  in Abhängigkeit von dem Torsionswinkel dargestellt. Es wird zwischen den Spinzuständen des Kerns I farblich unterschieden.

Die resultierende Größe der kreuz-korrelierten Relaxationsrate  $\Gamma_{IS,P}^{DD,CSA}$  hängt von den Projektionswinkeln zwischen dem IS-Dipol und den Komponenten der P-CSA ab und wird durch den Torsionswinkel  $\epsilon$  bestimmt. Die Abhängigkeit der Linearkombination von der relativen Orientierung beider Tensoren wird durch die Drehung der  $\Gamma_P^{CSA}$  in der graphischen Darstellung angedeutet. Es liegt nahe, dass diese Korrelation umgekehrt genutzt werden kann, um aus der Größe der kreuz-korrelierten Relaxationsrate den Torsionswinkel zu bestimmen.

Die Genauigkeit dieser Methode hängt von der genauen Kenntnis des CSA-Tensors ab und setzt voraus, dass eine rigide Struktur vorliegt. Sie ist insbesondere für große CSA empfindlich und kann theoretisch für beliebig weit entfernte Kerne gemessen werden, so lange eine Kohärenz hergestellt wer-

den kann. Jedoch führt die kleiner werdende Kopplung über viele Bindung zu einem Problem der Empfindlichkeit.

Die kreuz-korrelierten Relaxationsraten können über zwei Methoden gemessen werden.

Die Aufnahme entkoppelter Spektren (J-aufgelöste Methode, *J-resolved*) bietet die Möglichkeit, kreuz-korrelierte Relaxationsraten aus den verschiedenen Linienbreiten der einzelnen Komponenten zu extrahieren.

Eine zweite Methode nutzt die Eigenschaft, dass die kreuz-korrelierte Relaxation zu einem Transfer der Magnetisierung führt. Am Beispiel einer DQ/ZQ-Kohärenz des Typs  $4H_z C_y P_y$  wird dies verdeutlicht:

$$4H_z C_y P_y \xrightarrow{\hat{r}[P_z, [2C_z H_z]]} 4H_z C_y P_y \cosh(\Gamma_{CH,P}^{DD,CSA} T_m) + 2C_x P_x \sinh(\Gamma_{CH,P}^{DD,CSA} T_m)$$

Die separate Detektion der in- und antiphase Terme für eine bestimmte Mischzeit  $T_m$  erlaubt die Bestimmung der kreuz-korrelierten Relaxationsrate. Diese Vorgehensweise wird als die quantitative Methode bezeichnet und findet Anwendung im Kapitel 2.

#### 1.1.5.5 PRE/PCS

Das Relaxationsverhalten von NMR-aktiven Kernen kann durch die Wechselwirkung zu einem ungepaarten Elektron stark beeinflusst werden [67]. Die Erhöhung der Relaxation durch paramagnetische Kerne (PRE, *paramagnetic relaxation enhancement*) macht sich durch die Reduktion der Signalintensität bemerkbar und ist mit  $r^{-6}$  vom Abstand abhängig. PREs können als weitreichende Strukturparameter eingesetzt werden. Als Elektronenspin-Träger werden häufig Nitroxidreste oder Lanthanide an das Zielmolekül angebracht. In RNA werden  $Mn^{2+}$ -Ionen verwendet, um  $Mg^{2+}$ -Bindestellen zu identifizieren.

Ein Elektronenspin mit einem großen anisotropen Magnetmoment (z.B. paramagnetische Lanthanide [68]) übt im Magnetfeld eine Kraft aus, die für eine partielle Ausrichtung des gebundenen Moleküls sorgt. Durch die Vorzugsausrichtung des Moleküls wird die dipolare Kopplung zwischen dem Elektron und den NMR-aktiven Kernen nicht durch Bewegung zu Null gemittelt (vgl. RDC). Dennoch kann keine Aufspaltung beobachtet werden, weil der Elektronenspin sehr schnell zwischen dem angeregten Zustand und dem Grundzustand wechselt (kurze Lebensdauer, schnelle Relaxation). Dies führt zu einer gemittelten chemischen Verschiebung des Kerns, die vom Besetzungsunterschied des Elektronenspins abhängig ist. Die Größe der Verschiebung der chemischen Verschiebung (Pseudo-Kontakt-Verschiebung, PCS, *Pseudo Contact Shift*) ist mit  $r^{-3}$  vom Abstand zwischen dem NMR-Kern und Elektron abhängig und kann als ein weiterer Strukturparameter verwendet werden.

### 1.1.6 Strukturrechnung

Die Möglichkeiten der Strukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie sind unmittelbar an den Entwicklungsstand der Rechenprogramme geknüpft. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Programmpaketen zur Verfügung gestellt (Tabelle 1-3). Neue Entwicklungen zielen auf eine automatisierte Strukturbestimmung ab, welche die Zuordnung der Resonanzen und der NOESY-Spektren vollständig übernimmt. Die vollständige Automation wird insbesondere durch Überlappung der Signale für größere Moleküle erschwert. Zum einen treten Schwierigkeiten bei der Zuordnung ein, zum anderen können überlagerte NOESY-Signale nicht als Strukturparameter richtig quantifiziert werden. Um diesem Problem zu begegnen, wird in dem Programmpaket ARIA (und auch CYANA) ein Ansatz gewählt, der die Integration überlappter NOESY-Signale erfolgreich ermöglicht.

Der Ausgangspunkt einer Strukturrechnung ist ein Satz von elongierten Strukturen, die bei hoher Temperatur zufällig orientiert sind und einen weiten Konformationsraum ausfüllen. Die Simulation beginnt mit der Erniedrigung der Temperatur. Dadurch können Wechselwirkungen eintreten und eingegebene Struktur-Beschränkungen das Molekül in eine gefaltete Form lenken.

Tabelle 1-3: Programme für die NMR-Strukturrechnung (Protein/RNA).

Programm/Referenz	
XPLOR-NIH [69] CNS[71]	<i>Chemical Shift to 3D Structure (CS23D)</i> [70]
ARIA [71-74]	<i>Chemical-Shift-ROSETTA (CS-ROSETTA)</i> [75]
CYANA[7]	DANGLE[76]
AUREMOL[77]	UNIO[78]
HADDOCK[79]	TALOS[75]
e-NMR[80]	

Das Ziel der Strukturrechnung ist es, auf der Potenzialfläche zu einem globalen Energieminimum und schließlich zu einer Schar von Strukturen mit der stabilsten Struktur zu gelangen (Abbildung 1-12).

Die Programme CNX (*Crystallography & NMR eXplorer*) [71] und ARIA (*Ambiguous Restraints for Iterative Assignment*) [71-74] benutzen dabei die Methode der rMD (*restrained Molecular Dynamics*)-Simulation [81-84]. Die Funktion der potenziellen Energie  $V_{ges}$  setzt sich aus folgenden Termen zusammen [85]:

$$V_{ges} = V_{klassisch} + V_{NOE} + V_J + V_{dipolar} + V_{CS} + V_{andere}$$

Der Term des klassischen Potentials  $V_{\text{klassisch}}$  beinhaltet die Energien, die sich auf parametrisierte Beiträge für Bindungen, Winkel, Torsionswinkel, Van-der-Waals-Kräfte und elektrostatische Wechselwirkungen beziehen. Die restlichen Energien sind durch NMR-Beschränkungen (z.B. NOEs, J-Kopplung, RDCs) definiert.

Während der Simulation werden die Atome in Bewegung gesetzt und die Änderung der Gesamtenergie nach Änderung der Atomkoordinaten ( $r$ ) verfolgt. Der Temperaturgradient und die Dauer der Schritte sowie die Gewichtung der Beschränkungen werden für die Rechnung in einem Protokoll eingestellt.

Energieminimum :  $dV/dr = 0$

Das Energieminimum ist erreicht, wenn sich der resultierende Betrag nicht mehr ändert.

Die Konvergenz des erhaltenen Strukturbündels ist von der Zahl und der Güte der experimentellen Daten abhängig.

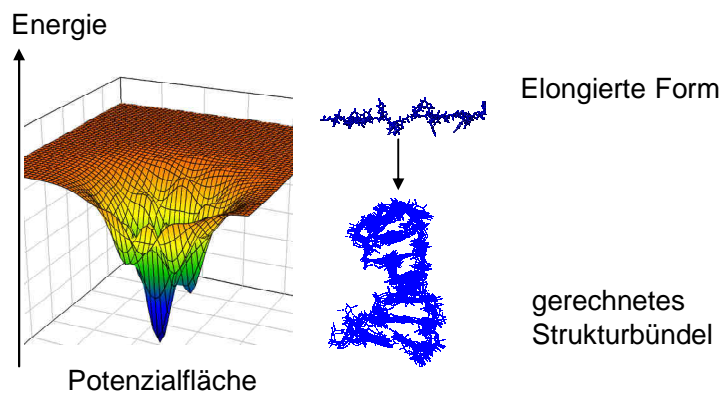


Abbildung 1-12: Strukturrechnung: schematische Darstellung der Potenzialfläche, die während der rMD-Simulation nach dem globalen Minimum abgesucht wird. Während der Simulation wird die Energie des Systems verringert und das Molekül in kleinen Schritten gefaltet, bis es die energetisch günstigste Form findet.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Strukturrechnung das Programm ARIA [71-74] verwendet, das ein zusammengestelltes Paket mit dem Kraftfeld von CNX ist. Als Kraftfeld wird PARALLHDG verwendet [86]. Während CNX nur mit manuell kalibrierten Daten arbeitet, so wird in ARIA eine automatische Zuordnung und Kalibrierung der NMR-Strukturparameter mit einem iterativen Prozess in der Strukturrechnung gekoppelt. Durch die Analyse der Relaxationsmatrix wird zusätzlich die Korrektur der Spindiffusion vorgenommen [73]. In einem letzten Schritt kann die Verfeinerung mit dem Lösungsmittel Wasser berechnet werden [87]. In diesem Teil der Rechnung findet freie MD-Simulation mit einem Hybrid-Kraftfeld aus Engh-Huber- und OPLS-Kraftfeld statt.

1.1.7 Untersuchung der Moleküldynamik

Die strukturelle Dynamik und der Austausch zwischen verschiedenen Konformationen ist essenziell für die Funktion von Proteinen und RNA. Biologisch relevante Aktivitäten, wie Katalyse, Faltung oder Ligandbindung, erfordern eine strukturelle Flexibilität, die durch eine Kristallstruktur nicht ausreichend repräsentiert werden kann. Anderen Methoden, wie Fluoreszenz- oder IR-Spektroskopie, die in Lösung angewandt werden können, fehlt die atomare Auflösung. Im Gegensatz dazu liefert die NMR-Spektroskopie einen Einblick auf atomarer Ebene. Mit einer wachsenden Zahl von Experimenten können die Dynamiken und der Austausch auf verschiedenen Zeitskalen erfasst werden (Abbildung 1-13) [8, 88-89]. Zudem kann für langsame Prozesse eine Untersuchung in Echtzeit erfolgen (*real-time* NMR) [90].

Das Ausmaß der strukturellen Flexibilität oder des chemischen Austauschs macht sich auf der Linienform der aufgenommenen Signale bemerkbar. Ob zwei Signale getrennt oder gemittelt aufgenommen werden, hängt von dem Unterschied der chemischen Verschiebung in Hz und der Austauschrate  $k_{ex}$  ab (Abbildung 1-13).

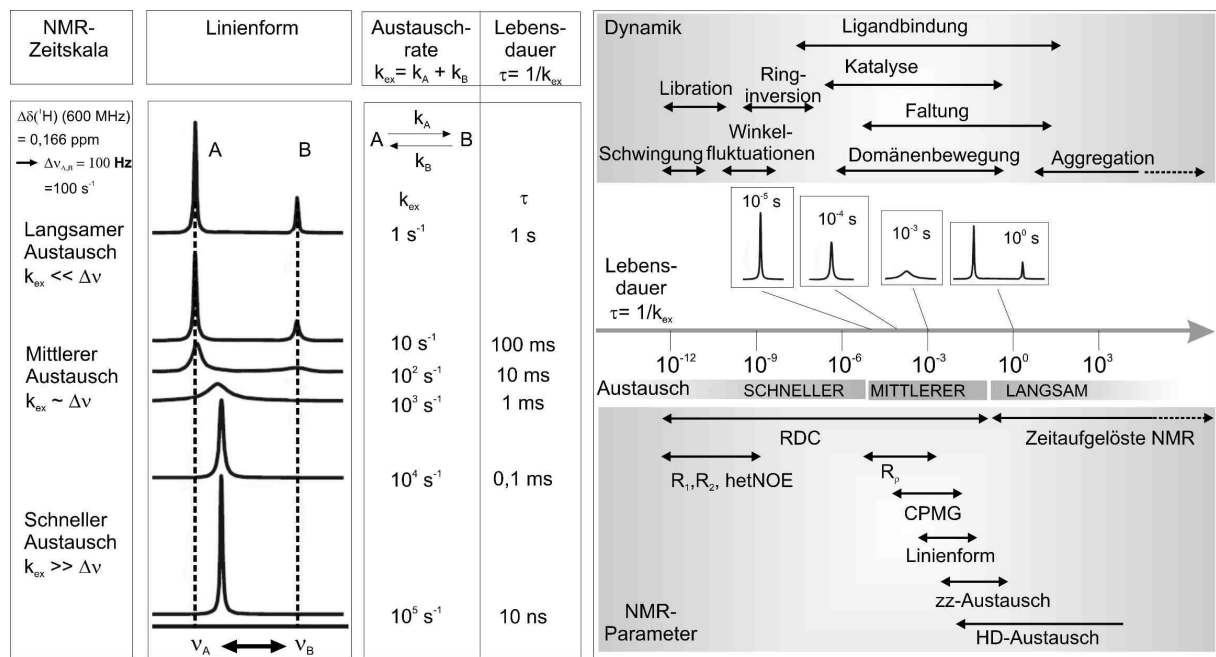


Abbildung 1-13: Übersicht über die molekularen Dynamiken und NMR-Parametern, die zur Untersuchung herangezogen werden können. Die Abbildung ist in Anlehnung an Kleckner, I. R., et al. (2011) [89].

Beim schnellen Austausch erscheint im Spektrum ein gemittelt, scharfes Signal, das auf Dynamiken, die schneller als die Rotationskorrelationszeit über Relaxationseffekte ( $T_1$ ,  $T_2$ , hetNOE) untersucht werden kann. Der mittlere Austausch führt zur Linienverbreiterung und kann über die Linienform direkt in Austauschraten übersetzt werden. In einem Grenzgebiet zwischen dem mittleren und lang-



samen Austausch wird die NMR-Analyse erschwert, weil Signale durch das Auftreten der Koaleszenz verbreitern und schwer zu detektieren sind. Eine Übersicht über die NMR-Parameter, die für die Analyse angewandt werden können, ist in der Abbildung 1-13 gegeben (weiterführende Literatur: [11, 88-89, 91]).

### 1.1.8 Literatur

1. Proteindatenbank, PDB 2011
2. Frith MC, Pheasant M, Mattick JS. **2005.** *Eur. J. Hum. Genet.* 13: 894-7
3. Pervushin K, Riek R, Wider G, Wüthrich K. **1997.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12366-71
4. Riek R, Wider G, Pervushin K, Wüthrich K. **1999.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4918-23
5. Schanda P, Brutscher B. **2005.** *J. Am. Chem. Soc.* 127: 8014-5
6. Kupce E, Nishida T, Freeman R. **2003.** *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 42: 95-122
7. López-Méndez B, Güntert P. **2006.** *J. Am. Chem. Soc.* 128: 13112-22
8. Blackledge M. **2005.** *Prog. Nuc. Magn. Reson. Spectrosc.* 46: 23-61
9. Barthelmes K, Reynolds AM, Peisach E, Jonker HRA, DeNunzio NJ, et al. **2010.** *J. Am. Chem. Soc.* 133: 808-19
10. Shen Y, Delaglio F, Cornilescu G, Bax A. **2009.** *J. Biomol. NMR* 44: 213-23
11. Mittermaier AK, Kay LE. **2009.** *Trends Biochem. Sci.* 34: 601-11
12. Korzhnev DM, Salvatella X, Vendruscolo M, Di Nardo AA, Davidson AR, et al. **2004.** *Nature* 430: 586-90
13. Hsu S-TD, Fucini P, Cabrita LD, Launay H, Dobson CM, Christodoulou J. **2007.** *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 104: 16516-21
14. Sakakibara D, Sasaki A, Ikeya T, Hamatsu J, Hanashima T, et al. **2009.** *Nature* 458: 102-5
15. Hanna JV, Smith ME. **2010.** *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 38: 1-18
16. Renault M, Cukkemane A, Baldus M. **2010.** *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 49: 8346-57
17. Stevens TJ, Arkin IT. **2000.** *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* 39: 417-20
18. Hubbard RE. 2006. *Structure-Based Drug Discovery - An Overview.* Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry
19. Kenneth MM, Dagmar R, Charles HR. 2010. *Drug Design Structure- and Ligand-Based Approaches.* New York: Cambridge University Press
20. Meyer B, Peters T. **2003.** *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 864-90
21. Orry AJW, Abagyan RA, Cavasotto CN. **2006.** *Drug Discovery Today* 11: 261-6
22. Shuker SB, Hajduk PJ, Meadows RP, Fesik SW. **1996.** *Science* 274: 1531-4
23. Mayer M, Meyer B. **1999.** *Angew. Chem. Int. Ed.* 38: 1784-8
24. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. **1998.** *Nature* 391: 806-11
25. Cech TR, Zaug AJ, Grabowski PJ. **1981.** *Cell* 27: 487-96
26. Lilley DMJ, Eckstein F. 2008. *Ribozymes and RNA Catalysis.* RSC Publishing
27. Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S. **1983.** *Cell* 35: 849-57
28. Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. **2000.** *Nature* 407: 340-8
29. Famulok M. **1994.** *J. Am. Chem. Soc.* 116: 1698-706
30. Ellington AD, Szostak JW. **1990.** *Nature* 346: 818-22
31. Berkhout B, Silverman RH, Jeang K-T. **1989.** *Cell* 59: 273-82
32. Storz G. **1999.** *Genes dev.* 13: 633-6
33. Narberhaus F, Waldminghaus T, Chowdhury S. **2006.** *FEMS Microbiol. Re.* 30: 3-16
34. Mandal M, Boese B, Barrick JE, Winkler WC, Breaker RR. **2003.** *Cell* 113: 577-86
35. Fürtig B, Richter C, Wöhnert J, Schwalbe H. **2003.** *Chembiochem* 4: 936-62
36. Cromsigt J, van Buuren B, Schleucher J, Wijmenga S. **2002.** *Methods Enzymol.* 33A:371-99: s
37. Ebrahimi M, Rossi P, Rogers C, Harbison GS. **2001.** *J. Magn. Reson.* 150: 1-9

38. Varani G, Aboul-ela F, Allain FHT. **1996.** *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 29: 51-127
39. Overhauser AW. **1953.** *Phys. Rev.* 92: 411
40. Anet FAL, Bourn AJR. **1965.** *J. Am. Chem. Soc.* 87: 5250-1
41. Williamson MP, Havel TF, Wüthrich K. **1985.** *J. Mol. Biol.* 182: 295-315
42. Karplus M. **1963.** *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2870-1
43. Marino JP, Schwalbe H, Glaser SJ, Griesinger C. **1996.** *J. Am. Chem. Soc.* 118: 4388-95
44. Wirmer J, Schwalbe H. **2002.** *J. Biomol. NMR* 23: 47-55
45. Mierke DF, Grdadolnik SG, Kessler H. **1992.** *J. Am. Chem. Soc.* 114: 8283-4
46. Egli H, von Philipsborn W. **1981.** *Helv. Chim. Acta* 64: 976-98
47. Haasnoot CAG, de Leeuw FAAM, Altona C. **1980.** *Tetrahedron* 36: 2783-92
48. Lankhorst PP, Haasnoot CA, Erkelens, C. A. **1984.** *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1: 1387-405
49. Mooren MMW, Wijmenga SS, van der Marel GA, van Boom JH, Hilbers CW. **1994.** *Nucleic Acids Res.* 22: 2658-66
50. Plavec J, Chattopadhyaya J. **1995.** *Tetrahedron Lett.* 36: 1949-52
51. Legault P, Jucker FM, Pardi A. **1995.** *FEBS Lett.* 362: 156-60
52. Marino JP, Schwalbe H, Anklin C, Bermel W, Crothers DM, Griesinger C. **1994.** *J. Am. Chem. Soc.* 116: 6472-3
53. Schwalbe H, Marino JP, King GC, Wechselberger R, Bermel W, Griesinger C. **1994.** *J. Biomol. NMR* 4: 631-44
54. Schwalbe H, Samstag W, Engels JW, Bermel W, Griesinger C. **1993.** *J. Biomol. NMR* 3: 479-86
55. Richter C, Reif B, Wörner K, Quant S, Marino JP, et al. **1998.** *J. Biomol. NMR* 12: 223-30
56. Hu W, Bouaziz S, Skripkin E, Kettani A. **1999.** *J. Magn. Reson.* 139: 181-5
57. Carlomagno T, Hennig M, Williamson JR. **2002.** *J. Biomol. NMR* 22: 65-81
58. Clore GM, Murphy EC, Gronenborn AM, Bax A. **1998.** *J. Magn. Reson.* 134: 164-7
59. Schwalbe H, Marino JP, Glaser SJ, Griesinger C. **1995.** *J. Am. Chem. Soc.* 117: 7251-2
60. Duchardt E, Richter C, Reif B, Glaser SJ, Engels JW, et al. **2001.** *J. Biomol. NMR* 21: 117-26
61. Trantírek L, Štefl R, Masse JE, Feigon J, Sklenář V. **2002.** *J. Biomol. NMR* 23: 1-12
62. Munzarová ML, Sklenář V. **2003.** *J. Am. Chem. Soc.* 125: 3649-58
63. Reif B, Hennig M, Griesinger C. **1997.** *Science* 276: 1230-3
64. Felli IC, Richter C, Griesinger C, Schwalbe H. **1999.** *J. Am. Chem. Soc.* 121: 1956-7
65. Schwalbe H, Carlomagno T, Hennig M, Junker J, Reif B, et al. **2001.** *Methods Enzymol.* 338: 35-81
66. Richter C, Reif B, Griesinger C, Schwalbe H. **2000.** *J. Am. Chem. Soc.* 122: 12728-31
67. Donaldson LW, Skrynnikov NR, Choy W-Y, Muhandiram DR, Sarkar B, et al. **2001.** *J. Am. Chem. Soc.* 123: 9843-7
68. Wöhnert J, Franz KJ, Nitz M, Imperiali B, Schwalbe H. **2003.** *J. Am. Chem. Soc.* 125: 13338-9
69. Schwieters CD, Kuszewski JJ, Tjandra N, Marius Clore G. **2003.** *J. Magn. Reson.* 160: 65-73
70. Wishart DS, Arndt D, Berjanskii M, Tang P, Zhou J, Lin G. **2008.** *Nucleic Acids Res.* 36: W496-W502
71. Brunger AT AP, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T, Warren GL. **1998.** *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 54: 905-21
72. O'Donoghue MNaS. **1998.** *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 32: 107-39
73. Linge JP. 2001. *New methods for automated NOE assignment and NMR structure calculation.* Norderstedt, DE.
74. J.P. Linge SIODaMN. **2001.** *Methods Enzym.* 339: 71-90
75. Shen Y, Vernon R, Baker D, Bax A. **2009.** *J. Biomol. NMR* 43: 63-78
76. Cheung M-S, Maguire ML, Stevens TJ, Broadhurst RW. **2010.** *J. Magn. Reson.* 202: 223-33
77. Gronwald W, Kalbitzer HR. **2004.** *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 44: 33-96
78. Volk J, Herrmann T, Wüthrich K. **2008.** *J. Biomol. NMR* 41: 127-38
79. de Vries SJ, van Dijk ADJ, Krzeminski M, van Dijk M, Thureau A, et al. **2007.** *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* 69: 726-33
80. e-NMR. EU/EAST-NMR Computational Infrastructure 2011.
81. Leach AR. 1996. *Molecular Modelling - Principles and Applications:* Addison Wesley Longman
82. Sheek RM, van Gunsteren, W. F., Kaptein, R. **1989.** *Methods Enzymol.* 177: 204-18

83. Bukgesm N. G, A.M., Bruenger, A. T. **1988**. *Protein Engineering*: 27-38
84. van Gunsteren WF, Berendsen, H. J. C. **1990**. *Angwe. Chem. Int. Ed. Engl.* 29: 992-1023
85. van Gunsteren WF. **1993**. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3
86. Linge JP, Nilges, M. **1999**. *J. Biomol. NMR* 13: 51-9
87. Jens P. Linge MAW, Christian A.E.M. Spronk, Alexandre M. J. J. Bonvin, Michael Nilges. **2003**. *PROTEINS* 50: 496-506
88. Al-Hashimi HM, Walter NG. **2008**. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18: 321-9
89. Kleckner IR, Foster MP. **2011**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1814: 942-68
90. Fürtig B, Buck J, Manoharan V, Bermel W, Jäschke A, et al. **2007**. *Biopolymers* 86: 360-83
91. Buck J, Fürtig B, Noeske J, Wöhnert J, Schwalbe H. **2009**. *Methods Mol. Biol.* 540: 161-71

## 1.2 Aufbau und Struktur von RNA/DNA

### 1.2.1 Primäre Struktur

In RNA und DNA sind vier verschiedene Einheiten (Nukleotide) kovalent zu einem Polymer miteinander verbunden (Abbildung 1-14). Ein Nukleotid besteht aus drei chemisch und strukturell unterschiedlichen Komponenten: Nukleobase, Ribosezucker und Phosphodiestergruppe. Die Verknüpfung der Nukleotide erfolgt über die Veresterung des Zuckers und der Phosphatgruppen an den 5'- und 3'-Kohlenstoffen des Zuckers.

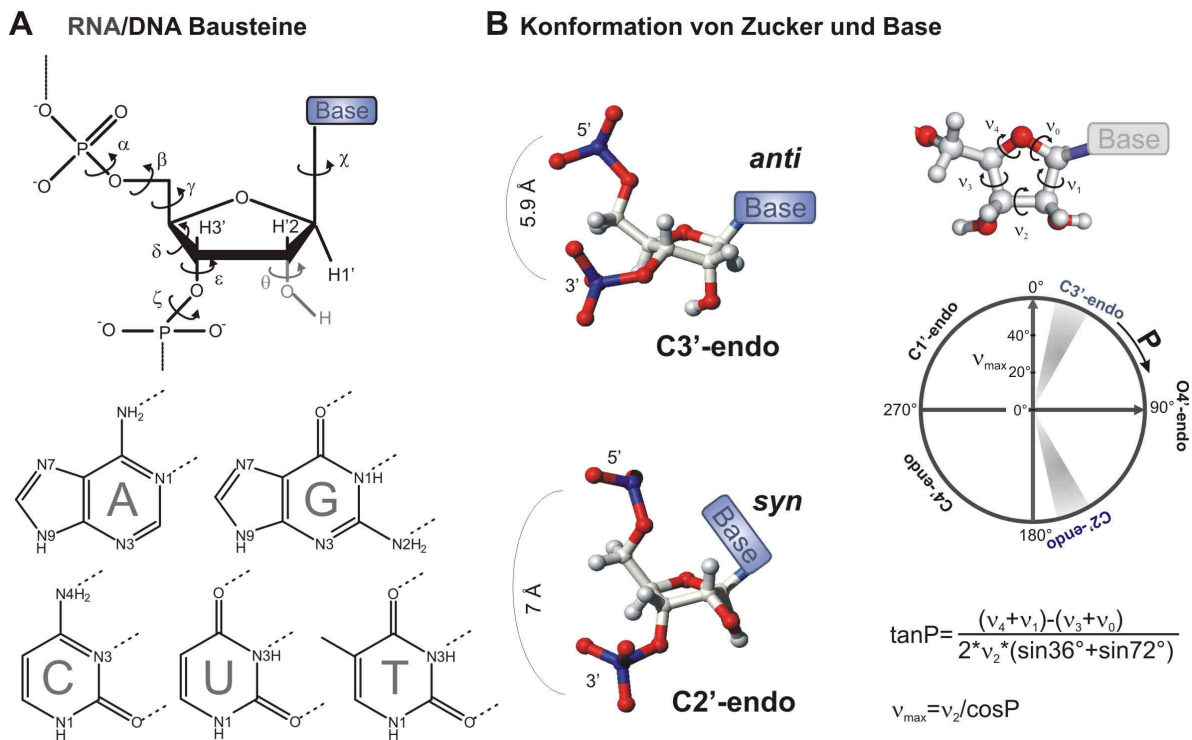


Abbildung 1-14: Aufbau und Konformation der RNA/DNA. A. Chemische Zusammensetzung der RNA und DNA. A. Oben: Nukleotidstruktur und Definition der Torsionswinkel ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ). Die 2'-Hydroxylgruppe ist nur in RNA vorhanden (grau). Unten: Chemische Struktur der Nukleobasen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T). Funktionelle Gruppen, die in Ausbildung von Wasserstoffbrücken involviert sind, sind mit gestrichelten Linien gekennzeichnet. B. Links: Strukturen der zwei meist populierten Konformationen des Zuckers C3'-endo und C2'-endo. Rechts: Darstellung des Zuckers mit den endzyklischen Torsionswinkel  $v_{0-4}$  und die Formel zur Beschreibung der Pseudorotationsphase P und der maximalen Amplitude  $v_{\max}$ [1].

Die Phosphatgruppe verleiht der RNA/DNA ihre aziden Eigenschaften und liegt beim physiologischen pH-Wert vollständig deprotoniert vor. RNA und DNA unterscheiden sich in der Zuckereinheit, die in RNA als Ribose und in DNA als Desoxyribose vorliegt. Die Anwesenheit der 2'-Hydroxylgruppe (2'-OH)

ist essenziell für die Struktur und Funktion der RNA, die eine höhere konformationelle und chemische Diversität aufweist. Die genetische Information wird durch die vier verschiedenen Nucleobasen, die am Zucker durch eine *N*-glykosidische Bindung verbunden sind, kodiert. Die Nucleobasen Adenin (A) und Guanin (G) bestehen aus dem kondensierten Ringsystem Purin. Cytosin (C) und Uracil (U) in RNA bzw. Thymin (T) in DNA bestehen aus monozyklischen Pyrimidinbausteinen. In DNA ist das Cytosin durch das methylierte Thymin ersetzt. Die Sequenz der vier Nucleotide wird durch die Buchstabenabkürzung der angebrachten Nucleobasen (A, G, C, U oder T) angegeben und stellt die primäre Struktur der RNA bzw. DNA dar.

Die lokale Konformation der RNA/DNA ist unterteilt in drei Regionen: Rückgrat, Zucker und Nucleobase. Das Phosphatrückgrat ist durch sechs Torsionswinkel ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ) definiert (Abbildung 1-14). Der Torsionswinkel  $\delta$  beschreibt zugleich die Konformation des Rückgrats und des Zuckers und korreliert deshalb mit der Zuckerkonformation. Generell wird diese beschrieben, indem das Kohlenstoffatom, das aus der Ringebene erhoben ist, mit dem Term „endo“ (z.B. C3'-endo) gekennzeichnet wird. Die genaue Zuckerkonformation kann beschrieben werden durch die Pseudorotationsphase  $P$  und die maximale Amplitude  $v_{max}$ , welche durch die fünf endozyklischen Torsionswinkel  $v_{0-4}$  definiert sind [1]. Die Struktur der Nucleobase ist durch die Aromatizität auf die planare Konformation eingeschränkt, während die relative Orientierung zum Zucker, beschrieben durch den Torsionswinkel  $\chi$ , weitgehend flexibel ist. Die RNA erhält durch die 2'-OH-Gruppe einen zusätzlichen Parameter (Torsionswinkel  $\theta$ ). Insgesamt gibt es in der RNA zehn und der DNA neun Freiheitsgrade bezüglich der Konformation.

Statistische Analyse der Torsionswinkel und ihrer Verteilungen anhand der Kristallstruktur des Ribosoms zeigt, dass die 1D-Verteilungen mehrere und zum Teil breitere Maxima zeigen (Abbildung 1-15). Die Torsionswinkel  $\alpha$  und  $\gamma$  haben eine trimodale Verteilung, wohingegen der Torsionswinkel  $\beta$  auf die *trans*-Konformation ( $180^\circ$ ) mit einer breiten Gauß'schen Verteilung eingeschränkt ist. Die bimodale Verteilung des Torsionswinkel  $\chi$  reflektiert die Hauptkonformationen *anti* und *syn* der Nucleobasen. Aus sterischen Gründen ist der Torsionswinkel  $\epsilon$  auf die Werte von  $> 180^\circ$  begrenzt und zeigt eine sehr breite Verteilung. Der Zucker wird entweder in der C3'- oder C2'-endo Konformation vorgefunden. Dies korreliert mit dem bimodalen Verlauf des Torsionswinkels  $\delta$ . RNA und DNA haben fundamental unterschiedliche Präferenzen für die Zuckerkonformation, welche auf die Anwesenheit der 2'-OH-Gruppe zurückgeführt werden. In Doppelstrangbereichen wird die DNA ausschließlich in der C3'-endo und die RNA in C2'-endo Konformation vorgefunden. Im Gegensatz zur DNA liegt die RNA oftmals als Einzelstrang vor und populierte dort sowohl die C3'-endo als auch die C2'-endo Konformation. Die höchste Variabilität in RNA und DNA wird für den Torsionswinkel  $\zeta$  beobachtet, welcher alle möglichen Werte ohne eine scharfe Präferenz außer in kanonischer Doppelhelix einnimmt. Generell sind in der kanonischen Doppelhelix sowohl in der RNA als auch DNA alle Winkel durch spezifische Werte charakterisiert und zeigen wenig Abweichung. In nicht-kanonischen Regionen, in denen alle

Konformationen möglich sind, zeigt sich keine bzw. nur eine geringe Korrelation zwischen den Torsionswinkeln.

1D Verteilung im Ribosom

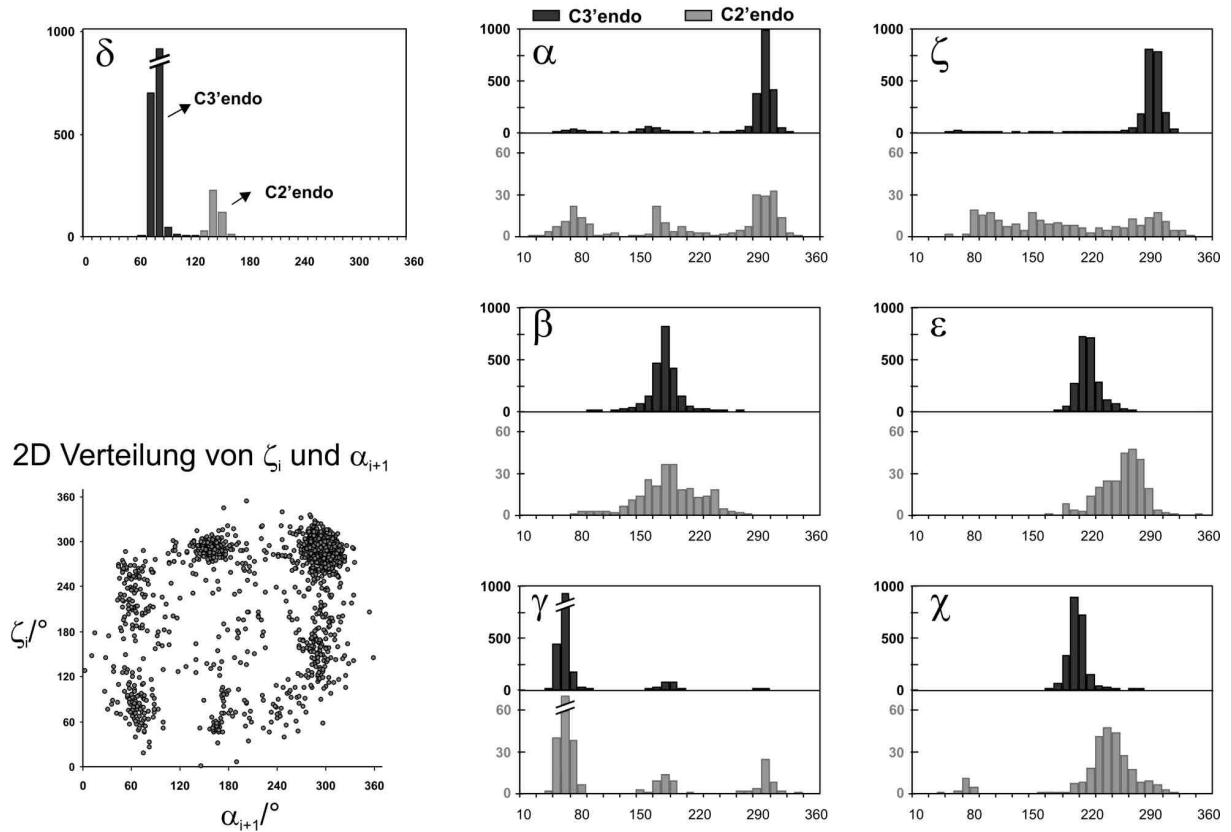


Abbildung 1-15: 1D/2D Verteilung der Torsionswinkel in der Kristallstruktur der ribosomalen RNA (pdb: 1jj2, 2746 Reste). 1D-Verteilung der Torsionswinkel ist in zwei Datensätze unterteilt. Dunkel grau: Nukleotide mit dem Zucker in C3'-endo Konformation. Hell grau: Nukleotide mit dem Zucker in C2'-endo Konformation. 2D-Verteilung zeigt die Korrelation der Torsionswinkel  $\zeta_i$  and  $\alpha_{i+1}$  für alle Reste [2].

Der Vergleich der Torsionswinkel für RNA-Nukleotide in der kanonischen C2'-endo und nicht kanonischen C3'-endo Konformation unterstreicht diese Tatsache. In nicht-kanonischen Strukturelementen zeigen die Torsionswinkel eine weitaus höhere Variabilität. Insbesondere die Winkel  $\alpha$  und  $\zeta$  weisen eine hohe Streuung auf und dennoch bilden sich in der Korrelation der Winkel um die Phosphatgruppe ( $\zeta_i$  und  $\alpha_{i+1}$ ) definierte Cluster [3]. Für eine Definition der Torsionswinkel siehe Tabelle 1-2.

Jede Nucleobase besitzt eine bestimmte Kombination aus funktionellen Gruppen (Keto-, Imino- und Aminogruppen), welche die Bildung von Wasserstoffbrücken eingehen. Diese sind die Voraussetzung für die Formation der Basenpaare um die sekundäre und tertiäre Struktur aufzubauen.

## 1.2.2 Sekundäre Struktur

Die Sekundärstruktur beschreibt die Ausbildung von Basenpaaren, welche die RNA in verschiedene Faltungsmuster leiten können (Abbildung 1-16) [4].

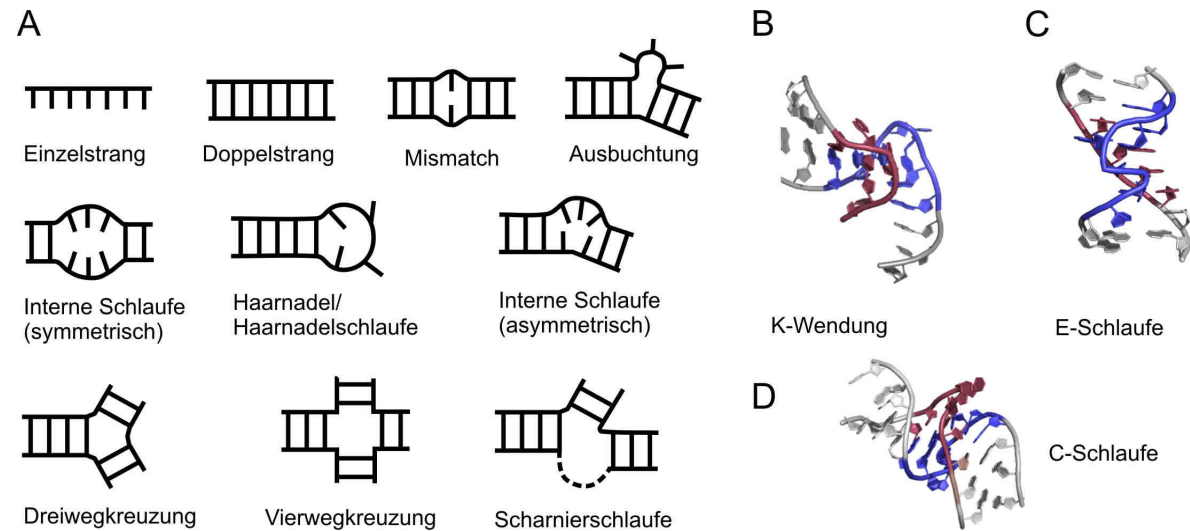


Abbildung 1-16: Charakterisierung der RNA-Struktur. A. Schematische Darstellung der am häufigsten auftretenden RNA-Sekundärstrukturelemente. B. K-Wendung (A50-G65) im Lysin-bindenden RNA-Schalter (3DIL)[5]. C. E-Schleife (G22-G31) im Lysin-bindenden RNA-Schalter (3DIL) [5]. D. C-Schleife (A957-G964) in der 23S rRNA (1KOG) [6].

### Doppelhelix

Die Doppelhelix besteht aus zwei Einzelsträngen, die über Basenpaarung in entgegengesetzter Richtung aneinander gelagert sind. Es stehen sich immer zwei bestimmte Basen gegenüber, die sich über die Ausbildung von Wasserstoffbrücken erkennen; A-U, G-C. Durch die Kombination aus einer Purin- und einer Pyrimidinbase ist der Abstand zwischen den Strängen überall gleich und es entsteht eine regelmäßige Struktur. Thermodynamisch wird die Form neben den Wasserstoffbrücken durch Stapelwechselwirkungen zwischen aufeinander folgenden Basenpaaren stabilisiert. In RNA dominiert die A-Form-Helix mit der C3'-endo Konformation des Zuckers, in DNA die B-Form-Helix mit der C2'-endo Konformation. Weitere Konformationen sind bekannt und in der Tabelle 1-4 aufgelistet. In RNA können auch nicht-kanonische Basenpaare wie GU ausgebildet werden.

Tabelle 1-4: Torsionswinkel des RNA/DNA-Doppelstrangs in verschiedenen Konformationen [7].

	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	$\epsilon$	$\zeta$	$\chi$
B-DNA	-30	136	31	143	-141	-161	-98
C-DNA	-37	-160	37	157	161	-106	-97
D-DNA	-59	156	64	145	-163	-131	-102
A-DNA	-52	175	42	79	-148	-75	-157
A-RNA	-69	179	55	82	-154	-71	-161
Z (G)-DNA	52	179	-174	95	-104	-65	59
Z (C)-DNA	-140	-137	51	138	-97	82	-154

### Ausbuchtungen und interne Schlaufen

Die Doppelhelixbereiche können von nicht basenpaarenden Nukleotiden unterbrochen werden, die entweder nur auf einem Strang oder auf beiden Strängen vorkommen. Man spricht dann von Ausbuchtungen (*Bulges*) bzw. von internen Schlaufen (*Loops*), die in der Größe und Struktur sehr unterschiedlich sein können. Abhängig von der Anzahl der nicht paarenden Nukleotide auf beiden Seiten wird zwischen symmetrischen und asymmetrischen Schlaufen unterschieden. Im Gegensatz zu Ausbuchtungen können sich symmetrische Schlaufen gut in die Helixstruktur integrieren, insbesondere wenn zwischen den Nukleotiden Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können. Die bekannteste und kleinste interne Schlaufe ist ein GU-Mismatch, der sich durch alternative Wasserstoffbrücken als Basenpaar in die Helix eingliedert.

Ausbuchtungen prägen die globale Struktur der RNA, weil sie unter anderem einen Knick in die Helixkonformation und dadurch besondere strukturelle Flexibilität hervorrufen können. Ein bekanntes Beispiel ist die TAR-RNA, in der die dreigliedrige Ausbuchtung einen Knick-Winkel bis zu 90° verursacht [8].

### Haarnadeln

Eine antiparallele Helix (*Stem*), die von einer Schlaufe (*Loop*) mit nicht gepaarten Nukleotiden geschlossen wird, bildet eine Haarnadelstruktur. Sie sind ein dominierendes Sekundärstrukturelement und oft in biologisch relevanten Zentren wie z.B. Kontaktstellen bei der Protein-RNA-Erkennung enthalten [9-10]. Der kleinste *Loop* besteht aus zwei Nukleotiden, während die viergliedrigen Schlaufen (*Tetra-loops*) als häufigste Vertreter dieses Strukturelements gelten und in zwei stabile und häufig vorkommende Klassen GNRA und YNMG<sup>1</sup> unterteilt werden können [11-12]. Unter ihnen gehört der UUCG-*Tetra-loop* mit einem benachbarten CG in der Helix zu der thermodynamisch stabilsten Spezies (Abbildung 1-17) [13]. Aufgrund seiner außergewöhnlichen Stabilität wurde mit großem Interesse die Bestimmung der Struktur verfolgt [14]. Im Jahr 1990 wurde die dreidimensionale NMR-Struktur des

<sup>1</sup> N= alle Nukleotide, R= alle Purine, Y= alle Pyrimidine, M= Adenin oder Cytosin



*Tetraloops* gelöst [15-16], später folgte die Röntgenstruktur [17]. Damit war es möglich, einen Einblick in die dreidimensionale Struktur und alle Wechselwirkungen innerhalb des *Loops* zu bekommen. Im Folgenden sind strukturelle Eigenschaften, welche Schlüsselemente der besonderen Stabilität des *Loops* darstellen, gezeigt.

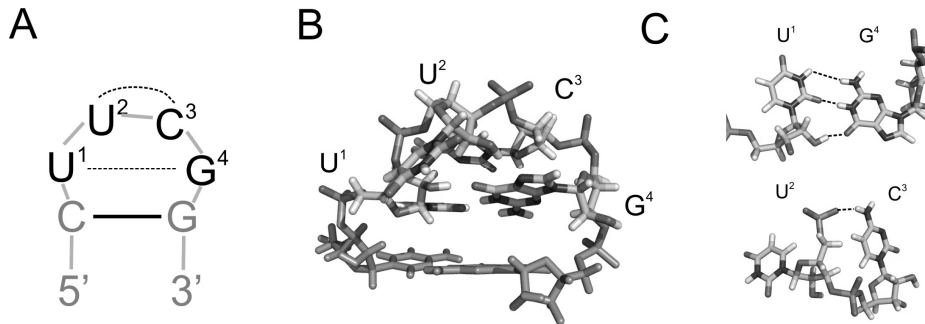


Abbildung 1-17: A. Sekundärstruktur und (B) Lösungsstruktur des cUUCGg-Tetraloops. C. Darstellung der wichtigen Wechselwirkungen zwischen den Basen U1 und G4, sowie zwischen den Resten U2 und C3.

Die Nucleotide Uracil 1 und Guanin 4 bilden eine außergewöhnliche GU-Paarung, die durch drei Wasserstoffbrücken stabilisiert wird. Neben dem O2-Sauerstoff, das in einer gegabelten Wasserstoffbrücke involviert ist, wird auch die 2'-OH-Gruppe der Ribose von Uracil 1 in die bindenden Wechselwirkungen einbezogen.

Stabilisierenden Einfluss haben des Weiteren die Stapelwechselwirkungen zwischen Uracil 1 und Cytosin 3, dessen Aminogruppe eine zusätzlich stabilisierende Wasserstoffbrücke zu dem Sauerstoff der eigenen Phosphatgruppe eingeht. Außerdem kann die 2'-OH-Gruppe der Riboseeinheit mit dem O2 der eigenen Nucleobase Cytosin 3 wechselwirken.

Die Base Uracil 2 ist durch keine schlaufeninternen Kontakte definiert und ist zum Lösungsmittel herausgedreht.

Die Ribosezucker der Nucleotide Uracil 2 und Cytosin 3 im *Loop* zeigen die für RNA seltenere 2'-endo Konformation.

Das letzte Helix-Basenpaar kann Einfluss auf die Stabilität des *Loops* nehmen. Der Typ 5'-CG-3' wirkt stabilisierender als 5'-GC-3'. Dies kann mit der Möglichkeit einer Stapelwechselwirkung von Guanin 5 mit Uracil 1 erklärt werden.

### 1.2.3 Tertiäre Struktur

In RNA wie in Proteinen sind Reste konserviert, weil sie entweder essentiell für die biologische Funktion sind, oder weil sie in tertiäre Wechselwirkungen involviert sind. Tertiäre Wechselwirkungen sind eine Stütze der globalen Architektur, assistieren bei der RNA-Faltung und ermöglichen die Annäherung von Domänen, die beispielweise in Ribozymen ein katalytisches Zentrum umschließen. Viele tertiäre

Wechselwirkungen entstehen zwischen ungepaarten Bereichen der RNA, wie Schleifen (z.B. der GNRA-*Tetraloop*-Rezeptor [18], Schleifeninteraktion [19]) und Ausbuchtungen durch Ausbildung von kanonischen aber auch nicht-kanonischen Basenpaaren und Stapelwechselwirkungen.

Durch die große Zahl neuer RNA-Strukturen in den letzten Jahren ist die Anzahl der bekannten Tertiär motive, die unter diese Rubrik fallen, gestiegen und kann hier nicht im Einzelnen überblickt werden. Dennoch ist die Zahl der gelösten Strukturen zu klein um eine vollständige Identifizierung und Klassifizierung tertiärer Struktur motive durchführen zu können. Im Folgenden wird nur auf ausgewählte Struktur motive eingegangen

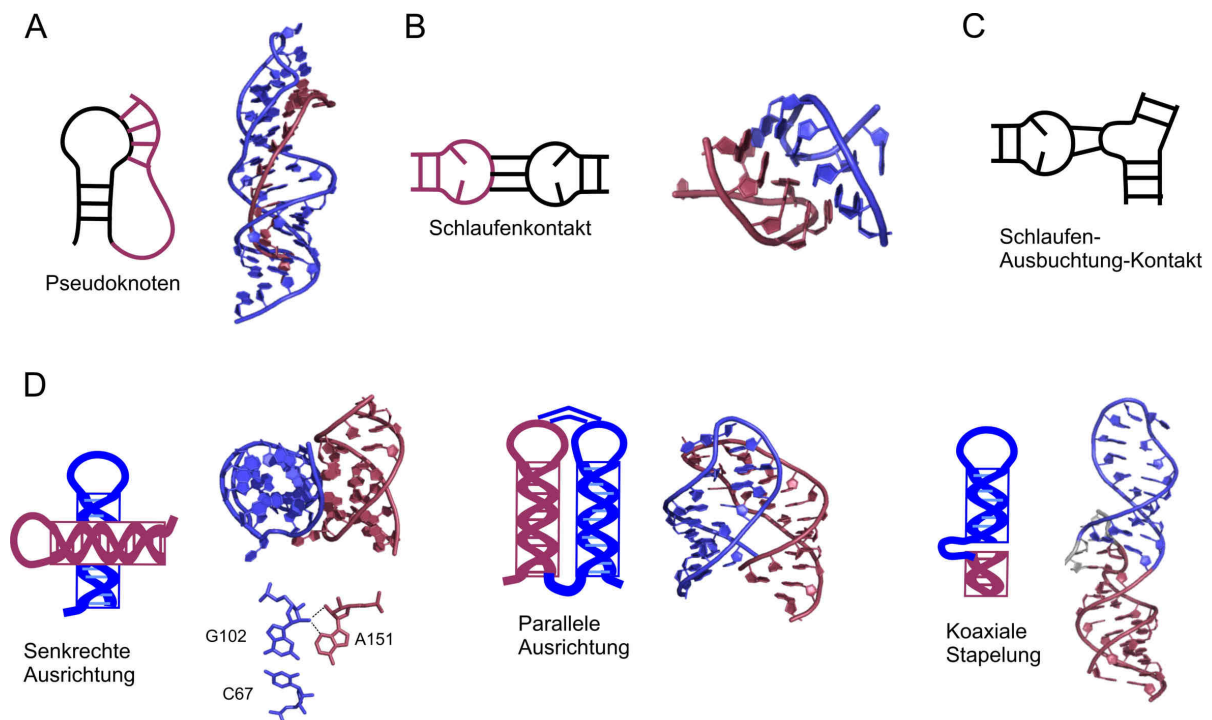


Abbildung 1-18: Wichtige Tertiärstruktur motive. A. Pseudoknoten in der humanen Telomerase (1YMO) [20-21]. B. Schleifenkontakt zwischen zwei Haarnadelschleifen innerhalb des Lysin-bindenden RNA-Schalters [5, 19] D. Helixpackung durch tertiäre Wechselwirkung. Links: Senkrechte Annäherung durch das *A-minor*-Motiv: Helix 6 und 8 in der ribosomalen RNA [22-23]. Mitte: Parallele Ausrichtung der P2- und P3-Helix im Adenin-bindende RNA-Schalter [24]. Rechts: Koaxiale Stapelung zwischen der P3- und P1-Helix im Adenin-bindende RNA-Schalter [24].

## Pseudoknoten

Pseudoknoten sind ein häufig auftretendes Struktur motiv in der RNA und treten in diverseren Variationen in Erscheinungen. Die einfachste Form ist in der Abbildung 1-18 dargestellt und besteht aus zwei Haarnadeln, die mit einander verbunden sind. In Ribozymen, selbst-spleißenden Introns, RNA-Schaltern oder der humanen Telomerase spielen Pseudoknoten eine wichtige Rolle in der Bildung des katalytischen Zentrums [20, 25].

### Basentripel und -quadruplex

Im Adenin-bindenden RNA-Schalter finden sich beide Struktur motive und werden im Kapitel 1.3 in der Abbildung 1-21 dargestellt. Das Basenquadruplex bildet sich bei der Wechselwirkung zwischen den Haarnadeln und ist trotz der Entfernung zur Bindungstasche essentiell für die Bindungsstärke. Innerhalb der Bindungstasche entstehen drei Basentripel, die den Liganden binden und umschließen. Weitere Beispiele für tertiäre Struktur motive sind der Ribosereisverschluss (*ribose-zipper*)[26], Adenosinebenen (*adenosine platformes*) [27] und G-Ribo-Motiv [28].

### Helixpackung (Abbildung 1-18)

RNA-Strukturen bestehen aus verschiedenen langen Doppelstrangbereichen, die über tertiäre Wechselwirkungen zusammengefügt werden müssen, damit eine kompakte Architektur, wie sie oft beobachtet wird, entsteht.

### Koaxiale Stapelung

Innerhalb der tRNA sind 41 der 76 Basen an einer klassischen Helixstruktur beteiligt, aber 72 Basen sind an Stapelwechselwirkungen beteiligt [29-30]. Diese Zahl verdeutlicht, welchen Beitrag die Stapelwechselwirkung zur Stabilisierung der RNA-Struktur liefert.

### Parallele Ausrichtung der Helices

Mithilfe von tertiären Wechselwirkungen zwischen den Haarnadelschlaufen und Ausbuchtungen werden Helixstrukturen parallel ausgerichtet und so eine hohe Packungsdichte der RNA-Struktur erreicht. Die abstoßenden Kräfte zwischen den negativ geladenen Phosphatrückgraten werden dabei durch Magnesiumionen oder andere Kationen kompensiert [30].

### Senkrechte Ausrichtung

Das *A-minor*-Motiv vermittelt die Wechselwirkung zwischen zwei Helices, indem ein ungepaartes Adenin der einen Helix über die 2'OH-Gruppe Wasserstoffbrücken zu der kleinen Furche der zweiten Helix ausbildet. Dabei nähern sich die Helices senkrecht zu einander. Nach der Analyse der Ribosom-Kristallstruktur wird zwischen vier *A-minor*-Motiv-Typen unterschieden [31].

## 1.2.4 Literatur

1. Altona C, Sundaralingam M. **1972**. *J. Am. Chem. Soc.* 94: 8205-12
2. Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore PB, Steitz TA. **2000**. *Science* 289: 905-20
3. Schneider B, Moravek Z, Berman HM. **2004**. *Nucleic Acids Res.* 32: 1666-77
4. Leontis NB, Westhof E. **2001**. *RNA* 7: 499-512
5. Serganov A, Huang L, Patel DJ. **2008**. *Nature* 455: 1263-7

6. Torres-Larios A, Dock-Bregeon A-C, Romby P, Rees B, Sankaranarayanan R, et al. **2002**. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 9: 343-7
7. Arnott S. 1999. In *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*, ed. S Neidle. Oxford: Oxford University Press
8. Zhang Q, Stelzer AC, Fisher CK, Al-Hashimi HM. **2007**. *Nature* 450: 1263-7
9. Tinoco I, Jr., and Bustamante, C. **1999**. *J. Mol. Biol.* 293: 271-81
10. Varani G. **1995**. 24: 379-404
11. Wolters J. **1992**. *Nucleic Acids Res.* 20: 1843-50
12. David J. Proctor JES, Joanne M. Bevilacqua, Christopher J. Falzone, and Philip C. Bevilacqua\*. **2002**. *Biochemistry* 41: 12062-75
13. Tuerk C, Gauss P, Thermes C, Groebe DR, Gayle M, et al. **1988**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1364-8
14. Tuerk C GP, Thermes C, Groebe DR, Gayle M, Guild N, Stormo G, d'Aubenton-Carafa Y, Uhlenbeck OC, Tinoco I Jr **1988**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1364-8
15. Jucker FM, Pardi A. **1995**. *Biochemistry* 34: 14416-27
16. Allain FH VG. **1995**. *J. Mol. Biol.* 250: 333-53
17. Ennifar E NA, Tishchenko S, Serganov A, Nevskaya N, Garber M, Ehresmann B, Ehresmann C, Nikonov S, Dumas P. **2000**. *J. Mol. Biol.* 304: 35-42
18. Pley HW, Flaherty KM, McKay DB. **1994**. *Nature* 372: 111-3
19. Chang KY, Tinoco I. **1994**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8705-9
20. Staple DW, Butcher SE. **2005**. *PLoS Biol* 3: e213
21. Theimer CA, Blois CA, Feigon J. **2005**. *Mol. Cell* 17: 671-82
22. Noller HF. **2005**. *Science* 309: 1508-14
23. Wimberly BT, Brodersen DE, Clemons WM, Morgan-Warren RJ, Carter AP, et al. **2000**. *Nature* 407: 327-39
24. Serganov A, Yuan Y-R, Pikovskaya O, Polonskaia A, Malinina L, et al. **2004**. *Chem.Biol.* 11: 1729-41
25. Chen J-L, Greider CW. **2005**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 8080-5
26. Tamura M, Holbrook SR. **2002**. *J. Mol. Biol.* 320: 455-74
27. Gate JH, Gooding AR, Podell E, Zhou KH, Golden BL, et al. **1996**. *Science* 273: 1696-9
28. Steinberg SV, Boutorine YI. **2007**. *RNA* 13: 549-54
29. Kim SH, Suddath FL, Quigley GJ, McPherson A, Sussman JL, et al. **1974**. *Science* 185: 435-40
30. Batey RT, Rambo RP, Doudna JA. **1999**. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38: 2326-43
31. Nissen P, Ippolito JA, Ban N, Moore PB, Steitz TA. **2001**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4899-903

## 1.3 RNA-Schalter: Mechanismus und Struktur

### 1.3.1 Geschichte

Anfang der 90er Jahre wurden durch *in vitro* Evolution im SELEX-Verfahren<sup>1</sup> so genannte RNA-Aptamere (kurze RNA-Moleküle) generiert, die in der Lage sind, kleine Moleküle wie Aminosäuren und andere Metaboliten spezifisch zu erkennen und mit hoher Affinität zu binden [1-5]. Diese Ergebnisse waren bahnbrechend, denn bis dahin wurde den RNA-Molekülen eine solche Fähigkeit nicht zugeschrieben.

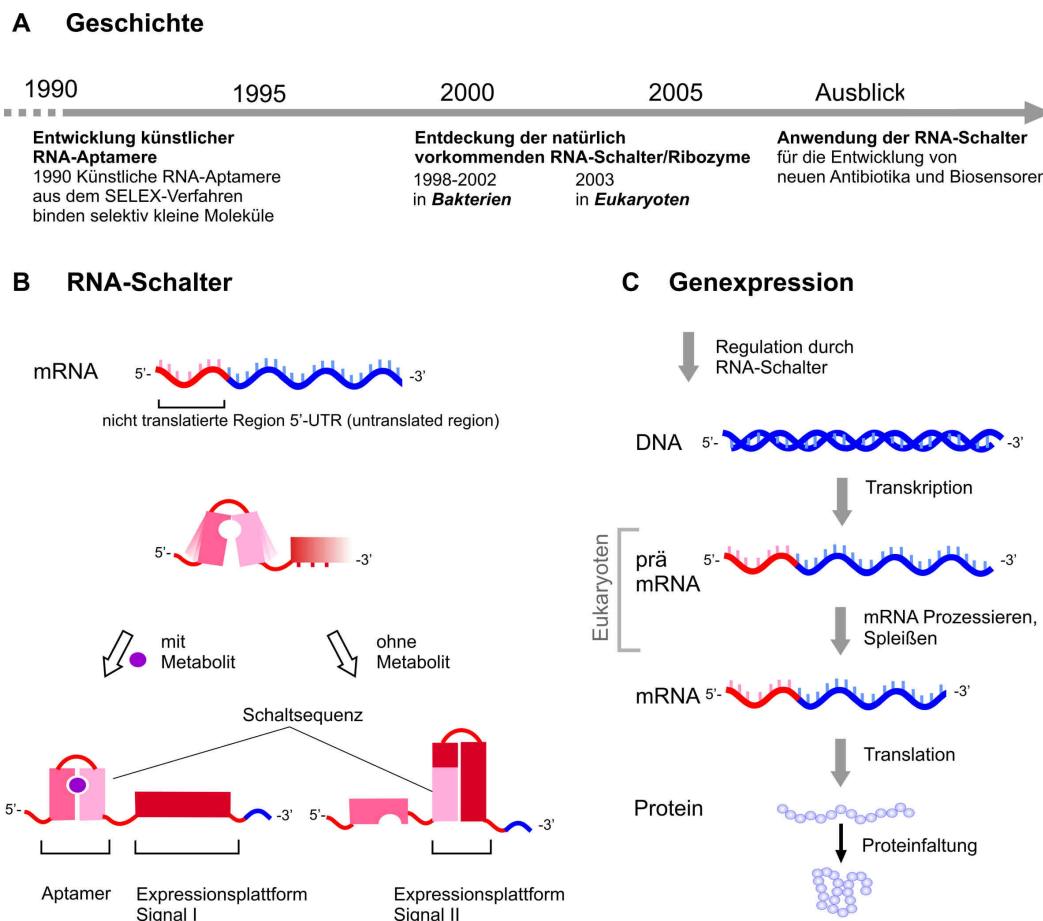


Abbildung 1-19: Geschichte und Funktion der RNA-Schalter im Überblick. A. Meilensteine der Forschung. B. Schematische Darstellung der RNA-Schalter-Funktion. RNA-Schalter befinden sich in dem 5' nicht-translatierten Bereich der mRNA und sind strukturell in zwei Domänen unterteilt: ligandbindende Aptamerdomäne und die Expressionsplattform. C. Verlauf der Genexpression. Graue Pfeile zeigen, auf welchen Stufen der Genexpression bisher gefundenen RNA-Schalter regulierend eingreifen.

<sup>1</sup> Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung

Zwar waren katalytische RNAs wie im Group-I-Intron und in der RNase H bekannt [6-7], aber als Metabolitrezeptoren innerhalb des Stoffwechsels wurden sie noch nicht entdeckt. Ebenso waren ausschließlich Proteine in den Regulationsmechanismen auf veränderte Umweltbedingungen und Metabolitverfügbarkeit bekannt; Hitzeschockproteine sind hierfür prominente Beispiele. Die Entwicklung künstlicher RNA-Aptamere war deshalb eine wichtige Voraussetzung für die darauffolgende Entdeckung von *Riboswitch*-RNAs (RNA-Schalter). In den Jahren von 1998 bis 2001 wurden Arbeiten veröffentlicht, die einen neuen Regulationsmechanismus unter Beteiligung konservierter Bereiche der mRNA aufdeckten [8-11]. Die Forscher vermuteten in diesen Bereichen regulierende Strukturelemente und spekulierten, ob einzelne Metaboliten die Effektoren sein könnten, weil sie keine beteiligten Proteine isolieren konnten.

Im Jahr 2000 zeigten Nou und Kadner, dass die Translation der mRNA tatsächlich nur durch die Anwesenheit von Koenzym B<sub>12</sub> reguliert wird [10]. Einen genauen Mechanismus konnten sie zu dem Zeitpunkt nicht ableiten, postulierten aber Metabolit-sensorische mRNA-Strukturen, vergleichbar den RNA-Aptameren, wie sie im SELEX-Verfahren generiert wurden. Auf diesen Ergebnissen aufbauend, begann in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Breaker die Erforschung des neuen, unbekanntem Regulationsmechanismus. Er und seine Mitarbeiter zeigten im Jahr 2002 zum ersten Mal, dass bei der direkten Wechselwirkung zwischen Koenzym B<sub>12</sub> mit der mRNA ein allosterischer Mechanismus ohne Beteiligung von Proteinen zu Grunde liegt (Abbildung 1-19) [12]. Insbesondere mit der Methode „*in-line probing*“ konnten sie sowohl die durch die Bindung des Metaboliten an die mRNA induzierten strukturellen Änderungen nachweisen als auch die Bindungskonstanten bestimmen [13-14]. Breaker und seine Mitarbeiter prägten den Begriff „*riboswitch*“, klärten den neuen Regulationsmechanismus auf und identifizierten in kürzester Zeit eine Vielzahl von RNA-Schaltern in Bakterien, Archaeen und in Eukaryoten [15-18].

### 1.3.2 Verwendung der RNA-Schalter

Die Kenntnis über die weite Verbreitung der RNA-Schalter in pathogenen Bakterien hat sehr früh zu der Idee angeregt, diese als Target für die Entwicklung neuartiger Antibiotika zu verwenden [19] (Aktueller Übersichtsartikel:[20]). Tatsächlich haben sich bereits eingesetzte Antibiotika mit einem zuvor unbekanntem Wirkmechanismus als Inhibitoren der RNA-Schalter erwiesen [19]. Die Entwicklung neuer RNA-Schalter-Inhibitoren, sowohl mit dem Ansatz der Hochdurchsatzsuche als auch dem rationalen Design, hat bereits zu den ersten erfolgreichen *in vivo*-Testergebnissen mit *S.aureus*-infizierte Mäusen geführt [21-22]. Auf diesem Gebiet können deshalb in naher Zukunft entscheidende Fortschritte erwartet werden.

Eine weitere Verwendungsmöglichkeit der RNA-Schalter findet sich in der Entwicklung neuer *in vivo* und *in vitro* Biosensoren. Mit dem SELEX-Verfahren und rationalem Design konnten bereits neue Aptamere bzw. RNA-Schalter entwickelt werden [23-24].

### 1.3.3 Regulationsmechanismen und Vorkommen der RNA-Schalter

Die Regulation der Genexpression innerhalb der Zelle findet meist im frühen Stadium auf der Ebene der Transkriptionsinitiation statt. Es sind zudem weitere Mechanismen bekannt, die erst später bei der Transkription, dem Prozessieren der mRNA oder der Translation ansetzen und auf der Modulation der mRNA-Struktur und -Stabilität basieren. Diese können durch verschiedene zelluläre Komponenten oder physikalische Reize ausgelöst werden. Die folgende Auflistung gibt einen Überblick der bekannten Effektoren:

- 1) Ribosom (Transkriptionsattenuation)
- 2) Proteine
- 3) tRNA (T-Box)
- 4) Temperatur (Thermometer)
- 5) nicht kodierende RNA (RNA-Interferenz)
- 6) Metaboliten (RNA-Schalter)

(Weiterführende Informationen finden sich in den folgenden Übersichtsartikeln: [25-28])

Im Weiteren soll auf die Regulation durch RNA-Schalter eingegangen werden.

RNA-Schalter sind Bestandteile einer mRNA, die eine räumliche Struktur aufweisen (Abbildung 1-19). In Wechselwirkung mit einem Metaboliten können sie die Regulation der nachfolgenden Gene ohne eine weitere Beteiligung von Proteinen übernehmen [17, 29]. Die meisten RNA-Schalter befinden sich in der 5' nicht-translatierten Region (5'-UTR, *untranslated region*) der mRNA und werden in zwei funktionelle Domänen unterteilt [17]. Während der Transkription wird zuerst die **Aptamerdomäne** synthetisiert, die den Liganden erkennt und mit hoher Affinität bindet. Die dadurch eingeleitete strukturelle Umorientierung der darauffolgenden **Expressionsplattform** transferiert ein Signal an die weitere Genexpression. Generell können RNA-Schalter infolge der Ligandbindung sowohl eine positive als auch negative Rückkopplung an das involvierte Gen, das in die Biosynthese, den Metabolismus oder den Transport des Metabolit-Liganden involviert sein kann, vermitteln.

Der Schaltmechanismus basiert auf der Tatsache, dass beide Strukturdomänen um einen Teil der Sequenz – „**Schaltsequenz**“ – konkurrieren und die Lage dieses Gleichgewichts durch die Anwesenheit des Liganden bestimmt wird. Der Ligand stabilisiert die Aptamerdomäne in den meisten Fällen durch eine direkte Interaktion mit der Schaltsequenz, so dass diese nicht in die Expressionsplattform einbezogen werden kann. In der Ligand-freien Form kann die Expressionsplattform eine Sekundärstruktur mit der eingebundenen Schaltsequenz verwirklichen. Bisher bekannte RNA-Schalter sind in allen Stufen der Genexpression vertreten und wurden in allen drei Domänen des Lebens (Bakterien,

Archaeen, Eukaryoten) nachgewiesen [29]. Die große Mehrzahl wurde in Bakterien identifiziert, wie z.B. im *B. Subtilus*, wo 4% der Genexpression über RNA-Schalter reguliert werden [26].

RNA-Schalter werden nach dem Typ des agierenden Liganden und der globalen Architektur unterschieden. Gegenwärtig sind 15 verschiedene Metaboliten bekannt, die in die RNA-Schalter-Funktion involviert sind:

Aminosäuren:	Lysin und Glycin
Nukleotid-Präkursoren:	Adenin (Ade), Guanin (Gua), Pre-Queuosine <sub>1</sub> (preQ <sub>1</sub> ), 2'-Deoxyguanosin (2'-dG), Hypoxantin (Hyp)
Enzym-Kofaktoren:	Vitamin B <sub>12</sub> , S-Adenosylmethionin (SAM), S-Adosylhomocystein (SAH), Flavinmononukleotid (FMN), Folsäure-Derivate (z.B. Tetrahydrofuran (THF)), Thymianpyrophosphat (TPP)
Sekundäre Botenstoffe:	zyklisches Diguanosinmonophosphat (c-di-GMP)
Metall-Kation:	Mg <sup>2+</sup>

Ein Beispiel für die Auffächerung in Unterklassen aufgrund der strukturellen Architektur findet sich beim SAM-vermittelten RNA-Schalter, der durch fünf Konstrukte (SAM-I-V, Tabelle 1-5), die sich in Länge, Sequenz und Faltung unterscheiden, vertreten ist. Dagegen zeigen Aptamerdomänen für die unterschiedlichen Liganden Adenin, Guanin und 2'-dG den gleichen globalen Aufbau, die sogenannte *A/G-Box* [15]. RNA-Schalter variieren in der Länge von 34 bis 230 Nukleotiden und verfügen über Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) im nM-Bereich. In ihrer Fähigkeit zur spezifischen Liganderkennung stehen sie demnach den Proteinen in nichts nach.

Die kürzliche Untersuchung des Genom von ungefähr 700 Bakterienarten nach Vorkommen von RNA-Schaltern lässt die folgende Reihung nach Häufigkeit zu [30]:

TPP > B12 > SAM-I, -IV > FMN > Lysin > Glycin > Gua, Ade, 2'-dG, Hyp > c-di-GMP > preQ1 > GlcN6P > SAM-II, V > SAH > SAM-III > preQ1-II

Es werden sechs Mechanismen der RNA-Schalter-Funktion unterschieden:

Bei der Regulation auf der **Transkriptionsebene** bildet sich in Abhängigkeit von dem Liganden in der Expressionsplattform eine stabile Haarschleifenstruktur aus, der sogenannte *Transkriptions-terminator*. Dieser kann durch sterische Hinderung die Polymerase von der mRNA abstreifen und die weitere Transkription irreversibel abbrechen [31-33]. Die Ausbildung eines Transkriptions-terminators als Stoppsignal ist bereits aus anderen Genregulationsmechanismen durch Modulation der RNA-Struktur bekannt [28]. RNA-Schalter mit der gleichen Ligand-Spezifität regulieren verschiedene Gene und sind bekannt als AN- so wie AUS-Schalter. Dabei bleibt die Ligand-spezifische Aptamerdomäne global identisch, während die Expressionsplattform vollständig variiert.

RNA-Schalter, die auf der **Translationsebene** wirksam werden, enthalten die ribosomale Bindungsstelle, *Shine-Dalgarno* (SD)-Sequenz [34] innerhalb der Expressionsplattform [33]. Je nach Verfügbar-



keit des Metaboliten und Lage des strukturellen Gleichgewichts kann die SD-Sequenz in eine stabile Sekundärstruktur involviert sein. Durch die Ausbildung stabiler Wasserstoffbrücken wird sie maskiert und kann vom Ribosomkomplex nicht gebunden werden. Folglich kann die Translation nicht initiiert werden.

Der Thymianpyrophosphat(TPP)-bindende RNA-Schalter wurde bisher als einziger in **Eukaryoten** entdeckt und befindet sich innerhalb des Introns der entsprechenden mRNA [16]. Er sorgt dort für einen alternativen **Spleißvorgang**, indem er Spleißstellen infolge der strukturellen Änderung maskiert bzw. freigibt.

Einen Sonderfall unter den RNA-Schaltern stellt der Glucoseamin-6-Phosphat(GlcN6P)-vermittelte RNA-Schalter dar, weil er durch die Bindung des Liganden keine konformationelle Änderung bewirkt, sondern eine **katalytische** Aktivität im Sinne eines **Ribozyms** entwickelt, sich selbst spaltet und so die Genexpression moduliert [35-36].

Die kürzliche Entdeckung einer weiteren unerwarteten Form der RNA-Schalter zeugt von den komplexen Vorgängen der Genregulation, in die die RNA-Struktur direkt involviert sein kann. Es handelt sich um einen **trans-agierenden RNA-Schalter**, der eine andere mRNA durch **RNA-Interferenz** bindet und so die Translation inhibiert [37].

Die Vielfältigkeit und Tendenz zur Komplexität der RNA-Schalter-Funktion zeigt sich weiterhin bei mRNAs, die nicht nur einen, sondern zwei RNA-Schalter enthalten (**Tandem-RNA-Schalter**) [38]. Das gefundene Gen enthält zwei SAM-bindende RNA-Schalter (SAM-II, SAM-V) in ihrer vollen Länge. Der erste agiert während der Transkription, der zweite dagegen während der Translation (**Duale Regulation**) [39]. Beim Glycin-RNA-Schalter führt die Kopplung von zwei Aptamerdomänen zu einem kooperativen Bindungsvorgang, der die regulative Reaktion beschleunigt [40]. Des Weiteren wurde in *B.clausii* ein Gen gefunden, der gleich zwei vollständige RNA-Schalter für die Metaboliten SAM und Vitamin B<sub>12</sub> eingebaut hat. In diesem Fall sind sie unabhängig voneinander und dienen einer differenzierten Antwort auf Metabolitverfügbarkeit [40].

Eine Zusammenstellung bekannter RNA-Schalter, ihrer Liganden, der K<sub>D</sub>-Werte und Längen ihrer Aptamerdomänen, veröffentlichte 3D-Strukturen sowie die relevanten Referenzen sind in der Tabelle 1-5 zusammengefasst.

Tabelle 1-5a: Bekannte RNA-Schalter. Fortsetzung der Tabelle (1-5b) mit Strukturen folgt auf der nächsten Seite.

RNA-Schalter			Aptamerdomäne		
Metabolit/Ligand	Literatur	Dissoziationskonstante $K_D$	Länge (nt)	Struktur Pdb-Code	Literatur
Gua (Guanin)	[15, 32, 41]	5 nM (G)	80	1Y26 <sup>a)</sup> , 3RKF	[42], [43]
Ade (Adenin)		300 nM (A)		1Y27 <sup>b)</sup>	[42]
2'-dG (2'-Deoxyguanosin)		80 nM (2-dG)		3DS7 <sup>c)</sup>	[44]
preQ <sub>1</sub> -I (pre-Queuosine <sub>1</sub> )	[45]	20 nM	34	3FU2 <sup>d)</sup>	[46]
preQ <sub>1</sub> -II (pre-Queuosine <sub>1</sub> )	[48-49]	100 nM		2L1V <sup>e)</sup>	[47]
c-di-GMP (zyklisches Diguanosinmonophosphat)	[50]	~ 10 nM	92	/	[51]
TPP (Thiamindiphosphat)	[16, 52]	50 – 600 nM	77-80	2GDI <sup>f)</sup>	[53]
				2CKY <sup>g)</sup>	[54]
Lysin	[55]	~ 1000 nM	174	3DIL (apo)	[56]
				3DIS (holo) <sup>h)</sup>	
FMN (Flavinmononucleotid)	[57]	< 10 nM	112	3F2Q	[58]
Mg <sup>2+</sup> (Magnesiumkation)	[35, 59]	~ 0.56 mM	161	2QBZ <sup>i)</sup>	[59]
SAH (S-Adenosylhomocystein)	[60]	20 nM	54	3NPN/3NPQ	[61]
GlcN6P (Glucoseamin-6-phosphat)	[35, 62]	Ribozym	125	2Z75	[63]
SAM-I (S-Adosylmethionin) <sup>j)</sup>	[64]	5 nM	94	2GIS	[65]
SAM-II	[66]	1000 nM	52	2QWY	[67]
SAM-III	[68]	n.d.	53	3E5C	[69]
SAM-IV <sup>k)</sup>	[70]	150 nM	132	/	
SAM-V <sup>k)</sup>	[71]	15 – 150 µM	70	/	
Koenzym B <sub>12</sub> (Cobalamin) <sup>k)</sup>	[10, 12]	300 nM	202	/	
Glycin <sup>k)</sup>	[72-73]	20 - 30 µM	158- 226	/	
THF (Tetrahydrofolsäure)/ Folsäure <sup>k)</sup>	[74]	70 nM		/	
Moco (Molybdäncofactor) <sup>k), l)</sup>	[75]	n.d.		/	

a) Abgebildete Struktur ist die Aptamerdomäne des Adenin-bindenden RNA-Schalters aus *Vibrio vulnificus* im Komplex mit Adenin. Die Kristallstruktur des Guanin- und 2'-dG-RNA-Komplexe zeigen eine sehr ähnliche globale Struktur.

b) Kristallstruktur des Guanin-RNA-Komplexes.

c) Kristallstruktur des 2-dG-RNA-Komplexes.

d) Kristallstruktur ist in der Tabelle 1-5b oben abgebildet.

e) NMR-Lösungsstrukturbündel ist in der Tabelle 1-5b unten abgebildet.

f) TPP-RNA-Schalter aus *E. Coli*. (Bakterien).

g) TPP-RNA-Schalter aus *Arabidopsis* (Eukaryoten).

h) Überlagerung der Kristallstrukturen mit und ohne Lysin.

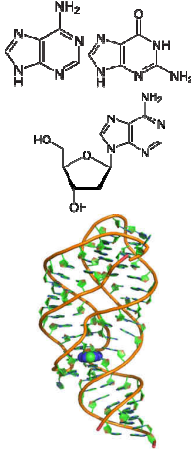
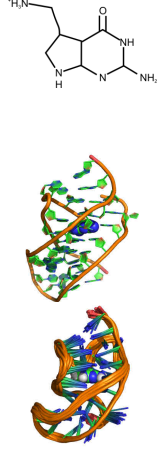
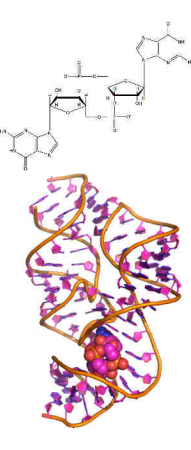
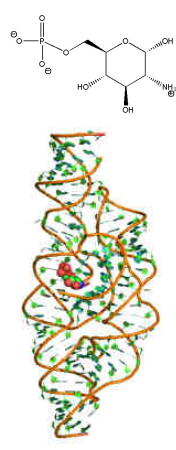

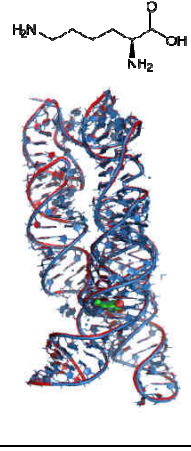
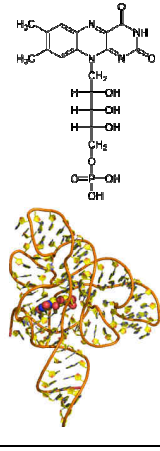
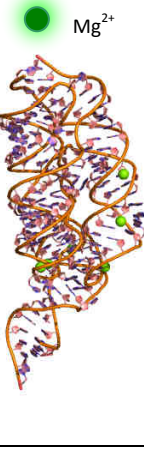
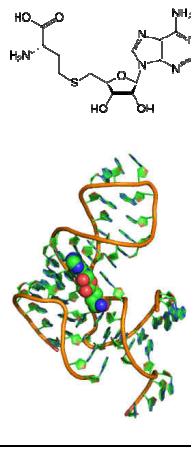
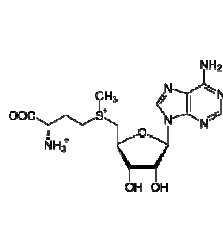
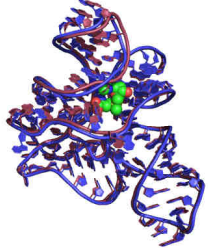
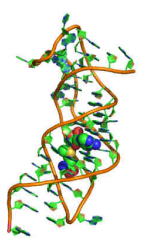
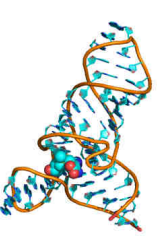
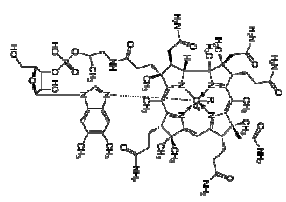
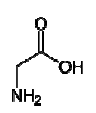
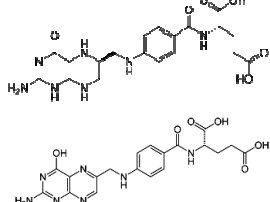
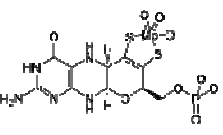
i) Magnesium-Kation ist als grüne Kugel dargestellt.

j) Überlagerung der Kristallstrukturen mit und ohne SAM.

k) Keine Struktur gelöst.

l) Potenzieller RNA-Schalter.

Tabelle 1-5b: Chemische Struktur der Liganden und dreidimensionale Struktur der Aptamerdomänen von RNA-Schaltern.

Guanin, Adenin <sup>a)</sup> , 2-Deoxy-guanosin	preQ <sub>1</sub> -I <sup>d, e)</sup>	c-di-GMP	(GlcN6P)	TPP <sup>f)</sup>
				
Lysin <sup>h)</sup>	FMN	Magnesium <sup>i)</sup> Mg <sup>2+</sup>	SAH	
				
SAM	SAM-I <sup>j)</sup>	SAM-II	SAM-III	
				
Koenzym B <sub>12</sub> <sup>k)</sup>	Glycin <sup>k)</sup>	THF <sup>k)</sup>	Moco <sup>k), l)</sup>	
				

### 1.3.4 Struktur und Bindungsmodus der Ligand-gebunden Aptamerdomänen der RNA-Schalter

Die in der Tabelle 1-5b abgebildeten Kristallstrukturen der bisher gelösten RNA-Ligand-Komplexe verdeutlichen, welche strukturelle Komplexität von sowohl kurzen (34 nt, preQ<sub>1</sub>) als auch langen (174 nt, Lysin) Konstrukten erlangt werden kann. Die Liganden werden meist mittig in den generell kompakten Strukturen eingebettet und sind im Durchschnitt zu über 90% vom Lösungsmittel abgeschirmt [76]. Eine solche kompakte Struktur wird im Allgemeinen durch eine dichte Anordnung der helikalen Elemente erreicht. Bei der Betrachtung der Sekundärstrukturen ist zu erkennen, dass die Mehrzahl der Aptamerdomänen nach dem Prinzip der *Mehrwegekreuzung* aufgebaut ist (Abbildung 1-20).

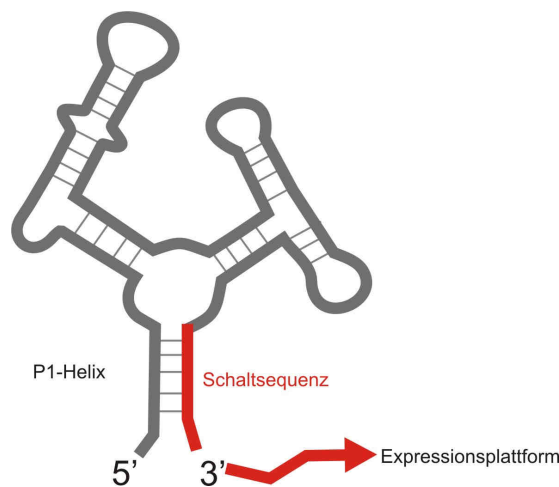


Abbildung 1-20: Schematische Darstellung einer typischen Aptamerdomäne in Form einer Mehrwegekreuzung.

Charakteristisch hierbei ist, dass die Aptamerdomänen eine geschlossene Sekundärstruktur formen, indem das 5'- und 3'-Ende über die Ausbildung einer Helixstruktur (P1) zusammengeführt werden. Aus der Mehrwegekreuzung verzweigen sich Haarnadelstrukturen, die unterschiedlich lang sein können und wiederholt von internen Schlaufen und Ausbuchtungen unterbrochen werden, so dass verwinkelte Doppelstrangbereiche von drei bis sieben Basenpaaren verbleiben. Eine Ausnahme in der Länge der Haarnadel stellt der Lysin-vermittelte RNA-Schalter (174 nt) mit einer Haarnadel bestehend aus 12 Basenpaaren dar. Hier sorgt ein Knick-Dreh-Motiv (*kink-turn*) für eine Wendung der Haarschleifenstruktur, welche erst eine wichtige tertiäre Wechselwirkung ermöglicht [56]. Insbesondere die Nukleotide innerhalb der Schlaufen und Ausbuchtungen sorgen über weitreichende elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen für den Zusammenhalt der Tertiärstruktur. Sie bilden sowohl kanonische und als auch nicht-kanonische Struktur motive, wie beispielsweise Basentriplett oder -quadrupel in A-RNA-Schaltern [42, 77]. Zu den besonderen Struktur motiven der RNA-Schalter gehören außerdem *Sarcin-ricin-Loops* [78], *T-Loops* [79], und Pseudoknoten [80]. Helikale Elemente sind häufig entweder koaxial gestapelt oder parallel ausgerichtet. Die parallele Annäherung zweier

Helices führt zu abstoßenden Kräften zwischen den negativ geladenen Phosphatrückgraten, die häufig durch die Einbindung von Metallkationen kompensiert werden. Im TPP-, FMN- oder Lysin-RNA-Schalter sind  $Mg^{2+}$ -Kationen ein integraler Bestandteil der Bindungstasche, weil sie die Interaktion zwischen der RNA und dem Ligand vermitteln.

RNA-Schalter dienen als Rezeptoren niedermolekularer Metaboliten und sind in der Lage, zwischen chemisch verwandten Verbindungen wie Adenin und Guanin zu unterscheiden [42]. Bisher wird angenommen, dass sie die hohe Spezifität und Affinität erreichen, indem sie möglichst alle funktionellen Gruppen der Liganden erkennen und über Wasserstoffbrücken koordinieren.

Am Beispiel eines Adenin-RNA-Schalters soll der Bindungsmodus einer Aptamerdomäne verdeutlicht werden (Abbildung 1-21) [42].

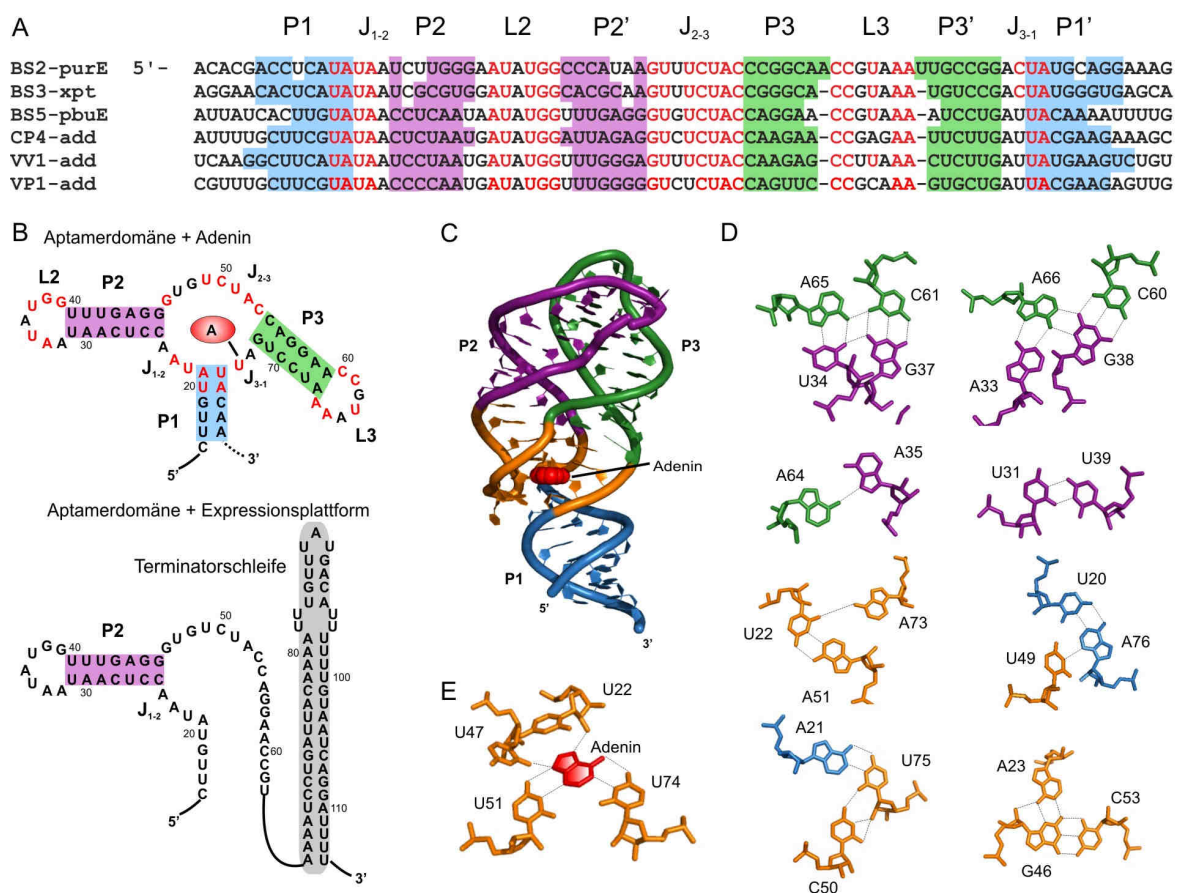


Abbildung 1-21: Adenin- und Guanin-bindende RNA-Schalter. A. Sequenz von zwei G- und vier A-bindenden Aptamerdomänen (A-/G-Box) aus verschiedenen Genen, die links notiert sind. Der farbliche Hintergrund hebt die Helices P1 (blau), P2 (violett) und P3 (grün) hervor. L2 und L3 sind die Schleifen der Haarnadel P2 und P3. Interhelikale Verbindungssequenzen sind als J<sub>1-2</sub>, J<sub>2-3</sub>, J<sub>3-1</sub> gekennzeichnet. B. Sekundärstruktur der Aptamerdomäne und volle Länge des *pbuE* RNA-Schalters. In der vollen Länge bildet sich in Abwesenheit des Liganden die Terminatorschleife aus (grau hinterlegt). C. Kristallstruktur der Aptamerdomäne des *VV1-add* RNA-Schalters im Komplex mit Adenin. E. Ausschnitt aus der Bindungstasche mit Nucleotiden, die Adenin koordinieren. D. Wichtige tertiäre Wechselwirkungen in der Kristallstruktur.

Adenin wird in der Mitte der Dreiwegekreuzung von vier Nukleotiden (U22, U47, U51, U74) der drei Scharniersequenzen ( $J_{1-2}$ ,  $J_{2-3}$ ,  $J_{3-1}$ ) gebunden. Dabei entstehen sechs Wasserstoffbrücken zu den Heteroatomen des Adenins, unter anderem aus einer Wechselwirkung zu einer 2'OH-Gruppe des Ribosezuckers vom Rest U47 und einer Watson-Crick-Basenpaarung mit U74. An dieser Position findet sich im Guanin-RNA-Schalter ein Cytosin (C74), der die Erkennung des Guanins gewährleistet. Das RNA-Ligand-Komplex wird weiterhin durch Stapelwechselwirkungen zwischen dem Adenin und den darüber- und darunter liegenden Basentriplett A52-U22•A73 und A21-U75•C50 stabilisiert.

### 1.3.5 Kopplung zwischen Struktur und Funktion: *Ligand-induzierte Faltung*

Die Kristallstrukturen der RNA-Schalter im Komplex mit den Liganden erlauben Einblicke in die atomare Erkennung des Liganden und beeindrucken durch die für RNA unerwartete Komplexität und Kompaktheit der Bindungstasche, mit welcher sie den Liganden binden und im Durchschnitt zu über 90% vom Lösungsmittel abschirmen. Die Kristallstrukturen der freien Aptamerdomänen der Lysin- und SAM-bindenden RNA-Schalter (Tabelle 1-5b) sind die bisher einzigen gelösten Strukturen freier Aptamerdomänen. Die Überlagerung der freien und gebundenen Aptamerstrukturen zeigt aber, dass die Strukturen nahezu identisch sind [56]. In einer solchen Konformation der freien Aptamerdomäne wäre jedoch die Bindungstasche für den Liganden (wegen der zu kleinen Lösungsmitteloberfläche) nicht zugänglich. Aus diesem Grund ist die Betrachtung der freien RNA und der Ligand-induzierten Faltung in Lösung ebenso essenziell für das Verständnis der RNA-Schalter-Funktion, wie die des gebundenen Komplexes in der Kristallstruktur.

Es wird angenommen, dass die freie Aptamerdomäne eine flexible Struktur darstellt, die dem Liganden einen Zugang gewähren kann. Die Funktion der RNA-Schalter erfordert, dass eine vorstrukturierte Aptamerdomäne in der freien Form vorliegt, die den Liganden aufnehmen, aber gleichzeitig eine sowohl spezifische als auch präzise strukturelle Änderung vollziehen kann.

Montagne und Batey haben in diesem Zusammenhang die Struktur und Schaltmechanismen bekannter RNA-Schalter verglichen und in zwei Typen unterteilt [81].

RNA-Schalter des **Typ I** (z.B.: Lysin, Adenin, Guanin, 2-dG, Glms, SAM-II, Tabelle 1-5) weisen in der freien Form eine bereits global vorstrukturierte Aptamerdomäne mit einer Bindungstasche, die sich innerhalb der Mehrwegekreuzung befindet und weitgehend flexibel ist. Infolge der Ligandbindung werden stabilisierende Wechselwirkungen zwischen dem Liganden und der RNA ausgebildet. Somit formt sich eine strukturell definierte Bindungstasche. Die Reduktion der strukturellen Dynamik hat außerdem zur Folge, dass bestehende tertiäre Wechselwirkungen, wie Schlaufeninteraktionen, besser etabliert werden können. Ein Beispiel für den Typ I ist der Adenin-bindende RNA-Schalter. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass in der freien Form die Sekundärstrukturen P1, P2, P3 ausgebildet sind, während die Bindungstasche flexibel ist [82-83]. Die Ligandbindung erzeugt eine Ver-

dichtung der Wechselwirkungen und schafft eine definierte Bindungstasche, die durch zusätzliche Iminosignale in NMR-Spektren detektierbar wird. Außerdem wird der distale L2-L3-Schlaufenkontakt stabilisiert.

Der **Typ II** RNA-Schalter (z.B.: TPP, SAM-I,  $Mg^{2+}$ , Tabelle 1-5) unterscheidet sich von Typ I dadurch, dass die Bindungstasche von mehreren Untereinheiten der Aptamerdomäne, die sich in der freien Form von einander entfernen, definiert wird. Erst durch die Wechselwirkung mit dem Liganden werden, wie z.B. im TPP-bindenden RNA-Schalter, Helix-Strukturen parallel ausgerichtet und die Bindungstasche geschlossen. Durch die Annäherung der Helices kann darauffolgend ein weiterer stabilisierender Kontakt zwischen einer Schlaufe und einer Helix entstehen [52-53]. Demnach werden beim Typ II sowohl lokale als auch globale strukturelle Änderungen vorgenommen, um die Bindungstasche zu formen.

### 1.3.6 Wettlauf mit der Transkription - Zeitliche Aspekte der Ligand-Bindung und RNA-Faltung

Die große Mehrzahl der bakteriellen RNA-Schalter ist auf der Ebene der Transkription wirksam und kann durch die Ausbildung einer Terminatorschleife innerhalb der Expressionsplattform die Polymerase von der mRNA abtrennen [29-30, 84]. Die Interaktion zwischen der Terminatorschleife und der Polymerase kann während der Synthese des RNA-Schalters stattfinden. Das zeitliche Fenster für die genetische Entscheidung ist definiert durch den Startpunkt, ab dem eine Ligand-bindungskompetente Struktur synthetisiert wurde, und dem Endpunkt, an dem die Polymerase das Ende des RNA-Schalters erreicht hat. Kinetische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Geschwindigkeiten der RNA-Faltung [83, 85] und der Ligandbindung [86] der Größenordnung der Transkription [87] entsprechen und deshalb miteinander konkurrieren. Die Frage, ob für die Bindung des Liganden genügend Zeit für das Einstellen des thermodynamischen Gleichgewichts zur Verfügung steht, hängt daher von der entsprechenden Sequenzlänge, der Polymerase- und Faltungsgeschwindigkeit ab. Ist der Endpunkt erreicht, bevor ein thermodynamisches Gleichgewicht erreicht werden kann, so handelt es sich um eine **kinetisch kontrollierte** Regulation. Tatsächlich wurden für RNA-Schalter Assoziationsgeschwindigkeiten gemessen, die weit unter der Diffusionskontrolle liegen [87]. Welcher Anteil der mRNA innerhalb dieses Zeitfensters den Liganden gebunden hat, wird deshalb nicht durch die Diffusions- oder Dissoziationskonstante  $K_D$  bestimmt, sondern primär durch die Assoziationsgeschwindigkeit. Wenn die Assoziationsgeschwindigkeit relativ zur Transkription langsam ist, hat dies zur Folge, dass eine höhere Konzentration des Liganden für die Funktion erforderlich ist, als sie vom  $K_D$ -Wert aus notwendig wäre. Genau dieser Zusammenhang wurde bei mehreren RNA-Schaltern festgestellt [55, 64, 87-88]. Die Untersuchungen von Wickiser et al. konnten zeigen, dass es innerhalb der Zelle zwei Hauptprozesse gibt, die die Transkription und damit das Zeitfenster stark beeinflussen können [87]. Im FMN-bindenden RNA-Schalter befindet sich nach der Aptamerdomäne ein bestimmter Se-

quenzbereich (meist U-reiche Abschnitte), der dafür sorgt, dass die Transkription verlangsamt bzw. angehalten wird (*pause site*). Bei den FMN- und Adenin-bindenden RNA-Schaltern wurde außerdem der kompensierende Einfluss des Transkriptionsfaktors *NusA* nachgewiesen [87, 89]. Durch beide Wirkmechanismen (*pause site* und Transkriptionsfaktoren) wird sowohl der RNA-Faltung als auch der Ligandbindung mehr Zeit zur Verfügung gestellt und die benötigte Ligand-Konzentration erniedrigt. Des Weiteren kann die Konzentration der NTPs und von Magnesiumionen den Prozess der Transkription und RNA-Faltung stark beeinflussen [87].

### 1.3.7 Purin-bindende RNA-Schalter – Stand der Forschung

Purin-bindende Aptamerdomänen haben sich für die Untersuchung der strukturellen und dynamischen Aspekte der RNA-Schalter als geeignete Modelle etabliert, weil sie aufgrund ihrer Molekülgröße für die meisten biophysikalischen Methoden gut zugänglich sind.

Mit Mutationsstudien konnte bestätigt werden, dass für die feste und spezifische Bindung des Liganden die konservierten Nukleotide innerhalb der A/G-Box verantwortlich sind und Schlüsselinteraktionen vermitteln (Abbildung 1-21) [15, 90-92]. Außerdem wurde gezeigt, dass tertiäre Wechselwirkungen zwischen den konservierten Nukleotiden innerhalb der Schleifen L2 und L3, obwohl sie weit von der Bindungstasche entfernt sind, einen entscheidenden Einfluss auf die Bindungsstärke und -kinetik nehmen [82, 91, 93]. Mittels NMR-Spektroskopie wurde ermittelt, dass die Bindungstasche in der freien Form weitgehend flexibel ist und erst durch den Liganden in eine definierte Struktur überführt wird [82].

Durch die Untersuchung von Austauschprozessen wurde weiterhin nachvollzogen, dass der Vorgang der Bindung in zwei Phasen unterteilt werden kann [83]. In der ersten Phase erfolgt eine unspezifische Kontaktaufnahme zwischen dem Liganden und der RNA. Diese wurde beim Guanin-RNA-Schalter sowohl mit Adenin als auch Hypoxantin (Analogon von Guanin) als Liganden beobachtet. Die spezifische Bindung von Hypoxantin erfolgt erst im zweiten Schritt und leitet die Umfaltung der kompletten Aptamerdomäne ein.

Insbesondere die Transkription-regulierenden RNA-Schalter erfordern eine feine Synchronisierung der parallelen Vorgänge der Ligandbindung und der RNA-Faltung. Mit besonderem Interesse wurde deshalb die Hierarchie der Faltung der freien Aptamerdomänen der Adenin- und Guanin-RNA-Schalter untersucht. Im aktuellen Übersichtsartikel von Garst et al. (2010) wurden die Ergebnisse bisheriger Studien zusammengefasst und daraus die Gemeinsamkeiten und Unterschiede abgeleitet (Abbildung 1-22) [94].



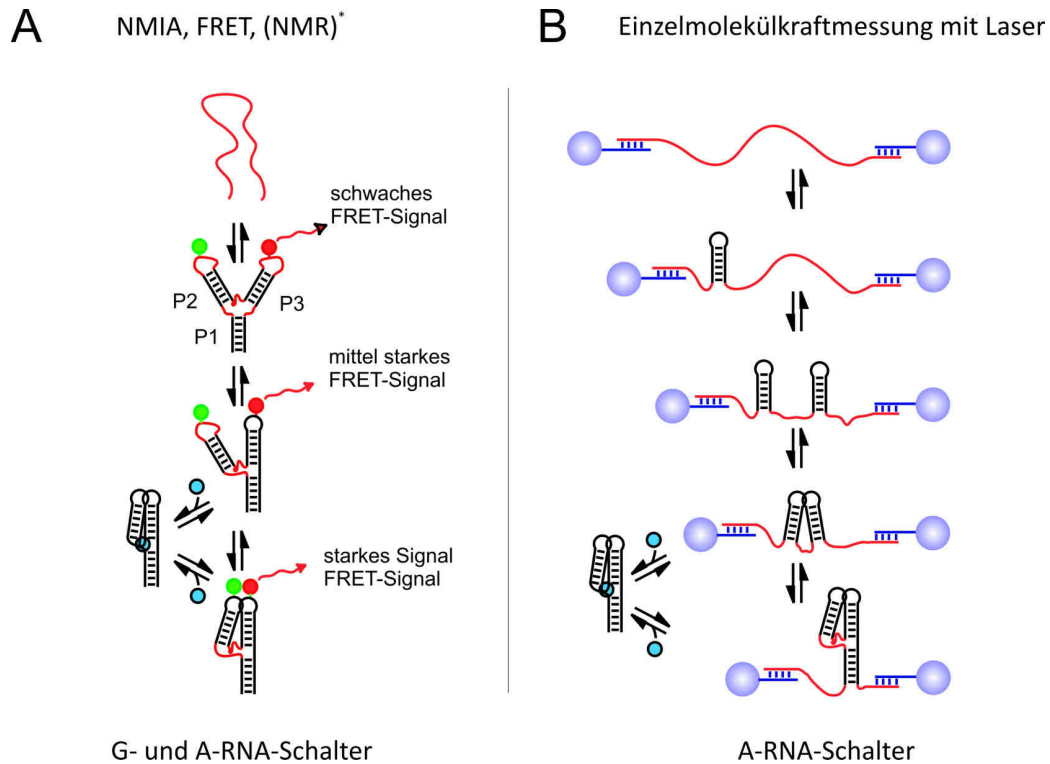


Abbildung 1-22: Die Faltung der freien und gebundenen Aptamerdomäne der A- und G-RNA-Schalter. Untersuchungen wurden mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt: A. NMIA (*xpt-pbuX* G-Switch)[95]; FRET (*add* und *pbuE* A-Switch)[90]; NMR (*xpt-pbuX* G-Switch, *pbuE* A-Switch)[82, 96]. B. Einzelmolekülkraftmessung (*pbuE* A-Switch) [85]. Die Abbildung wurde übernommen aus dem Übersichtsartikel von Garst et al., 2010. (\*nicht im Übersichtsartikel angeführt).

Abbildung 1-22 A:

Die Untersuchungen mittels chemischer Analyse (NMIA, *N-methylisatoic anhydride*) [95] und Einzelmolekül-FRET<sup>1</sup> (smFRET, single molecule FRET) [90] liefert ein Bild der Hierarchie im klassischen Sinne. In der freien Form der Purin-bindenden Aptamerdomäne werden zuerst alle Sekundärstrukturen (P1, P2, P3) ausgebildet, bevor anschließend tertiäre Wechselwirkungen zwischen den Schlaufen L2 und L3 eintreten. Diese sind in der freien Form weniger stabil und können nur bei tiefen Temperaturen und/oder hoher Magnesiumkonzentration gefestigt werden. Bisherige NMR-spektroskopische Untersuchungen stimmen mit diesen Ergebnissen überein [82-83, 96]. In NMR-Spektren konnten die gleichen Einflüsse durch Temperaturerhöhung und Magnesiumzugabe orts aufgelöst verfolgt werden. Für den G-RNA-Schalter dagegen wird eine stabile Schlaufenwechselwirkung bereits ohne Magnesium beobachtet. In smFRET wird die globale Struktur mit tertiären Strukturelementen als Intermediat identifiziert [90].

<sup>1</sup> Förster-Floureszenzenergietransfer

Abbildung 1-22 B:

Mit der neuen Methode der Einzelmolekülkraftmessung mittels einer Laserpinzette wurden gegensätzliche Ergebnisse erzielt. Die Methode ermöglicht es, die RNA-Faltung während der Transkription zu detektieren [85, 97]. Aus den Faltungs- und Entfaltungsprozessen werden kinetische und thermodynamische Daten gesammelt und ein Strukturmodell hergeleitet. Bezüglich der Faltungshierarchie sprechen die so gewonnenen Ergebnisse von Greenleaf et al. für eine Faltung in Abhängigkeit von der Transkription [85]. Als erstes Sekundärstrukturmotiv wird die P2-Helix gebildet, gefolgt von der P3-Helix und der Schlaufeninterkation. Die instabile P1-Helix wird zuletzt gebildet und steht in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen der offenen und geschlossenen Form. Erst durch die Zugabe von Adenin wird die P1-Helix stabilisiert.

Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse wird im Übersichtsartikel nicht diskutiert. Die genaue Betrachtung der in den unterschiedlichen Studien untersuchten RNA-Konstrukte könnte aber eine mögliche Erklärung liefern. Es wurden Adenin- und Guanin-bindende RNA-Schalter verglichen, die zwar eine gleiche globale Struktur haben, aber eine unterschiedliche Basenpaarung der Helices P1, P2 und P3 aufweisen. Darüber hinaus gibt es einen signifikanten Unterschied in der Länge der Helix P1 (Anzahl der Basenpaare: 7 (G), 5 (A)). Je nach Methode wurde die Länge der P1-Helix zusätzlich variiert. Für die Experimente mit NMIA, smFRET und NMR-Spektroskopie wurden bisher zwecks einer effizienteren Synthese RNA-Konstrukte generiert, die eine längere P1-Helix mit zusätzlichen, nicht nativen Basenpaaren enthalten. Bei der Untersuchung mit der Einzelmolekülkraftmessung dagegen mussten solche Änderungen nicht eingeführt werden. Die Vermutung, dass die P1-Helixlänge einen entscheidenden Einfluss auf die Faltungshierarchie und die Struktur der freien Aptamerdomäne hat, liegt bei genauer Betrachtung sehr nah.

In dieser Arbeit wird diese Fragestellung zum Gegenstand der Untersuchung (Kapitel 5). Aus dem Vergleich von zwei Konstrukten mit unterschiedlicher Länge der P1-Helix lassen sich überraschende Zusammenhänge zwischen der Stabilität der P1-Helix und der globalen Struktur und Bindungsaffinität erkennen.

### 1.3.8 Literatur

1. Joyce GF. **1989**. *Gene* 82: 83-7
2. Ellington AD, Szostak JW. **1990**. *Nature* 346: 818-22
3. Tuerk C, Gold L. **1990**. *Science* 249: 505-10
4. Famulok M. **1994**. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 1698-706
5. Famulok M, Szostak JW. **1992**. *J. Am. Chem. Soc.* 114: 3990-1
6. Cech TR, Zaug AJ, Grabowski PJ. **1981**. *Cell* 27: 487-96
7. Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S. **1983**. *Cell* 35: 849-57
8. Grundy FJ, Henkin TM. **1998**. *Mol. Microbiol.* 30: 737-49
9. Gelfand M, Mironov A, Jomantas J, Kozlov Y, Perumov D. **1999**. *Trends Genet.* 15: 439 - 42

10. Nou X, Kadner RJ. **2000**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7190-5
11. Miranda-Ríos J, Navarro M, Soberón M. **2001**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9736-41
12. Nahvi A, Sudarsan N, Ebert MS, Zou X, Brown KL, Breaker RR. **2002**. *Chem.Biol.* 9: 1043-9
13. Dock-Bregeon AC, Moras D. **1987**. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 52: 113-21
14. Soukup GA, Breaker RR. **1999**. *RNA* 5: 1308-25
15. Mandal M, Boese B, Barrick JE, Winkler WC, Breaker RR. **2003**. *Cell* 113: 577-86
16. Sudarsan N, Barrick JE, Breaker RR. **2003**. *RNA* 9: 644-7
17. Winkler WC, Breaker RR. **2003**. *ChemBioChem* 4: 1024-32
18. Mandal M, Breaker R. **2004**. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5: 451 - 63
19. Blount KF, Breaker RR. **2006**. *Nat. Biotech.* 24: 1558-64
20. Deigan KE, FerrÉ-D'AmarÉ AR. **2011**. *Acc. Chem. Res.* ASAP
21. Mulhbacher J, Brouillette E, Allard M, Fortier L-C, Malouin F, Lafontaine DA. **2010**. *PLoS Pathog.* 6: e1000865
22. Mulhbacher J, St-Pierre P, Lafontaine DA. **2010**. *Curr.t Opin. Pharm.* 10: 551-6
23. Bauer G, Suess B. **2006**. *J.Biotech.* 124: 4-11
24. Weigand J, Suess B. **2009**. *App. Micro. Biotechn.* 85: 229-36
25. Meister G, Tuschl T. **2004**. *Nature* 431: 343-9
26. Winkler WC. **2005**. *Arch. Microbiol.* 183: 151-9
27. Gelfand M. **2006**. *Mol. Biol.* 40: 541-50
28. Naville M, Gautheret D. **2010**. *Brief. Func. Gen.* 9: 178-89
29. Barrick J, Breaker R. **2007**. *Gen. Biol.* 8: R239
30. Breaker RR. **2010**. *Cold Spring Harbor Persp. Biol.*, doi: 10.1101/cshperspect.a003566
31. Yarnell WS, Roberts JW. **1999**. *Science* 284: 611-5
32. Mandal M, Breaker RR. **2004**. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 29-35
33. Tucker BJ, Breaker RR. **2005**. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15: 342-8
34. Shine J, Dalgarno L. **1975**. *Nature* 254: 34-8
35. Barrick JE, Corbino KA, Winkler WC, Nahvi A, Mandal M, et al. **2004**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 6421-6
36. Winkler WC, Nahvi A, Roth A, Collins JA, Breaker RR. **2004**. *Nature* 428: 281-6
37. Loh E, Dussurget O, Gripenland J, Vaitkevicius K, Tiensuu T, et al. **2009**. *Cell* 139: 770-9
38. Welz R, Breaker RR. **2007**. *RNA* 13: 573-82
39. Poiata E, Meyer MM, Ames TD, Breaker RR. **2009**. *RNA* 15: 2046-56
40. Mandal M, Lee M, Barrick J, Weinberg Z, Emilsson G, et al. **2004**. *Science* 306: 275 - 9
41. Kim JN, Roth A, Breaker RR. **2007**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 16092-7
42. Serganov A, Yuan Y-R, Pikovskaya O, Polonskaia A, Malinina L, et al. **2004**. *Chem.Biol.* 11: 1729-41
43. Buck J, Wacker A, Warkentin E, Wöhnert J, Wirmer-Bartoschek J, Schwalbe H. **2011**. *Nucleic Acids Res.*, doi: 10.1093/nar/gkr664
44. Edwards AL, Batey RT. **2009**. *J.Mol. Biol.* 385: 938-48
45. Roth A, Winkler WC, Regulski EE, Lee BWK, Lim J, et al. **2007**. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14: 308-17
46. Klein DJ, Edwards TE, Ferre-D'Amare AR. **2009**. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16: 343-4
47. Zhang Q, Kang M, Peterson RD, Feigon J. **2011**. *J. Am. Chem. Soc.* 133: 5190-3
48. Weinberg Z, Barrick JE, Yao Z, Roth A, Kim JN, et al. **2007**. *Nucleic Acids Res.* 35: 4809-19
49. Meyer MM, Roth A, Chervin SM, Garcia GA, Breaker RR. **2008**. *RNA* 14: 685-95
50. Sudarsan N, Lee ER, Weinberg Z, Moy RH, Kim JN, et al. **2008**. *Science* 321: 411-3
51. Kulshina N, Baird NJ, Ferre-D'Amare AR. **2009**. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16: 1212-7
52. Winkler W, Nahvi A, Breaker RR. **2002**. *Nature* 419: 952-6
53. Serganov A, Polonskaia A, Phan AT, Breaker RR, Patel DJ. **2006**. *Nature* 441: 1167-71
54. Thore S, Leibundgut M, Ban N. **2006**. *Science* 312: 1208-11
55. Sudarsan N, Wickiser JK, Nakamura S, Ebert MS, Breaker RR. **2003**. *Genes Dev.* 17: 2688-97
56. Serganov A, Huang L, Patel DJ. **2008**. *Nature* 455: 1263-7
57. Winkler W, Cohen-Chalamish S, Breaker R. **2002**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 15908 - 13
58. Serganov A, Huang L, Patel DJ. **2009**. *Nature* 458: 233-7
59. Dann lii CE, Wakeman CA, Sieling CL, Baker SC, Irnov I, Winkler WC. **2007**. *Cell* 130: 878-92

60. Wang JX, Lee ER, Morales DR, Lim J, Breaker RR. **2008.** *Mol. Cell* 29: 691-702
61. Edwards AL, Reyes FE, Héroux A, Batey RT. **2010.** *RNA* 16: 2144-55
62. Winkler W, Nahvi A, Roth A, Collins J, Breaker R. **2004.** *Nature* 428: 281 - 6
63. Klein DJ, Wilkinson SR, Been MD, Ferré-D'Amaré AR. **2007.** *J. Mol. Biol.* 373: 178-89
64. Winkler W, Nahvi A, Sudarsan N, Barrick J, Breaker R. **2003.** *Nat. Struct. Biol.* 10: 701 - 7
65. Montange RK, Batey RT. **2006.** *Nature* 441: 1172-5
66. Corbino K, Barrick J, Lim J, Welz R, Tucker B, et al. **2005.** *Gen. Biol.* 6: R70
67. Gilbert SD, Rambo RP, Van Tyne D, Batey RT. **2008.** *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15: 177-82
68. Fuchs RT, Grundy FJ, Henkin TM. **2006.** *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13: 226-33
69. Lu C, Smith AM, Fuchs RT, Ding F, Rajashankar K, et al. **2008.** *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15: 1076-83
70. Weinberg Z, Regulski EE, Hammond MC, Barrick JE, Yao Z, et al. **2008.** *RNA* 14: 822-8
71. Meyer M, Ames T, Smith D, Weinberg Z, Schwalbach M, et al. **2009.** *BMC Genomics* 10: 268
72. Mandal M, Lee M, Barrick JE, Weinberg Z, Emilsson GM, et al. **2004.** *Science* 306: 275-9
73. Kwon M, Strobel SA. **2008.** *RNA* 14: 25-34
74. Ames TD, Rodionov DA, Weinberg Z, Breaker RR. **2010.** *Chem. Biol.* 17: 681-5
75. Regulski EE, Moy RH, Weinberg Z, Barrick JE, Yao Z, et al. **2008.** *Mol. Microbiol.* 68: 918-32
76. Edwards TE, Klein DJ, Ferré-D'Amaré AR. **2007.** *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17: 273-9
77. Noeske J, Richter C, Grundl MA, Nasiri HR, Schwalbe H, Wöhnert J. **2005.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 1372-7
78. Szewczak AA, Moore PB. **1995.** *J. Mol. Biol.* 247: 81-98
79. Nagaswamy U, Fox GE. **2002.** *RNA* 8: 1112-9
80. Staple DW, Butcher SE. **2005.** *PLoS Biol.* 3: e213
81. Montange RK, Batey RT. **2008.** *Annu. Rev. Biophys.* 37: 117-33
82. Noeske J, Buck J, Fürtig B, Nasiri HR, Schwalbe H, Wöhnert J. **2006.** *Nucleic Acids Res.* 35: 572-83
83. Buck J, Fürtig B, Noeske J, Wöhnert J, Schwalbe H. **2007.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104: 15699-704
84. Mironov AS, Gusarov I, Rafikov R, Lopez LE, Shatalin K, et al. **2002.** *Cell* 111: 747-56
85. Greenleaf WJ, Frieda KL, Foster DAN, Woodside MT, Block SM. **2008.** *Science* 319: 630-3
86. Wickiser JK, Cheah MT, Breaker RR, Crothers DM. **2005.** *Biochemistry* 44: 13404-14
87. Wickiser J, Winkler W, Breaker R, Crothers D. **2005.** *Mol. Cell* 18: 49 - 60
88. McDaniel BAM, Grundy FJ, Artsimovitch I, Henkin TM. **2003.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 3083-8
89. Lemay J-F, Desnoyers G, Blouin S, Heppell B, Bastet L, et al. **2011.** *PLoS Genet.* 7: e1001278
90. Lemay J-F, Penedo JC, Tremblay R, Lilley DMJ, Lafontaine Daniel A. **2006.** *Chem. Biol.* 13: 857-68
91. Lemay JF, Lafontaine DA. **2007.** *RNA* 13: 339-50
92. Gilbert SD, Love CE, Edwards AL, Batey RT. **2007.** *Biochemistry* 46: 13297-309
93. Batey RT, Gilbert SD, Montange RK. **2004.** *Nature* 432: 411-5
94. Garst AD, Edwards AL, Batey RT. **2010.** *Cold Spring Harbor Persp. Biol.*
95. Stoddard CD, Gilbert SD, Batey RT. **2008.** *RNA* 14: 675-84
96. Noeske J, Schwalbe H, Wöhnert J. **2007.** *Nucleic Acids Res.* 35: 5262-73
97. Li PTX, Viereggs J, Tinoco I. **2008.** *Annu. Rev. of Biochem.* 77: 77-100

---

## 2 $\Gamma$ -HCP Pulssequenz zur Bestimmung der Torsionswinkel $\alpha$ und $\zeta$ in RNA/DNA

---

Das folgende Kapitel fasst Arbeiten zusammen, die in der Publikation von Nozinovic et al. (2010) veröffentlicht wurden. Für die Analyse der  $\Gamma$ -Raten wurden  $^3\text{J}$ -Kopplungen verwendet, die von Dr. Boris Fürtig und Dr. Christian Richter gemessen wurden. Dr. Jörg Rinnenthal danke ich für Empfehlungen zur Optimierung der  $\Gamma$ -HCP Pulssequenz. Die 27mer RNA-Probe wurde von Dr. Julia Weigand aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beatrix Süß synthetisiert. Dr. Elke Duchardt-Ferner aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jens Wöhnert stellte die Struktur und  $^3\text{J}$ -Kopplungen der 27mer RNA zur Verfügung.

Nozinovic, S., Richter, C., Rinnenthal, J., Fürtig, B., Duchardt-Ferner, E., Weigand, J. E., Schwalbe, H. (2010),  
Quantitative 2D and 3D  $\Gamma$ -HCP Experiments for the Determination of the Angles  $\alpha$  and  $\zeta$  in the Phosphodiester Backbone of Oligonucleotides.

*J. Am. Chem. Soc.* 132, 10318-10329



## 2.1 Einleitung

In Proteinen wird die Rückgratkonformation mit dem Ramachandran-Diagramm, das die Korrelation zwischen Winkeln  $\phi$  und  $\psi$  zeigt, charakterisiert. In RNA könnte eine ähnliche Bedeutung der Winkelkombination  $\zeta_i, \alpha_{i+1}$ , die die Konformation um die Phosphordiesterbindung definiert, zugeschrieben werden [1]. Wie schon im Kapitel 1.2 beschrieben, zeigt die Struktur um die Phosphatgruppe die höchste Variabilität, insbesondere innerhalb der nicht kanonischen Regionen, wenn der Zucker die C2'-endo Konformation einnimmt (Abbildung 2-1). Dazu gehören Einzelstrangbereiche wie Schleifen und Ausbuchtungen, die an den tertiären Wechselwirkungen und der Ligand- oder Proteinerkennung beteiligt sind. Die Variabilität ist insbesondere für den Torsionswinkel  $\zeta$  ausgeprägt. Dennoch zeigt sich in der 2D-Korrelation der aufeinander folgenden Torsionswinkel  $\zeta_i$  und  $\alpha_{i+1}$  in ribosomaler RNA, dass sich definierte Cluster bilden.

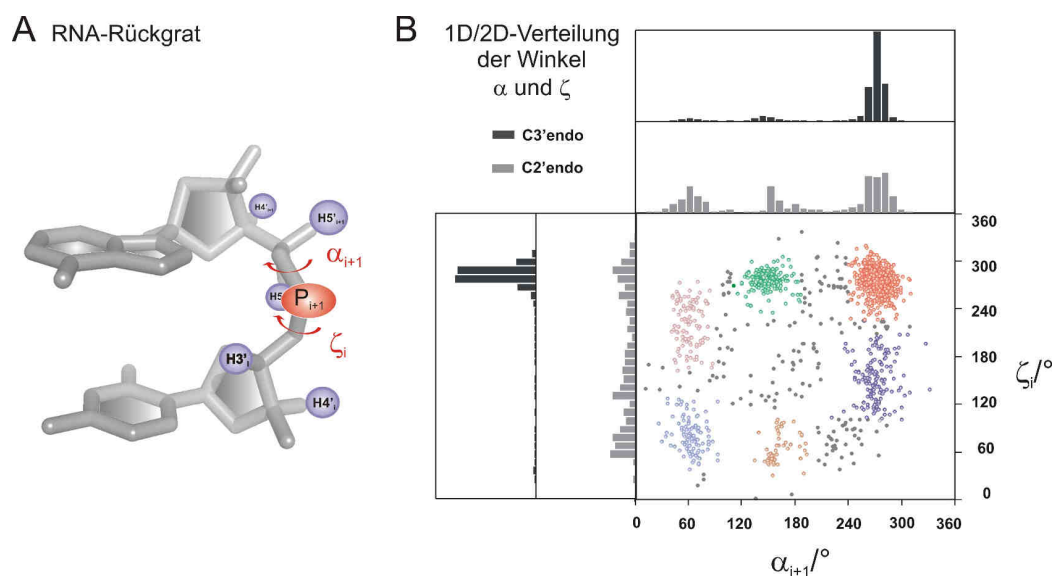


Abbildung 2-1: A. RNA-Rückgrat mit der Beschreibung der Torsionswinkel  $\alpha_i$  und  $\zeta_{i+1}$  und Hervorhebung der CH-Bindungsvektoren (C3'H3', C4'H4', C5'H5'/H5''). B. 1D- und 2D-Winkelverteilung der Winkel  $\zeta_i$  und  $\alpha_{i+1}$  in ribosomaler RNA (pdb: 1ffk)[2]. Bildung von Clustern ist farblich hervorgehoben.

Für jede Untersuchung einer RNA-Struktur, die weitere Strukturelemente enthält außer der A-Form-Helix, ist es wichtig, die Winkel  $\alpha$  und  $\zeta$  experimentell genau zu bestimmen, obgleich diese besonders schwer mit den klassischen Methoden der NMR-Spektroskopie zugänglich sind, weil das Phosphoratom an das nicht NMR-aktive Sauerstoffatom gebunden ist. Aus diesem Grund sind Messungen von  $^3\text{J}$ -Kopplungen nicht möglich. Bisher verwendete Ansätze beruhen auf der qualitativen Einschätzung dieser beiden Winkel mithilfe der  $^{31}\text{P}$ -chemische Verschiebung, um darauf basierend die *trans*-Konformation auszuschließen [3-4]. Ein weiterer NMR-Parameter, der die Konformation der Winkel  $\alpha$  und  $\zeta$  reflektiert, ist die „residuale chemische Verschiebungsanisotropie“ (rCSA), die mit partiell aus-

gerichteten RNA-Proben gemessen werden können [5]. Beide Parameter,  $^{31}\text{P}$ -chemische Verschiebung und die residuale chemische Verschiebungsanisotropie, sind oftmals nur semi-quantitativ und durch die geringe spektrale Dispersion der  $^{31}\text{P}$ -Resonanzen erschwert zu messen. Deshalb beschränkte sich bisher die Definition der beiden Winkel in Strukturrechnungen oftmals auf die Setzung der kanonischen Werte für helikale Strukturregionen mit einer großen Toleranz.

2000 stellten Richter et al. ein neues Experiment zur Bestimmung der beiden Winkel  $\alpha$  and  $\zeta$  vor [6]. Das Experiment beruht auf der Quantifizierung der CH-dipolaren,  $^{31}\text{P}$ -CSA kreuz-korrelierten Relaxation, die sich im Spektrum der  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ -Doppel- und Nullquanten (DQ/ZQ)-Kohärenz entwickelt. In dem Experiment entwickelt sich die  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ -DQ/ZQ-Kohärenz unter dem Einfluss der  $^1\text{J}(\text{C,H})$  Kopplungskonstante und der kreuz-korrelierten Rate für eine konstante Zeit  $T_m$ . Die beobachtete Linienform in der Evolutionszeit war ein Multiplett, aufgespalten durch die  $\text{J}(\text{C,H})$  skalare Kopplung. Durch die Quantifizierung der Unterschiede in den Intensitäten der einzelnen Multiplettkomponenten wurde die gewünschte  $\Gamma_{\text{CH,P}}^{\text{DD,CSA}}$  extrahiert.

In der vorliegenden Arbeit wird eine fundamental neue und verbesserte Methode, die empfindlicher ist und eine höhere Auflösung aufweist, vorgestellt. Die neue Pulssequenz erlaubt die Messung von fünf verschiedenen Relaxationsraten entlang des RNA/DNA-Rückgrats in einem quantitativen Experiment [7-10]. Es wird die Messung und die quantitative Auswertung der Raten für die 14mer *cUUCGg-Tetra* RNA demonstriert. Für die Auswertung der Daten wurden Skripte mit dem Programm *Mathematica* geschrieben. Es wird weiterhin gezeigt, wie der Einsatz der zusätzlichen Torsionswinkel  $\alpha$  und  $\zeta$  zu einer Verfeinerung der Struktur im Verlauf der Strukturrechnung beiträgt. Des Weiteren wird die Pulssequenz an einer 27mer RNA mit einer unbekanntem Struktur getestet. Zum Schluss wird eine qualitative Auswertung der Raten im Zusammenhang mit 32 verschiedenen Konformationsklassen der RNA diskutiert. Damit wird deutlich gemacht, welches Anwendungspotenzial die Methode bei der Bestimmung und Untersuchung der unterschiedlichen RNA-Konformationen besitzt.

## 2.2 Material und Methoden

### 2.2.1 NMR-Spektroskopie und Probe

Die NMR-Experimente wurden am AV600 MHz Bruker Spektrometer mit einem 5 mm z-Gradienten  $^1\text{H}(^{13}\text{C},^{31}\text{P})$ -TCI Kryoprobekopf bei einer Temperatur von 298 K aufgenommen. Mehr Details zu den Parametern der Pulssequenzen finden sich in den jeweiligen Bildunterschriften zu den im Folgenden dargestellten Pulssequenzen. Die Daten wurden prozessiert mithilfe des Programms TOPSPIN 2.1 (Bruker Biospin). Die Resonanzzuordnung und Probenvorbereitung wurden früher veröffentlicht [11-13].



## 2.2.2 Theoretische Grundlagen der Pulssequenz

Im Kapitel 1.1.5 (S.13) wurde der physikalische Hintergrund der kreuz-korrelierten Relaxationsraten erläutert. Neben der globalen Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  hängt die kreuz-korrelierte Relaxationsrate zwischen dem CH-Dipol und der  $^{31}\text{P}$ -CSA von den Projektionswinkeln  $\theta_{\text{CH},\sigma}$  zwischen dem CH-Bindungsvektor und den axialen Komponenten des  $^{31}\text{P}$ -CSA-Tensors ( $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$ ,  $\sigma_{33}$ ) ab (Abbildung 2-2 C). Die Projektionswinkel sind eine Funktion der Torsionswinkel, die zwischen den interagierenden Gruppen die Konformation beschreiben (z.B.  $\varepsilon$  und  $\zeta$  für den C3'H3'-Dipol). Aus diesem Grund können Relaxationsraten, umgekehrt, zur Bestimmung der Torsionswinkel herangezogen werden.

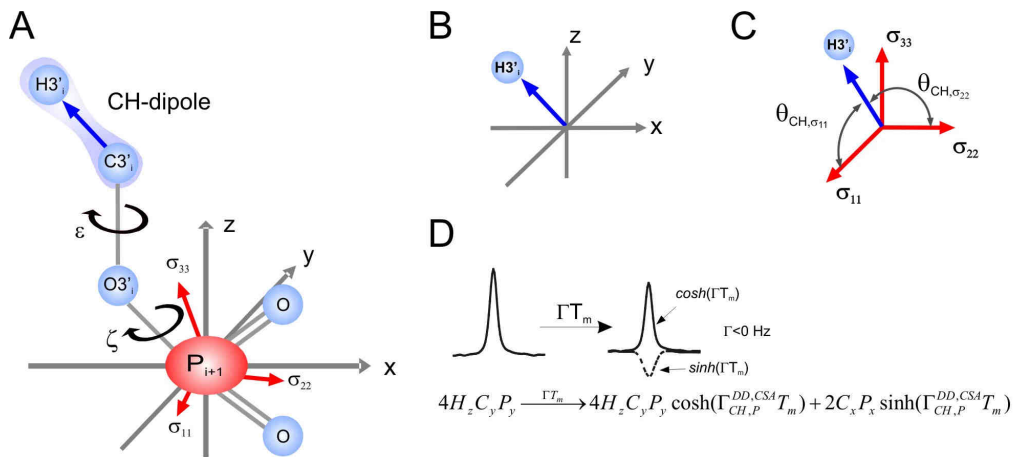


Abbildung 2-2: A. Die Orientierung des C3'H3'-Dipolvektors und der axialen Komponenten des  $^{31}\text{P}$ -CSA-Tensors ( $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$ ,  $\sigma_{33}$ ) im Bezug zu dem Molekülkoordinatensystem ( $A_x, y, z$ ), das früher definiert wurde [14]. B. CH-Dipolvektor im Molekülkoordinatensystem. C. CH-Dipolvektor relativ zum  $^{31}\text{P}$ -CSA-Tensor ( $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$ ,  $\sigma_{33}$ ) wird durch die Projektionswinkel beschrieben. D. Bildhafte Darstellung des Signals vor und nach der Mischzeit. Die relativen Intensitäten wurden zur besseren Verdeutlichung angepasst.

Die kreuz-korrelierte Relaxationsrate wird mit der folgenden Gleichung beschrieben:

$$\Gamma_{\text{CH},P}^{\text{DD,CSA}} = -\frac{2}{15} \gamma_P B_0 \tau_c \hbar \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_H \gamma_C}{(r_{\text{CH}})^3} \cdot [(\sigma_{11} - \sigma_{33})(3\cos^2 \theta_{\text{CH},\sigma_{11}} - 1) + (\sigma_{22} - \sigma_{33})(3\cos^2 \theta_{\text{CH},\sigma_{22}} - 1)] \quad (\text{Gl. 1})$$

$\sigma_{nn}$ : Diagonalelemente des  $^{31}\text{P}$  CSA-Tensors ( $\sigma_{11} = -86$  ppm,  $\sigma_{22} = -26$  ppm,  $\sigma_{33} = 112$  ppm)[15]

$\gamma_n$ : das gyromagnetische Verhältnis der involvierten Kerne

$B_0$ : Magnetfeldstärke

$r_{\text{CH}}$ : Länge der CH-Bindung

$\hbar$ : Planck's Konstante geteilt durch  $2\pi$

$\mu_0$ : Magnetische Suszeptibilität im Vakuum

$\tau_c$ : Rotationskorrelationszeit für RNA (14mer = 2,27 ns bei 298 K [16])

Die Pulssequenz für das neue quantitative  $\Gamma$ -HCP-Experiment ist abgeleitet vom HCP-Experiment [17] und erfordert eine  $^{13}\text{C}$ -markierte Probe. Der Transfer der Kohärenz ist optimiert für die CH-Gruppen (C2'H2', C3'H3', C4'H4') und die CH<sub>2</sub>-Gruppe (C5'H5'(proR)/H5''(proS)), wie im Folgenden erläutert.

### CH-Gruppe

Die kreuz-korrelierten Relaxationsraten  $\Gamma_{(C2'H2'),i,P_{i+1}}^{CSA,DD}$ ,  $\Gamma_{(C3'H3'),i,P_{i+1}}^{CSA,DD}$ ,  $\Gamma_{(C4'H4'),P_i}^{DD,CSA}$  und  $\Gamma_{(C4'H4'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$  können in 2D und 3D Experimenten, die auf dem gleichem Prinzip des Kohärenztransfers basieren, gemessen werden (Abbildung 2-3 A). Nach den zwei ersten INEPT-Schritten mit einem anschließenden z-Filter (Sektion a-c, Abbildung 2-3 A) wird die Magnetisierung der DQ/ZQ-Kohärenzen erzeugt und der Operator des Typs  $4H_z C_y P_y$  selektiert (Abbildung 2-3 A). Durch die kreuz-korrelierte Relaxation entwickelt sich der Operator während der Mischzeit folgendermaßen [8, 18]:

$$4H_z C_y P_y \xrightarrow{\hat{f}[P_z, [2C_z H_z]]} 4H_z C_y P_y \cosh(\Gamma_{CH,P}^{DD,CSA} T_m) + 2C_x P_x \sinh(\Gamma_{CH,P}^{DD,CSA} T_m) \quad (\text{Gl. 2})$$

Die  $\Gamma$ -Rate wird aus dem Verhältnis der *cosh* und *sinh*-modulierten Signale extrahiert:

$$\tanh(\Gamma T_m) = \frac{1}{T_m} \tanh(\Gamma) = \frac{\sinh(\Gamma T_m)}{\cosh(\Gamma T_m)} = \frac{I_{cross}}{I_{ref}} \quad (\text{Gl. 3})$$

Wobei  $I_{cross}/I_{ref}$  die Signale im Kreuz- und Referenzexperiment repräsentieren.

Für die Berechnung der Rate müssen die *sinh*- und *cosh*-modulierten Terme getrennt gemessen werden. In der Durchführung werden deshalb zwei Experimente, das Referenz- und das Kreuzexperiment, aufgenommen und jeweils nur einer der Operatoren detektiert. Nach der Mischzeit  $T_m$  (Sektion c, Abbildung 2-3 A) im Referenzexperiment wird durch die Anwendung eines zweiten z-Filters, der Gradienten und des Phasenzklus nur der *cosh*-modulierte Term detektiert. Zusätzlich kann eine Evolutionsperiode für die  $^{31}\text{P}$ -chemische Verschiebung (Sektion d, Abbildung 2-3 A) eingebaut werden, um die beiden Raten des  $\text{CH}_4'$ -Dipols zum eigenen ( $P_i$ ) und nächsten ( $P_{i+1}$ ) Phosphoratom ( $\Gamma_{(C4'H4'),P_i}^{DD,CSA}$  und  $\Gamma_{(C4'H4'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$ ) voneinander zu trennen. Entwicklung der  $^{13}\text{C}$ -chemischen Verschiebung findet in der konstanten Zeit  $T$  statt, die gleichzeitig den zweiten CP-INEPT-Schritt darstellt (Sektion e, Abbildung 2-3 A). Zum Schluss wird der antiphase-Operator  $4H_z C_y P_y$  zu der detektierbaren  $^1\text{H}$ -Einquantum-Kohärenz in Folge von zwei INEPT-Schritten umgewandelt. Dies erfolgt durch die Methode *echo-antiecho sensitivity enhanced* [19-21].

Im Kreuzexperiment ist der zweite z-Filter in der Phase um  $90^\circ$  versetzt (Abbildung 2-3 A), so dass nur der *sinh*-modulierte Term ( $2C_x P_x \sinh(\Gamma_{CH,P}^{DD,CSA} T_m)$ ) selektiert wird. Nach der Entwicklung der  $^{13}\text{C}$ - und optional der  $^{31}\text{P}$ -chemischen Verschiebung wird eine zusätzliche Periode ( $\Delta'' = 1/2 * ^1\text{JCH}$ ) in der Sektion e (Abbildung 2-3 A) eingefügt, um den Operator in einen CH-antiphase Operator umzuwandeln. So kann er schließlich in ein detektierbares  $^1\text{H}$  Signal wie im Referenzexperiment aufgenommen werden.

Die kreuz-korrelierte Rate kann, wie aus der Gleichung 4 folgt, extrahiert werden.

$$\Gamma_{P,CH}^{CSA,DD} = \frac{1}{T_m} \tanh^{-1} \left( \frac{I_{cross}}{I_{ref}} \right) \frac{NS_{ref}}{NS_{cross}} \quad (\text{Gl. 4})$$

$T_m$  ist die Länge der Mischzeit,  $I_{cross}$  und  $I_{ref}$  sind die Signalintensitäten,  $NS_{cross}/NS_{ref}$  die Anzahl der *Scans* (Aufnahmen) in den jeweiligen Experimenten.

### CH<sub>2</sub> Gruppe

Für den Magnetisierungstransfer und die Selektion der kreuz-korrelierten Relaxationsraten, die eine CH<sub>2</sub> Gruppe, wie die C5'H5'/H5' Gruppe in RNA/DNA involvieren, ist eine spezielle Vorgehensweise erforderlich, um die Beiträge der beiden Wasserstoffe, die im Weiteren als H<sup>1</sup> für H5'(proR) und H<sup>2</sup> für H5''(proS) notiert werden, voneinander zu trennen. Aus diesem Grund wird ein 3D-Experiment mit einer zusätzlichen Dimension für die <sup>1</sup>H chemische Verschiebung aufgestellt, wobei der Magnetisierungstransfer so optimiert ist, dass nur der CH-inphase Operator während der Mischzeit selektiert wird. So wird verhindert, dass sich die Raten der beiden Wasserstoffe beim Rücktransfer miteinander mischen. Die Pulssequenz beginnt mit einem INEPT-Schritt, der eine Evolutionsperiode der <sup>1</sup>H-chemischen Verschiebung beinhaltet. Auf diese Weise werden die beiden Methylenwasserstoffe von Anfang an anhand ihrer chemischen Verschiebung getrennt. Nach dem darauffolgenden z-Filter wird die DQ/ZQ-Kohärenz selektiert. In dem Kreuzexperiment wird die Pulssequenz mit dem CH-antiphase Operator fortgesetzt, der in der Mischzeit unter kreuz-korrelierter Relaxation evolviert [8, 18]:

$$\begin{aligned} 4H_z^1 C_y P_y \xrightarrow{\hat{\Gamma}[P_z, [2C_z H_z^1]], [P_z, [2C_z H_z^2]]} & 4H_z^1 C_y P_y \cosh(\Gamma_{CH^1, P}^{DD, CSA} T_m) \cosh(\Gamma_{CH^2, P}^{DD, CSA} T_m) + \\ & 8H_z^1 H_z^2 C_x P_x \cosh(\Gamma_{CH^1, P}^{DD, CSA} T_m) \sinh(\Gamma_{CH^2, P}^{DD, CSA} T_m) + \\ & \boxed{2C_x P_x \sinh(\Gamma_{CH^1, P}^{DD, CSA} T_m) \cosh(\Gamma_{CH^2, P}^{DD, CSA} T_m)} + \\ & 4H_z^2 C_y P_y \sinh(\Gamma_{CH^1, P}^{DD, CSA} T_m) \sinh(\Gamma_{CH^2, P}^{DD, CSA} T_m) \quad (\text{Gl. 5}) \end{aligned}$$

Nach der Mischzeit wird nur der Operator  $2C_x P_x \sinh(\Gamma_{CH^1, P}^{DD, CSA} T_m) \cosh(\Gamma_{CH^2, P}^{DD, CSA} T_m)$  nach den zwei INEPT-Schritten selektiert (Gl. 5).

In dem Referenzexperiment wird der erste INEPT-Schritt von einer zusätzlichen Periode ( $\Delta'' = 1/4 \cdot J_{CH}$ ) gefolgt, um den CH-antiphase in einen CH-inphase Operator zu refokussieren. Anschließend wird die Magnetisierung auf den Phosphor transferiert ( $2C_y P_y$ , Sektion b in Abbildung 2-3 B). Eine solche CH-inphase Kohärenz ist erforderlich, um die Mischung der Relaxationsraten der beiden Wasserstoffe zu verhindern. Während der Mischzeit entwickelt sich der Operator wie folgt:

$$2C_y P_y \xrightarrow{\hat{r}[P_z, \{2C_z H_z^1\}], [P_z, \{2C_z H_z^2\}]} \left[ 2C_y P_y \cosh(\Gamma_{CH^1, P}^{DD, CSA} T_m) \cosh(\Gamma_{CH^2, P}^{DD, CSA} T_m) \right] +$$

$$4H_z^2 C_x P_x \cosh(\Gamma_{CH^1, P}^{DD, CSA} T_m) \sinh(\Gamma_{CH^2, P}^{DD, CSA} T_m) +$$

$$4H_z^1 C_x P_x \sinh(\Gamma_{CH^1, P}^{DD, CSA} T_m) \cosh(\Gamma_{CH^2, P}^{DD, CSA} T_m) +$$

$$8H_z^1 H_z^2 C_y P_y \sinh(\Gamma_{CH^1, P}^{DD, CSA} T_m) \sinh(\Gamma_{CH^2, P}^{DD, CSA} T_m) \quad (\text{Gl. 6})$$

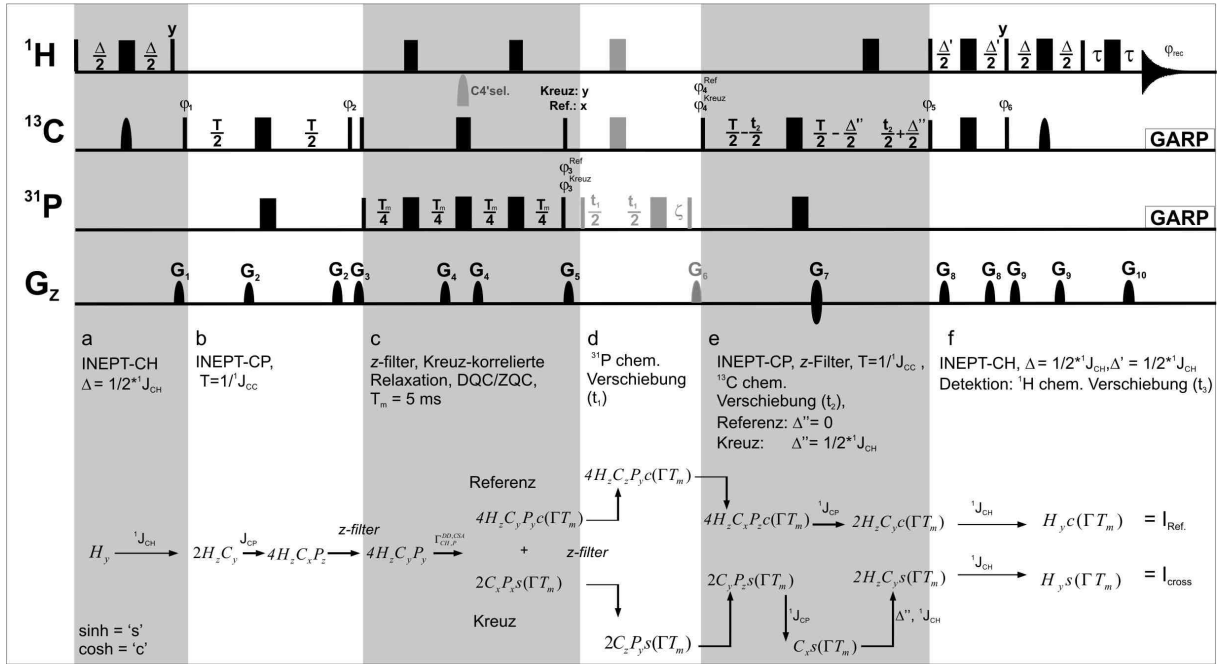
Nach der Mischzeit wird nur der Operator  $2C_y P_y \cosh(\Gamma_{CH^1, P}^{DD, CSA} T_m) \cosh(\Gamma_{CH^2, P}^{DD, CSA} T_m)$

beibehalten. Der Beitrag des zweiten Wasserstoffs ( $\cosh(\Gamma_{CH^2, P}^{DD, CSA} T_m)$ ), der in beiden Experimenten *cosh*-moduliert ist, kann vernachlässigt werden, weil er sich bei der weiteren Rechnung, wenn die Signalintensitäten der beiden Experimente ins Verhältnis gesetzt werden, aufhebt.

In beiden Experimenten müssen die CH-inphase Operatoren zum Schluss zum Wasserstoff gekoppelt werden, bevor die letzten INEPT-Schritte erfolgen. Während dieser Zeit ( $\Delta'' = 1/4 * J_{CH}$ , Sektion d, Abbildung 2-3 B) wird die Magnetisierung gleichzeitig auf beide Methylenwasserstoffe verteilt, so dass zwei Signale, die in den beiden Dimensionen ( $\omega_1, \omega_3$ ) entweder auf der gleichen Frequenz des gleichen Wasserstoffs (Diagonal-Signal) oder den Frequenzen der beiden Wasserstoffe (Kreuzsignal) aufkommen, entstehen. Für die weitere Analyse muss die Intensität des Referenzexperiments wegen der zusätzlichen Periode ( $\Delta''$ ) nach dem ersten INEPT-Schritt mit dem Faktor 2 korrigiert werden. Die kreuz-korrelierte Relaxationsrate kann entsprechend der Gleichung 4 extrahiert werden. In beiden Experimenten dient die Anwendung der 180°-Pulse während der Mischzeit zur Unterdrückung anderer kreuz-korrelierter Relaxationsraten wie  $\Gamma_{PH, P}^{DD, CSA}$ ,  $\Gamma_{CH, C}^{DD, CSA}$  and  $\Gamma_{CH, PH}^{DD, DD}$  [8-10].

Es lässt sich zusammenfassen, dass die oben vorgestellte Pulssequenz (Abbildung 2-3 A) für die CH Gruppen optimiert ist und für die Messung von den Raten  $\Gamma_{(C2'H2)_i, P_{i+1}}^{CSA, DD}$ ,  $\Gamma_{(C3'H3)_i, P_{i+1}}^{CSA, DD}$ ,  $\Gamma_{(C4'H4')_i, P_i}^{DD, CSA}$  und  $\Gamma_{(C4'H4')_i, P_{i+1}}^{DD, CSA}$  verwendet werden kann. Für die  $\Gamma_{(C2'H2)_i, P_{i+1}}^{CSA, DD}$  und  $\Gamma_{(C3'H3)_i, P_{i+1}}^{CSA, DD}$  ist es hinreichend, wenn die Pulssequenz in der Form eines  $^1H, ^{13}C$ -2D- $\Gamma$ -HC(P)-Experiments ausgeführt wird. Dahingegen ist für die Unterscheidung von  $\Gamma_{(C4'H4')_i, P_i}^{DD, CSA}$  und  $\Gamma_{(C4'H4')_i, P_{i+1}}^{DD, CSA}$  zu dem eigenen ( $P_i$ ) und nachfolgendem Phosphoratom ( $P_{i+1}$ ) eine zusätzliche Evaluation der  $^{31}P$ -chemischen Verschiebung notwendig. Daher sollte für die C4'H4'-Gruppe die Pulssequenz als  $^1H, ^{31}P$ -2D- $\Gamma$ -H(C)P oder  $^1H, ^{13}C, ^{31}P$ -3D- $\Gamma$ -HCP-Experiment durchgeführt werden.

A: CH-Gruppe: Referenz- und Kreuzexperiment



B:  $\text{CH}_2$ -Gruppe: Referenz- und Kreuzexperiment

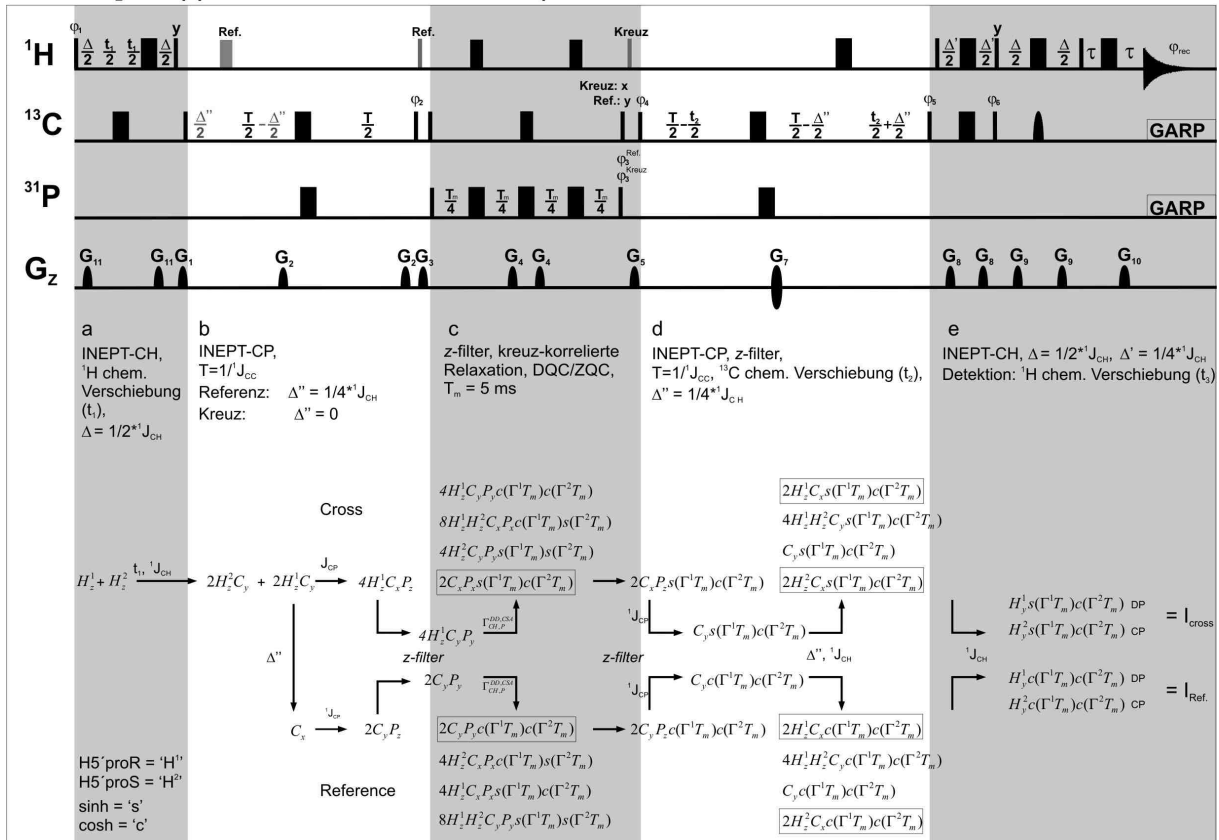


Abbildung 2-3: Pulssequenzen für die quantitativen Experimente 2D-Γ-HCP und 3D-Γ-HCP optimiert für die CH- (A) und  $\text{CH}_2$ -Gruppe (B). Erläuterung siehe unten.

Erläuterung zu der Pulssequenz:

Der Magnetisierungstransfer ist in Form eines einfachen Operatorformalismus zusammengefasst (a-e/a-f). *Cosh* wird abgekürzt mit "c", *sinh* mit "s". Schmale und breite Balken repräsentieren die rechtwinkligen Pulse mit den Winkel von 90° und 180°. Selektive Pulse und Gradienten sind als Halbellipsen dargestellt. Die Standardpulsphase ist aus Richtung x. Die Pulssequenz wurde optimiert für den Bruker Spektrometer mit den für die Bruker-Maschinen typischen Phaseneinstellungen [22]. Die Referenz- und Kreuzexperimente sind in dem gleichen Schema zusammengefasst. Die Wasserstofffrequenz ist auf 4,7 ppm gesetzt. Der  $^{13}\text{C}$ - und  $^{31}\text{P}$ -Offset ist auf 77 ppm bzw. -1,5 ppm eingestellt.  $T_m$  ist die variable Mischzeit für die kreuz-korrelierte Relaxation. Der schwarze halbelliptischen Puls in dem CH-INEPT stellt einen 500  $\mu\text{s}$  *smoothed chirp amplitude* Puls (Bruker Topspin 2.0, 2006) mit einer spektralen Breite von 60 kHz dar. *Asynchronous GARP* Entkopplung [23] wurde verwendet um die heteronukleare Kopplung während der Datenaufnahme zu unterdrücken. Die Feldgradienten *smoothed chirp amplitude* (Bruker Topspin 2.0, 2006) haben die Länge von 1 ms. Sie wurden entlang der z-Achse mit den folgenden Stärken angelegt:  $G_1$ : -40%,  $G_2$ : 25%,  $G_3$ : -50%,  $G_4$ : -5%,  $G_5$ : -45%,  $G_6$ : 2%,  $G_7$ : 80%,  $G_8$ : 11%,  $G_9$ : -5%,  $G_{10}$ : 20.1%,  $G_{11}$ : 8%. 100% der Gradientenstärke bedeutet 55 Gauss/cm. (A)  $\Delta = 3$  ms ( $1/(2 \cdot J_{\text{HC}})$ ),  $\Delta' = 3$  ms ( $1/(2 \cdot J_{\text{HC}})$ ),  $T = 25$  ms ( $1/(2 \cdot J_{\text{CC}})$ ),  $\tau = 1$  ms (Länge von  $G_{10}$ ). Im Referenzexperiment ist die Periode  $\Delta''$  auf 0 ms und im Kreuzexperiment auf 3 ms gesetzt. Während der Mischzeit werden nicht selektive 180° Pulse auf dem  $^{13}\text{C}$ -Kanal angelegt. Alle Spektren wurden aufgenommen mit der Methode *echo-/antiecho enhanced sensitivity* [19-21]. *Echo-/antiecho*-Kohärenzpfade wurden separat aufgenommen, indem die Phase  $\phi_6$  zusammen mit der Polarität des  $G_7$ -Gradienten für jedes  $t_2$ -Inkrement invertiert wurde. Axiale Signale in der  $^{13}\text{C}$ -Dimension sind verschoben auf das Ende des Spektrums indem die Phasen  $\phi_4$  und die Empfängerphase um 180° für jeden nachfolgenden  $t_2$ -Wert sukzessive inkrementiert werden. Alle Pulse, Perioden und Gradienten im C4'-Selektiven 3D-Experiment sind in grau dargestellt. Für das 3D-Experiment wird ein C4'-selektiver 180°-Puls (*Q3 Gaussian cascade*) [24] mit der Länge von 1,5 ms während der Mischzeit angewendet. Der Phasenzklus:  $\phi_1 = 8(x), 8(-x)$ ,  $\phi_2 = 16(y), 16(-y)$ ,  $\phi_3^{\text{ref}} = (x), (-x)$ ,  $\phi_3^{\text{cross}} = (y), (-y)$ ,  $\phi_4^{\text{ref}} = 4(y), 4(-y)$ ,  $\phi_4^{\text{cross}} = 4(x), 4(-x)$ ,  $\phi_5 = (2x), 2(-x)$ ,  $\phi_6 = 2(-y), 2(y)$ ,  $\phi_{\text{rec}} = R, -R, -R, R$  mit  $R = x, 2(-x), x, -x, 2(x), -x$ .  $G_7$  und  $\phi_6$  sind moduliert entsprechend der echo/antiecho Modulation in der  $\omega_2$ -Dimension unter Verwendung der Methode *sensitivity enhancement* [19-21]. B.  $\Delta = 3$  ms ( $1/(2 \cdot J_{\text{HC}})$ ),  $\Delta' = 1,5$  ms ( $1/(4 \cdot J_{\text{HC}})$ ),  $\Delta'' = 1,5$  ms ( $1/(4 \cdot J_{\text{CH}})$ ),  $T = 25$  ms ( $1/(2 \cdot J_{\text{CC}})$ ),  $\tau = G_{10}$ . Die selektierten Operatoren sind mit einem Kasten hervorgehoben. Phasenzklus:  $\phi_1 = 8(x), 8(-x)$ ,  $\phi_2 = 16(x), 16(-x)$ ,  $\phi_3^{\text{ref}} = (x), (-x)$ ,  $\phi_3^{\text{cross}} = (y), (-y)$ ,  $\phi_4 = 4(x), 4(-x)$ ,  $\phi_5 = (2x), 2(-x)$ ,  $\phi_6 = 2(-y), 2(y)$ ,  $\phi_{\text{rec}} = R, -R, -R, R$ ,  $R = x, 2(-x), x, -x, 2(x), -x$ . Die Phasen von  $G_7$  and  $\phi_6$  wurden entsprechend der echo/antiecho Modulation in der indirekten Dimension  $\omega_2$  unter der *sensitivity enhancement* Version geführt [19-21]. Alle Pulssequenzen sind im Anhang I A-F in Textform enthalten.

### 2.2.3 Datenanalyse

Zur Analyse der Spektren und Extraktion der Signalintensitäten wurde das Programm *Sparky* genutzt [25]. Die Auswertung der Daten und die Übersetzung der Raten in Torsionswinkel wurde mit dem Programm *Mathematica* durchgeführt [26].

Die kreuz-korrelierten Relaxationsraten  $\Gamma_{CH,P}^{DD,CSA}$  hängen von dem Projektionswinkel zwischen dem CH-Dipolvektor und den Komponenten des  $^{31}\text{P}$ -CSA-Tensors ab (Gl. 1). Für diese Arbeit wurden die Größe und die Orientierung der  $^{31}\text{P}$ -CSA aus den kürzlich veröffentlichten DFT-Rechnungen der  $^{31}\text{P}$ -CSA in RNA übernommen [15]. Die für A-Typ RNA (Konformationsklasse 20) resultierende Größe für den  $^{31}\text{P}$ -CSA-Tensor ist in guter Übereinstimmung mit den neusten Messungen an einer GC-20mer Duplex-RNA mittels Festkörper-NMR (Tabelle 2-1) [27].

Die Beziehung zwischen den  $\Gamma$ -Raten und den involvierten Torsionswinkeln wurde theoretisch auf der Basis der linearen Algebra hergeleitet. Die eingesetzten Winkel für das RNA-Rückgrat wurden aus dem CNS-Kraftfeld übernommen (Anhang II). Die Orientierung des  $^{31}\text{P}$ -CSA-Tensors im Molekül-Koordinatensystem  $A_{x,y,z}$  der Phosphatgruppe, die mit dem Phosphoratom im Ursprung liegt (Abbildung 2-2), ist in der Tabelle 2-2 dargestellt. Die genaue Definition des Molekülkoordinatensystems wurde übernommen aus der Arbeit von Herzfield et al., 1978 [14]. Die räumliche Orientierung der CH-Bindungsvektoren relativ zur Phosphatgruppe wurde als Funktion der Torsionswinkel mithilfe von Drehmatrizen beschrieben (Anhang II). Die aufgestellten Funktionen für die verschiedenen CH-Dipole des RNA-Rückgrats wurden mit einer gegebenen pdb-Struktur der 14mer RNA überprüft. Die Abbildung 2-4 zeigt Diagramme mit übereinstimmender Korrelation der gerechneten Winkel und den Winkeln aus der pdb-Struktur. Somit ist gesichert, dass die aufgestellte Funktion mathematisch einwandfrei ist und für die Berechnung der Raten eingesetzt werden kann.

Tabelle 2-1: Experimentell und theoretisch ermittelte Größe des  $^{31}\text{P}$ -CSA-Tensors.

$^{31}\text{P}$ -CSA-Tensor in RNA		Axiale Komponenten [ppm]		
		$\sigma_{11}$	$\sigma_{22}$	$\sigma_{33}$
Experimenteller $^{31}\text{P}$ -CSA-Tensor aus BDEP <sup>a,b</sup>		-76,0	-16,0	103,0
Experimenteller $^{31}\text{P}$ -CSA-Tensor aus GC-20mer-Duplex-RNA <sup>b</sup>		-86,4	-23,8	115,0
Theoretischer $^{31}\text{P}$ -CSA-Tensor in verschiedenen RNA-Konformationsklassen <sup>c</sup>				
A-Typ RNA	Nicht A-Typ RNA			
	8	-88,3	-21,9	110,1
	17	-85,1	-22,2	107,4
	11	-81,8	-21,2	103,0
	20	-86,3	-26,0	112,4
	22	-84,7	-21,0	105,7
	30	-76,7	-23,5	100,2

a) Bariumdiethylphosphat b) Messung mit Festkörper-NMR einer gefriergetrockneten Probe. c) Definition der Konformationsklassen siehe (Anhang I-O, Tabelle I-1).

Tabelle 2-2: Orientierung der axialen Komponenten ( $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$ ,  $\sigma_{33}$ ) des  $^{31}\text{P}$ -CSA-Tensors (DFT gerechnet) im Molekülkoordinatensystem  $A_{x,y,z}$  der Phosphatgruppe.

A-Typ RNA				
$^{31}\text{P}$ -CSA	$A_{x,y,z}$	x	y	z
	$\sigma_{11}$		0,999	0,032
$\sigma_{22}$		0,032	-0,999	0,0259
$\sigma_{33}$		0,006	-0,025	-0,9996

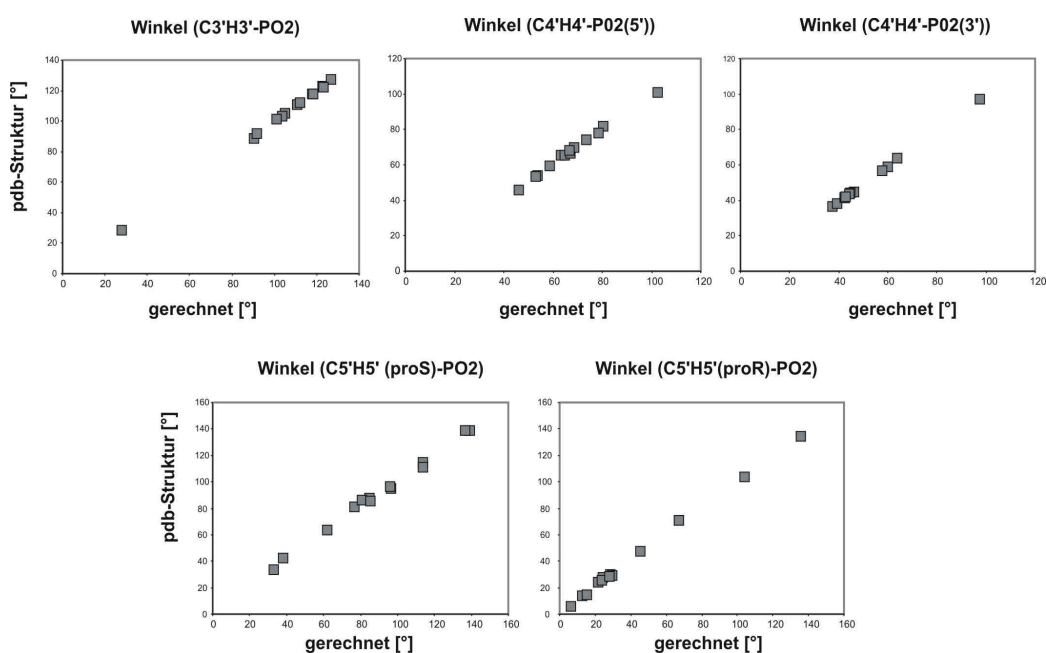


Abbildung 2-4: Überprüfung des Vektormodells mit der pdb-Struktur der 14mer RNA. Gezeigt ist die Korrelation der Winkel zwischen den CH-Bindungsvektoren ( $\text{CH3}'$ ,  $\text{CH4}'$ ,  $\text{CH5}'/\text{H5}''$ ) und dem  $\text{PO2}$ -Bindungsvektor der Phosphatgruppe für das gerechnete Vektormodell und die pdb-Struktur.

Im nächsten Schritt wurde der Projektionswinkel zwischen dem CH-Dipol und den axialen Komponenten des  $^{31}\text{P}$ -CSA-Tensors über das skalare Produkt berechnet und in Gleichung 1 eingesetzt, um die Abhängigkeit der Rate von den Torsionswinkeln zu erhalten. Die Raten  $\Gamma_{C5'iH5'i(\text{proS}),P_i}^{DD,CSA} / \Gamma_{C5'iH5'i(\text{proR}),P_i}^{DD,CSA}$  hängen beispielsweise von den Torsionswinkeln  $\alpha$  und  $\beta$  ab, während die Rate  $\Gamma_{(C3'iH3'i),P_{i+1}}^{DD,CSA}$  von den Torsionswinkeln  $\epsilon$  and  $\zeta$  bestimmt wird. Der  $\text{C4}'\text{H4}'$ -Dipol interagiert mit der CSA des eigenen und des nachfolgenden Phosphoratoms ( $^{31}\text{P}_i$ ,  $^{31}\text{P}_{i+1}$ ). Die erhaltenen Relaxationsraten  $\Gamma_{(C4'iH4'i),P_i}^{DD,CSA}$  und  $\Gamma_{(C4'iH4'i),P_{i+1}}^{DD,CSA}$  sind daher jeweils durch drei Torsionswinkel  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bzw.  $\delta$ ,  $\epsilon$  und  $\zeta$  beeinflusst. Die Korrelation zwischen  $\Gamma_{CH,P}^{DD,CSA}$  und den Torsionswinkeln lässt sich als 2D bzw. 3D Konturendiagramm darstellen (Abbildung 2-5). Um die Winkelabhängigkeit von  $\Gamma_{(C4'iH4'i),P_i}^{DD,CSA}$



und  $\Gamma_{(C4',H4'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$  als 2D-Konturendiagramme darzustellen, wurden die Winkel  $\delta$  und  $\gamma$  entsprechend ihrer dominierenden Konformation in der RNA konstant gehalten. Für den Winkel  $\delta$  wurden die Hauptkonformationen des Zuckers (C3'- und C2'-endo) mit den Werten  $80^\circ$  und  $150^\circ$  gewählt. Der Winkel  $\gamma$  wird mit drei Konformationen (*trans* und  $\pm$ - *gauche*) repräsentiert.

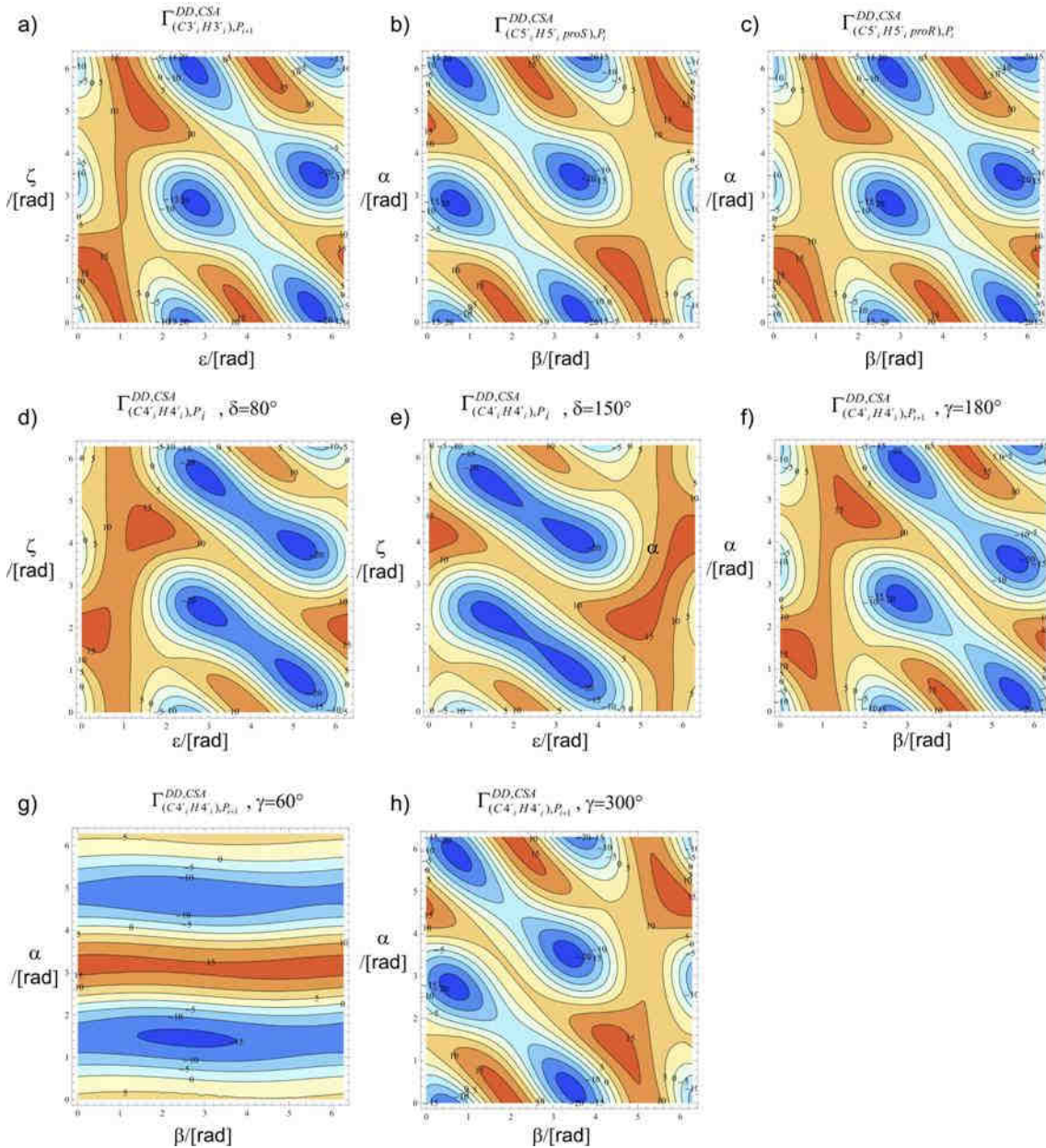


Abbildung 2-5: Winkelabhängigkeit der  $\Gamma_{(C3',H3'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$  (a),  $\Gamma_{(C5',H5',proS),P_i}^{DD,CSA}$  (b),  $\Gamma_{(C5',H5',proR),P_i}^{DD,CSA}$  (c),  $\Gamma_{(C4',H4'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$  mit  $\delta=80^\circ$  (d) und  $\delta=150^\circ$  (e),  $\Gamma_{(C4',H4'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$  mit  $\gamma=180^\circ$  (f),  $\gamma=60^\circ$  (g) und  $\gamma=300^\circ$  (h) dargestellt als 2D-Konturendiagramm.

Tabelle 2-3: Übersicht der *Mathematica*-Skripte (Anhang I) zur Auswertung der  $\Gamma$ -Raten.

Geometrische Beschreibung der CH-Bindungsvektoren im $^{31}\text{P}$ -Koordinatensystem			
Bindungsvektor (Dipol)	Winkel	Skript-Name (Anhang I)	
$\text{C3}'\text{-H3}' - \text{P}_i$	$\varepsilon, \zeta$	G	
$\text{C4}'\text{-H4}' - \text{P}_i$	$\alpha, \beta, \gamma$	H	
$\text{C4}'\text{-H4}' - \text{P}_{i+1}$	$\varepsilon, \zeta$	I	
$\text{C5}'\text{H5}'(\text{proR})\text{-P}_i$	$\alpha, \beta$	J	
$\text{C5}'\text{H5}'(\text{proS})\text{-P}_i$	$\alpha, \beta$	K	
Auswertung der $\Gamma$ -Raten			
Eingabe 1 ( $\Gamma$ -Rate)	Eingabe 2	Ausgabe	Skript-Name (Anhang I)
$\Gamma_{(\text{C3}'\text{H3}')\text{,P}_{i+1}}^{DD,CSA}$	$\varepsilon$	$\zeta$	L
$\Gamma_{(\text{C4}'\text{H4}')\text{,P}_{i+1}}^{DD,CSA}$	$\zeta$	$\varepsilon$	M
$\Gamma_{(\text{C3}'\text{H3}')\text{,P}_{i+1}}^{DD,CSA}, \Gamma_{(\text{C4}'\text{H4}')\text{,P}_{i+1}}^{DD,CSA}$	/	$\varepsilon, \zeta$	N
$\Gamma_{\text{C5}'\text{H5}'(\text{proS})\text{,P}_i}^{DD,CSA} / \Gamma_{\text{C5}'\text{H5}'(\text{proR})\text{,P}_i}^{DD,CSA}$	$\beta$	$\alpha$	J/K
$\Gamma_{(\text{C4}'\text{H4}')\text{,P}_i}^{DD,CSA}$	$\beta, \gamma$	$\alpha$	H

## 2.3 Ergebnisse

Die neue Pulssequenz wurde für die 14mer cUUCGg-*Tetraloop* RNA angewendet. Die Struktur des cUUCGg-*Tetraloop* RNA wurde eingehend mit den Methoden der NMR- und Röntgenspektroskopie untersucht [10-11, 16, 27-32] und bietet sich als ein ideales Modellsystem an. In früheren Arbeiten wurden  $^{13}\text{C}$ -Relaxationsuntersuchungen durchgeführt, so dass die Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  bekannt ist [16]. Die für die Konformationsanalyse der Raten benötigten Torsionswinkel  $\beta$  und  $\varepsilon$  wurden über die Messung der  $^3\text{J}(\text{H},\text{P})$  und  $^3\text{J}(\text{C},\text{P})$  Kopplungskonstante ermittelt, wie es im Kapitel 3 noch weiter vorgestellt wird [33]. Die Abbildung 2-6 zeigt das gut aufgelöste Spektrum des quantitativen 2D- $\Gamma$ -HC(P)-Experiments und die  $^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ -Ebene des quantitativen 3D- $\Gamma$ -H(C)P-Experiments. Wie den 1D-Projektionen zu entnehmen ist, gibt das Kreuzexperiment intensive Kreuzsignale, so dass die kreuz-korrelierten Relaxationsraten mit hoher Genauigkeit ermittelt werden können. In dem 2D- $\Gamma$ -HC(P)-Experiment (Abbildung 2-6 A) präsentieren die resultierenden Raten für die C5'H5'-Gruppe einen Mittelwert über die  $\Gamma_{(\text{C5}'\text{H5}'\text{proR})\text{,P}_i}^{DD,CSA}$  und  $\Gamma_{(\text{C5}'\text{H5}'\text{proS})\text{,P}_i}^{DD,CSA}$  der beiden Methylenwasserstoffe. Das Gleiche ist der Fall für die  $\Gamma_{(\text{C4}'\text{H4}')\text{,P}_i}^{DD,CSA}$  und  $\Gamma_{(\text{C4}'\text{H4}')\text{,P}_{i+1}}^{DD,CSA}$ , welche über die Beiträge der beiden Phosphor- atome summiert werden, weil sie ohne die  $^{31}\text{P}$ -chemische Verschiebung nicht aufgelöst werden können. Trotz der Mittelung enthalten sie Informationen über die Konformation, wie in der Diskussion erläutert wird. Die Raten der C4'H4'-Gruppe sind dagegen in dem  $^{31}\text{P}$  aufgelösten 2D- $\Gamma$ -H(C)P mit nur vier überlagernden Signalen, die im 3D- $\Gamma$ -HCP einschließlich der  $^{13}\text{C}$ -Dimension getrennt werden können, zugänglich.

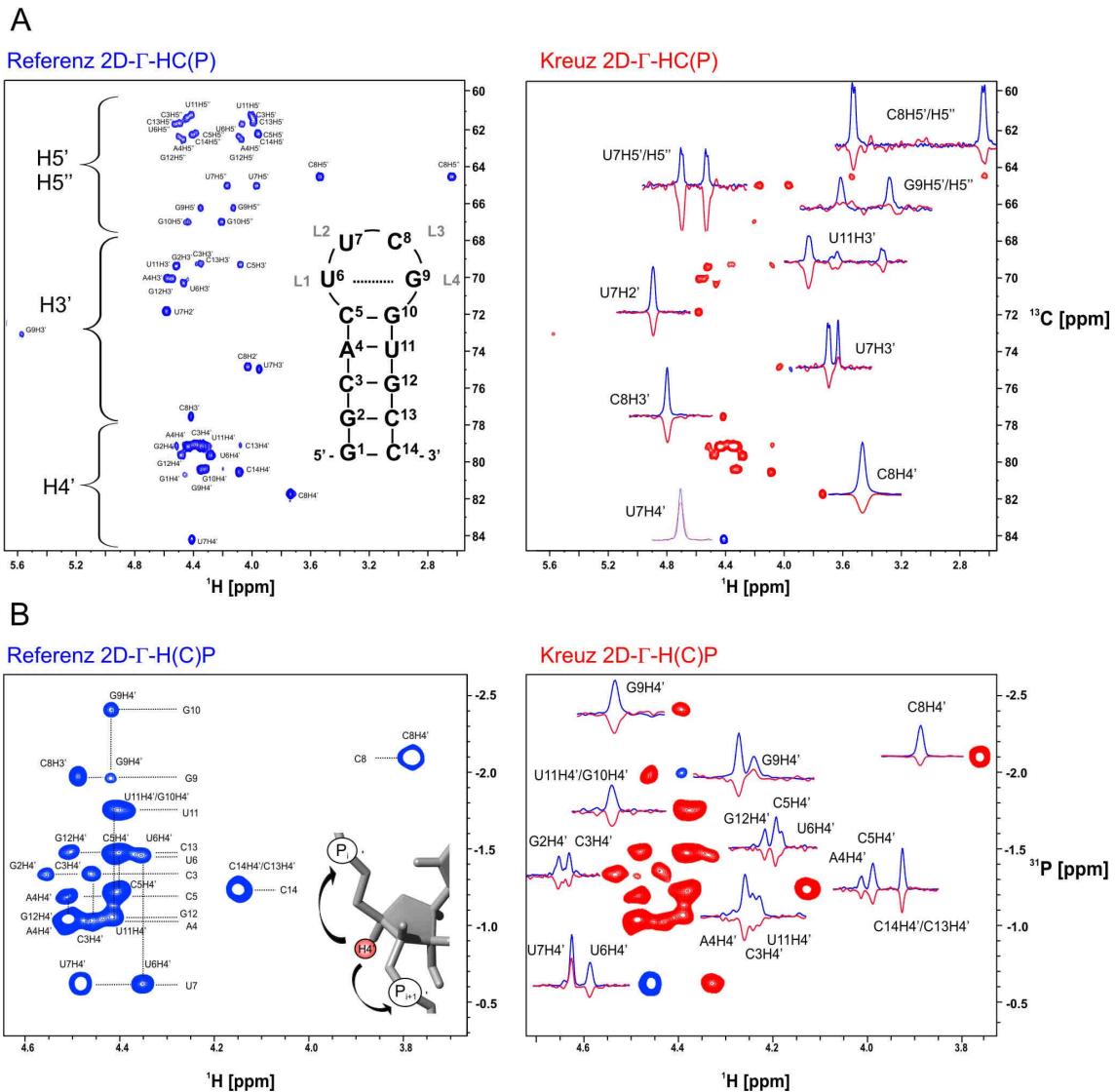


Abbildung 2-6: 14mer-*Tetraloop* RNA: 2D- $\Gamma$ -HC(P)/2D- $\Gamma$ -H(C)P Spektren der Referenz- und Kreuzexperimente, aufgenommen am AV600 MHz Spektrometer mit einem  $^1\text{H}(^{13}\text{C}, ^{31}\text{P})$ -TCI Kryoprobekopf (z-Gradienten) und bei einer Temperatur von 298 K. Die  $^{13}\text{C}$ - und  $^{31}\text{P}$ -Frequenz wurde auf 77 ppm bzw. -1,5 ppm gesetzt. Alle Wasserstoffpulse wurden auf der Wasserresonanz angewendet. Die Feldstärke für die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Pulse betrug 23,8 kHz bzw. 16,7 kHz. Während der Aufnahme wurde GARP-Entkopplung mit der Feldstärke von 2,5 kHz und 0,8 kHz für  $^{13}\text{C}$  und  $^{31}\text{P}$  Kerne angelegt. A.  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -2D- $\Gamma$ -HC(P). Links: Referenzexperiment und die schematische Darstellung der Sekundärstruktur der 14mer RNA. Die Nukleotide des *Loops* sind zusätzlich mit L1-L4 notiert und das *trans*-wobble Basenpaar ist mit einer gestrichelten Linie angedeutet. Rechts: das Spektrum des Kreuzexperiments mit 1D-Projektionen aus dem Referenzexperiment (blau) und dem Kreuzexperiment (rot) für ausgewählte Signale. Das Referenzexperiment wurde aufgenommen mit 32 *Scans*, 80 und 2 k komplexen Punkten in  $t_1$  und  $t_2$  bei einer Dauer von 1 h. Die Aquisitionszeit betrug 170 ms und  $t_1^{\text{max}}$  10 ms. Das Relaxationsintervall  $d_1$  wurde auf 1,25 s gesetzt. Das Kreuzexperiment wurde für 17 h mit 512 *Scans* aufgenommen. B. Das Spektrum des quantitativen  $^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ -2D- $\Gamma$ -H(C)P-Experiments selektiv für die C4'/H4' Gruppe. Links: Referenzexperiment. Horizontale Linien verbinden Signale, die zu dem gleichen Phosphoratom gehören, vertikale Linien verbinden Signale des gleichen H4'-Wasserstoffs, der mit dem eigenen und nachfolgenden Phosphat wechselwirkt, wie im nebenstehenden Nukleotid bildhaft gezeigt. Das Referenzexperiment wurde aufgenommen mit 256 *Scans*, 4,5 h mit 20 und 2 k komplexen Punkten in jeweils  $t_1$  und  $t_2$ . Das Kreuzexperiment wurde für 35 h mit 2 k *Scans* aufgenommen.

Tabelle 2-4: Gemessene kreuz-korrelierte Relaxationsraten für die 14mer cUUCGg-Tetraloop RNA.

	$\Gamma_{(C3',H3'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$ <sup>a</sup>	$\Gamma_{(C4',H4'),P_i}^{DD,CSA}$ <sup>b</sup>	$\Gamma_{(C4',H4'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$ <sup>b</sup>	$\Gamma_{(C5',H5',proR),P_i}^{DD,CSA}$ <sup>a</sup>	$\Gamma_{(C5',H5',proS),P_i}^{DD,CSA}$ <sup>a</sup>
	[Hz]	[Hz]	[Hz]	[Hz]	[Hz]
Exp.	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C-2D- Γ-HC(P)	<sup>1</sup> H, <sup>31</sup> P-2D-Γ-H(C)P, <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, <sup>31</sup> P-3D-Γ-HCP	<sup>1</sup> H, <sup>31</sup> P-2D-Γ-H(C)P, <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, <sup>31</sup> P-3D-Γ-HCP	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, <sup>1</sup> H - 3D-Γ-HC(P)	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, <sup>1</sup> H- 3D-Γ-HC(P)
Rest					
G1 <sup>c</sup>	/ <sup>c</sup>	/ <sup>c</sup>	/ <sup>c</sup>	/ <sup>c</sup>	/ <sup>c</sup>
G2 <sup>c</sup>	/ <sup>c</sup>	/ <sup>c</sup>	-17,7 ± 0,7	n.d.	n.d.
C3	-6,3 ± 1,1	-14,1 ± 1,8	-17,4 ± 0,7	-5,9 ± 1,1	4,7 ± 1,0
A4	-6,5 ± 1,2	-12,7 ± 3,4	-17,3 ± 1,0	n.d.	n.d.
C5	-4,8 ± 0,9	-14,3 <sup>a</sup> ± 3	-16,3 ± 1,0	-4,2 ± 0,8	2,7 ± 0,6
U6	-4,6 ± 0,8	-13,8 ± 1,0	-12,0 ± 0,7	-2,0 ± 0,4	3,4 ± 0,7
U7	1,2 ± 0,2	14,3 ± 0,8	n.d.	-10,4 ± 1,9	-7,7 ± 1,7
C8	-3,7 ± 0,7	-8,1 ± 0,5	n.d.	-8,3 ± 1,5	2,5 ± 0,6
G9	-4,3 ± 0,8	12,5 ± 1,6	-15,0 ± 1,1	4,6 ± 0,8	-0,4 ± 0,1
G10	n.d.	n.d.	-17,7 ± 3	-2,4 ± 0,4	-0,2 ± 0,0
U11	-6,2 ± 1,1	-17,3 <sup>a</sup> ± 3	-15,8 ± 2,6	-1,2 ± 0,2	6,5 ± 1,4
G12	-4,7 ± 0,9	-18,1 <sup>a</sup> ± 3	-16,2 ± 3	-3,2 ± 0,6	1,8 ± 0,4
C13	-3,7 ± 0,7	-18,3 <sup>a</sup> ± 3	n.d.	-5,4 ± 1,0	4,3 ± 1,0
C14 <sup>d</sup>	/ <sup>d</sup>	-15,7 ± 1,8	/ <sup>d</sup>	-5,4 ± 1,0	4,2 ± 0,9

$\Gamma_{(C2',H2'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$  konnten für die Reste U7 und C8 mit  $-3,2 \pm 0,6$  Hz and  $-3,0 \pm 0,6$  Hz gemessen werden.

- a) Die Berechnung der Fehler basiert auf der Annahme, dass die Signalintensität im Durchschnitt um 10% variiert. b)  $\Gamma_{(C4',H4'),P_i}^{DD,CSA} / \Gamma_{(C4',H4'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$  wurde in den Experimenten <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P-3D-Γ-HCP und <sup>1</sup>H, <sup>31</sup>P-2D-Γ-H(C)P gemessen und gemittelt. c) Die <sup>31</sup>P-Signale der Nukleotide G1 und G2 sind wegen höherer Flexibilität nicht detektierbar. d) Das terminale Nukleotid C14 endet mit einer 3'OH Gruppe und es gibt dementsprechend keine Raten.

Die Tabelle 2-4 fasst alle Relaxationsraten, die für die 14mer cUUCGg-Tetraloop RNA in den 2D- und 3D-Γ-HCP-Experimenten gemessen wurden, zusammen. Insgesamt konnten 52 von 65 möglichen kreuz-korrelierte Relaxationsraten ermittelt werden. Für Nukleotide des helikalen Bereichs zeigen alle Raten bis auf die  $\Gamma_{C5',H5',(proS),P_i}^{DD,CSA}$  ein negatives Vorzeichen, wie es für die A-RNA Konformation vorhergesagt wird.

### Übersetzung der kreuz-korrelierten Relaxationsraten in Torsionswinkeln

Die Übersetzung der kreuz-korrelierten Relaxationsraten in Winkel kann bis zu vierfach entartet sein. Deshalb sollen zur Analyse der Raten auch andere NMR-Daten wie NOEs zur Ermittlung der zutreffenden Konformation herangezogen werden. In der Abbildung 2-7 ist die empfohlene Vorgehensweise schematisch dargestellt.

Die Abbildung 2-7 B zeigt die durchschnittliche Streuung der Winkel, wie sie in dem Strukturbündel, das nur mit NOE-Abstandsbeschränkungen berechnet wurde, vorgefunden wird. Es wird deutlich, dass die Winkel des Rückgrats aufgrund wenig vorhandener NOE-Kontakte schlechter definiert sind.

Es lassen sich auch Unterschiede feststellen. Während  $\alpha$  und  $\gamma$  eine große Streuung bis zu  $40^\circ$  zeigen, so ist die Ungenauigkeit des Winkels  $\zeta$  klein genug, um den tatsächlichen Winkel vorherzusagen.

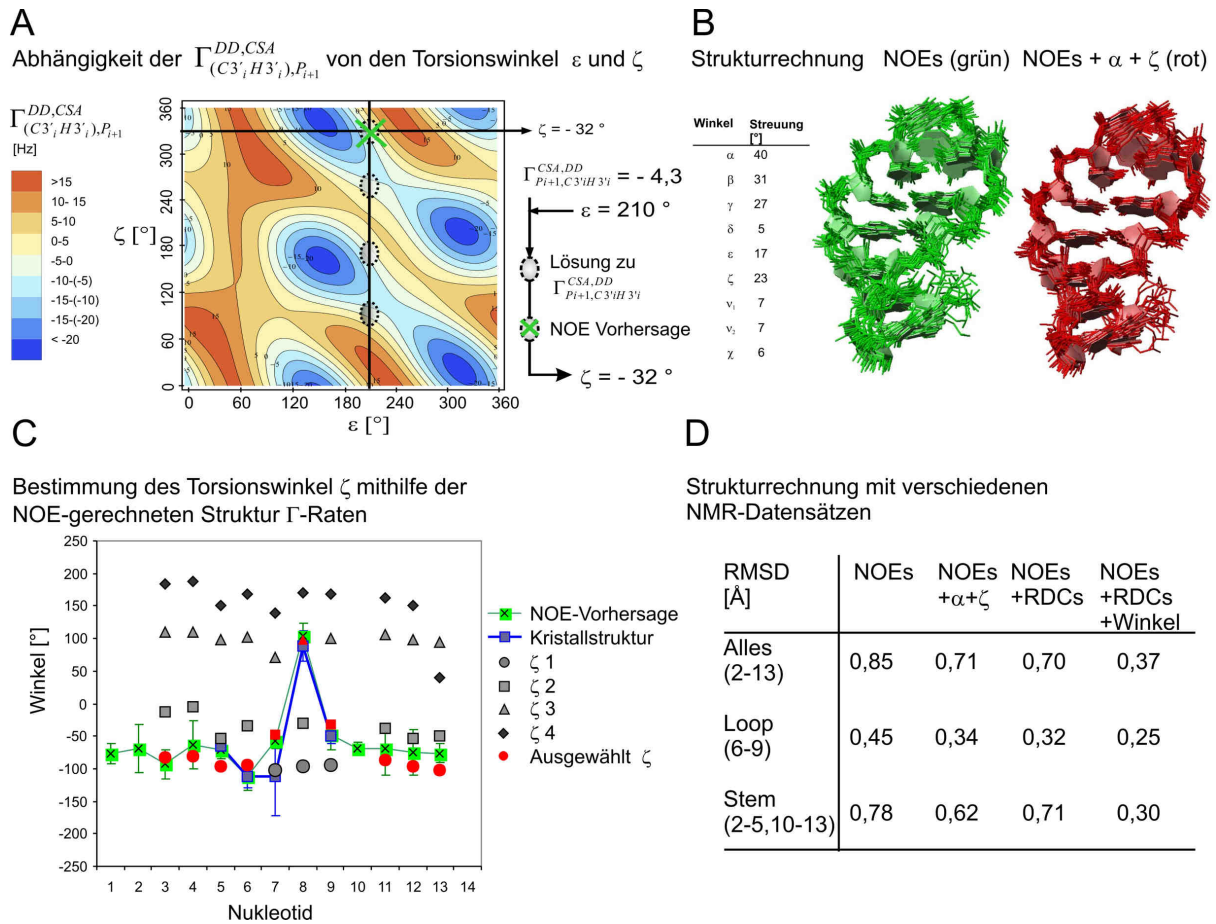


Abbildung 2-7: A. Für  $\Gamma_{(C3',H3'),P_{i+1}}^{DD,CSA} = -4,3$  Hz sind vier Winkelkombinationen aus  $\varepsilon$  und  $\zeta$  möglich, kennzeichnet mit den gestrichelten Kreisen. Die Vorhersage anhand der Struktur, die nur mit NOE-Abstandsbeschränkungen gerechnet wurde, lässt die Auswahl auf den Torsionswinkel  $\zeta = -32^\circ$  fallen. B. Das Strukturbündel gerechnet mit nur NOE-Abstandsbeschränkungen (grün) und NOE-Abstandsbeschränkungen +  $\alpha$  +  $\zeta$  (rot). Die Standardabweichung der Winkel innerhalb der NOE-Struktur ist in der Tabelle links angezeigt. C. Die Bestimmung der Torsionswinkel  $\zeta$  aus  $\Gamma_{(C3',H3'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$  ( $\zeta$ 1-  $\zeta$ 4, grau), wobei der für die Strukturrechnung ausgewählte Wert in rot hervorgehoben ist. Die NOE-Vorhersage aus der Strukturrechnung ist in grün angegeben. Fehlerbalken quantifizieren die Streuung innerhalb des Strukturbündels mit 20 Strukturen. D. Die RMSD-Werte für Strukturbündel, die mit verschiedenen NMR-Datensätzen gerechnet wurden.

Die Schwierigkeit, den Winkel  $\alpha$  aus den NOE-Daten abzuschätzen, wird durch das Vorhandensein von zwei Raten der Methylgruppe reduziert. Die weitere Analyse basiert auf der Annahme, dass eine rigide Konformation des Phosphordiesterückgrats vorliegt [27]. Der Torsionswinkel  $\alpha$  kann aus drei

Raten ( $\Gamma_{(C5',H5'proR),P_i}^{DD,CSA}$ ,  $\Gamma_{(C5',H5'proS),P_i}^{DD,CSA}$ ,  $\Gamma_{(C4',H4'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$ ) und dem Torsionswinkel  $\beta$ , der aus den heteronuklearen  $^3J(C,P)$  und  $^3J(H,P)$  Kopplungskonstanten ermittelt wurde, sowie dem Winkel  $\gamma$ , ermittelt aus  $^3J(H,H)$  Kopplungskonstanten, bestimmt werden. Die kreuz-korrelierten Relaxationsraten der C3'H3'- und C4'H4'-Gruppe zu dem nachfolgenden  $^{31}P$ -Atom ( $\Gamma_{(C3',H3'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$ ,  $\Gamma_{(C4',H4'),P_i}^{DD,CSA}$ ) beinhalten die Information über den Torsionswinkel  $\zeta$ . Die Torsionswinkel  $\delta$  und  $\epsilon$  sind aus den heteronuklearen  $^3J(HP)/^3J(CP)$  Kopplungskonstanten und der Zuckerkonformation, die mit kreuz-korrelierten Relaxationsraten bestimmt wurden, bekannt [8]. Für die Analyse von  $\Gamma_{(C4',H4'),P_i}^{DD,CSA}$  und  $\Gamma_{(C4',H4'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$  wurden die kanonischen Torsionswinkel für  $\gamma$  und  $\delta$  angenommen. Einige der  $\Gamma_{(C4',H4'),P_i}^{DD,CSA}$  sind höher als erwartet. Für diese Fälle wurde die Konformation zu dem nächst liegenden Maximum gesetzt, das in der Nähe der erwarteten Konformation liegt.

Tabelle 2-5: Vergleich der Torsionswinkel  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  and  $\zeta$ , die mittels NMR ermittelt wurden, und den Torsionswinkel aus den Kristallstruktur für den *Tetraloop* (cUUCGg).

	NMR				Kristallstruktur des cUUCGg- <i>Tetraloops</i> , (1f7y, 1fjg, 1i6u)			
	$\alpha^a$ [°]	$\beta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\zeta^a$ [°]	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\epsilon$ [°]	$\zeta$ [°]
NMR Parameter	$\Gamma_{(C5',H5'proR),P_i}^{DD,CSA}$ $\Gamma_{(C5',H5'proS),P_i}^{DD,CSA}$ $\Gamma_{(C4',H4'),P_i}^{DD,CSA}$	$^3J(C,P)$ $^3J(H,P)$	$^3J(C,P)$ $^3J(H,P)$	$\Gamma_{(C3',H3'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$ $\Gamma_{(C4',H4'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$				
Rest								
G1	/ <sup>c</sup>	180 ± 40	228 ± 20	/ <sup>c</sup>				
G2	/ <sup>c</sup>	180 ± 40	n.d.	/ <sup>e</sup>				
C3	-83 ± 5 (35)	177 ± 30	194 ± 40	-80 ± 3 (50)				
A4	n.d.	/	189 ± 20	-79 ± 1 (30)				
C5	-86 ± 8 (25)	176 ± 15	220 ± 15	-66 ± 11 (30)		173 ± 4	211 ± 2	-65 ± 3
U6	-85 ± 6 (35)	176 ± 25	207 ± 15	-100 ± 7 (30)	-66 ± 4	180 ± 4	204 ± 10	-111 ± 18
U7	176 ± 7 (60)	180 ± 60	300 ±	-48 <sup>b</sup> (30)	161 ± 65	179 ± 32	324 ± 80	-112 ± 60
C8	-74 ± 15 (35)	184 ± 20	215 ± 60	99 <sup>b</sup> (60)	-66 ± 21	167 ± 36	267 ± 30	89 ± 23
G9	76 <sup>d</sup> ± 7 (50)	/ <sup>d</sup>	212 ± 15	-46 ± 14 (30)	64 ± 18	187 ± 25	220 ± 17	-49 ± 12
G10	-94 <sup>d</sup> ± 9 (50)	/ <sup>d</sup>	194 ± 40	-75 <sup>b</sup> (40)	-101 ± 75	164 ± 50		
U11	-85 ± 3 (40)	184 ± 30	212 ± 20	-83 ± 4 (30)				
G12	-81 <sup>b</sup> (40)	n.d.	217 ± 20	-97 ± 0 (30)				
C13	-84 ± 5 (35)	180 ± 20	217 ± 20	-102 <sup>b</sup> (50)				
C14	-84 ± 5 (60)	175 ± 40	/ <sup>f</sup>	/ <sup>f</sup>				

a) Die Torsionswinkel wurden aus den Ergebnissen der verschiedenen Relaxationsraten gemittelt. Der Fehler gibt die mittlere Abweichung der Winkel aus verschiedenen Raten an. In den Klammern ist der Fehler, der unter Berücksichtigung der Ungenauigkeit für die Winkel  $\beta$  und  $\epsilon$  ermittelt wurde, angegeben. Dieser Wert wurde als Toleranz für die Strukturrechnung eingesetzt. b) Die Torsionswinkel wurde aus einer  $\Gamma$ -Rate ermittelt. c) Das  $^{31}P$ -Signal für die Nukleotide G1 and G2 konnte aufgrund der höheren Flexibilität nicht detektiert werden. d) Die Kopplungskonstanten konnten weder zu einer rigiden noch zu mehreren Konformationen übersetzt werden.  $\beta$  wurde aus der Strukturrechnung, die ohne  $\alpha$  und  $\zeta$  gerechnet wurden, entnommen: (G9 (200°), G10 (180°)). e) Der Torsionswinkel konnte nicht ermittelt werden, weil  $\epsilon$  für G2 nicht bestimmt werden konnte. f) Das letzte Nukleotid C14 endet mit einer 3'OH Gruppe und weist daher keine entsprechenden Relaxationsraten auf.

Die Tabelle 2-5 fasst alle ermittelten Torsionswinkeln zusammen, die aus der Interpretation der skalaren Kopplungen und den Relaxationsraten für die 14mer cUUCGg-Tetraloop RNA ermittelt werden konnten.

Insgesamt zeigen die resultierenden Torsionswinkel für  $\alpha$  und  $\zeta$ , die aus verschiedenen Relaxationsraten ermittelt wurden, eine sehr gute Übereinstimmung, welches auf eine gute Qualität der Daten hindeutet. Die Strukturrechnung mit den erhaltenen Winkelbeschränkungen zeigt, dass der Einfluss dieser Daten auf die Strukturkonvergenz mit dem Einfluss der RDCs gleichzusetzen ist (Abbildung 2-7D).

Für den Loop-Bereich kann ein Vergleich mit den Winkeln aus den vorhandenen Kristallstrukturen vorgenommen werden (Abbildung 2-8). Die Werte für den Torsionswinkel  $\alpha$  stimmen bemerkenswert gut mit den gemittelten Werten aus den Kristallstrukturen überein, obwohl diese teilweise eine große Streuung zeigen. Diese Tatsache könnte darauf hindeuten, dass die Lösungsstruktur in eine Gleichgewichtsstruktur relaxiert, während die Kristallstrukturen eine der vielen möglichen Konformationen, die von der Gleichgewichtslage abweichen, festhalten können. Im Gegensatz zu  $\alpha$  ist der Torsionswinkel  $\zeta$  innerhalb der Kristallstrukturen bis auf das Nukleotid U7, das eine höhere Flexibilität an dieser Stelle zeigt, relativ gut definiert. Die NMR-Daten für den Torsionswinkel  $\zeta$  sind in einer guten Übereinstimmung mit den Kristallstrukturen mit der Ausnahme für das U7. Dieses überlagert nicht mit dem Mittelwert der Kristallstrukturen, sondern passt sich einer bestimmten Kristallstruktur an (1f7y) [30]. Für den Helixbereich entsprechen die Torsionswinkel  $\alpha$  und  $\zeta$  der A-Form Konformation. Die Strukturrechnung unter Verwendung aller NMR-Daten einschließlich der Torsionswinkel  $\alpha$  und  $\zeta$  resultiert in einem Strukturbündel mit einem RMSD von 0.37 Å (D), welches die Integrität der Relaxationsraten mit anderen NMR-Daten, wie NOEs und RDCs, demonstriert.

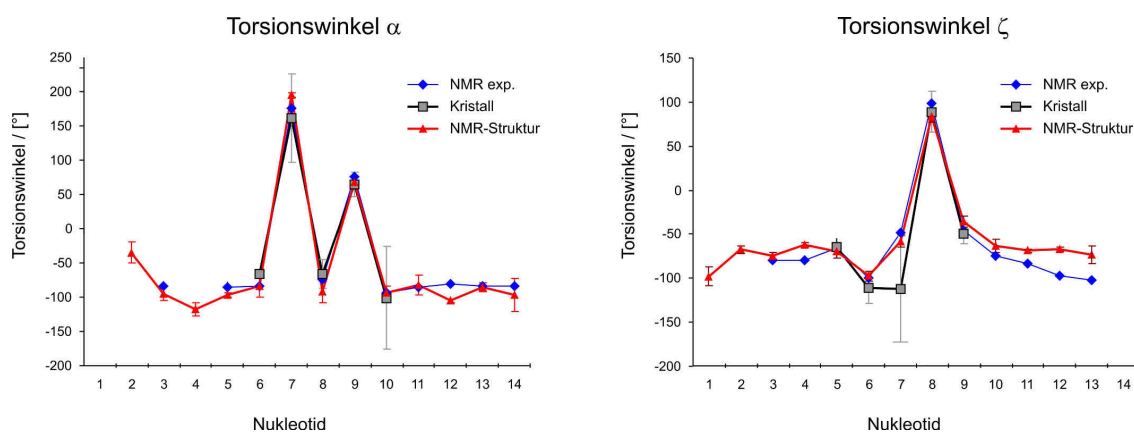


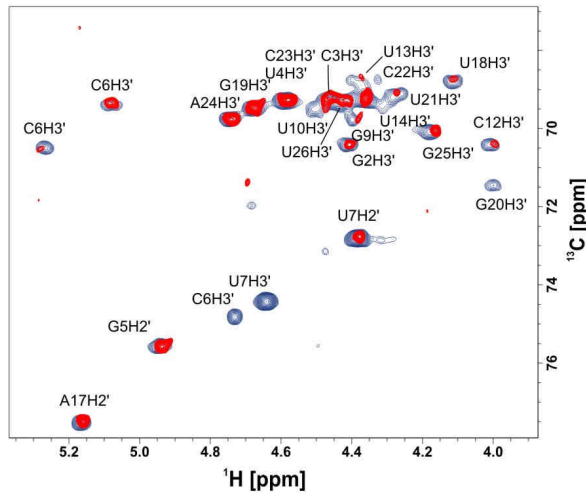
Abbildung 2-8: Vergleich der Torsionswinkel  $\alpha$  ( $O3'_{i-1}-P_i-O5'_i-C5'_i$ ) und  $\zeta$  ( $C3'_i-O3'_i-P_{i+1}-O5'_{i+1}$ ) aus NMR-Daten ( $\Gamma$ -Raten, J-Kopplungskonstante) in blau, durchschnittliche Winkel aus den Kristallstrukturen (1f7y, 1fjg, 1i6u) in grau und die Winkel aus der neuen Lösungsstruktur (2koc) in rot. Die Fehlerbalken repräsentieren die Streuung in dem jeweiligen Strukturbündel.

Für die Reste U7, C8 und G9 werden mit der ermittelten nicht kanonischen Konformation die ungewöhnlichen  $^{31}\text{P}$ -chemische Verschiebungen unterstützt. Dagegen kann die  $^{31}\text{P}$ -chemische Verschiebung für das G10 nicht mit der ermittelten Konformation erklärt werden.

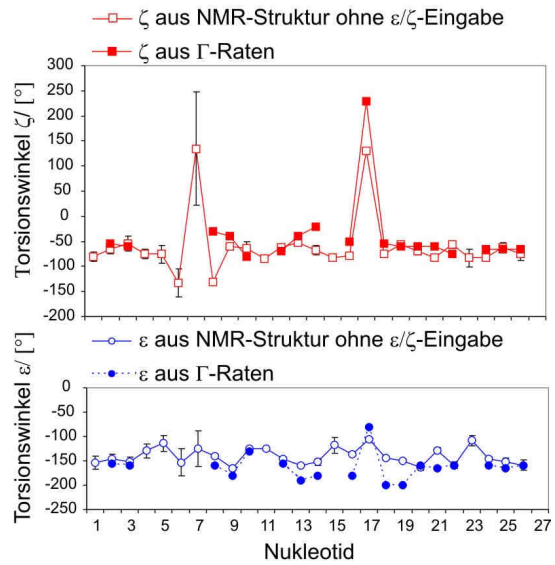
In der Abbildung 2-9 sind die Ergebnisse für die 27mer RNA zusammengefasst. Aus den gut aufgelösten Spektren konnten 23  $\Gamma_{(C3'_i H 3'_i), P_{i+1}}^{DD, CSA}$  und 17  $\Gamma_{(C4'_i H 4'_i), P_{i+1}}^{DD, CSA}$  extrahiert und in die Torsionswinkel  $\epsilon$  und  $\zeta$  für 16 von insgesamt 26 möglichen Nukleotiden umgewandelt werden ohne die  $^3\text{J}(C4', P_{i+1})$ -Kopplungen zu erfordern. Zwei zusätzliche Winkel  $\zeta$  konnten aus der Kombination der  $\Gamma_{(C3'_i H 3'_i), P_{i+1}}^{DD, CSA}$  und  $^3\text{J}(C4', P_{i+1})$ -Kopplung gewonnen werden. In der Abbildung 2-9 ist gezeigt, dass die  $\Gamma$ -Raten die vergleichbare Konformation für  $\epsilon$  und  $\zeta$  reflektieren, wie sie im Strukturbündel, dass nur aus NOEs und J-Kopplungen ohne Information über  $\epsilon/\zeta$  gerechnet wurde, beobachtet wird. Die größten Abweichungen sind für den Winkel  $\zeta$  der Nukleotide U8, U14 und A17 innerhalb der Ausbuchtungen ersichtlich.



**A** 2D- $\Gamma$ -HC(P)

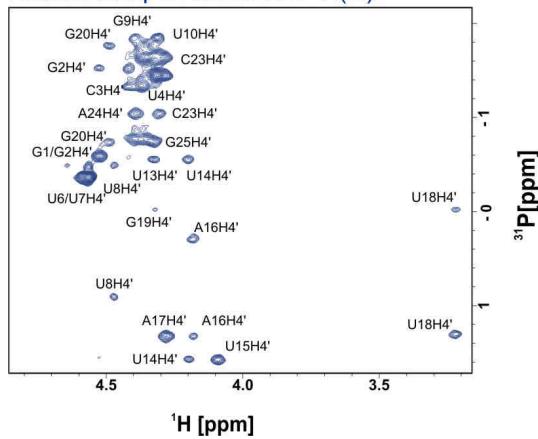


**C** Winkelanalyse für  $\epsilon$  und  $\zeta$



**B**

Referenzexperiment 2D- $\Gamma$ -H(C)P



Kreuzexperiment 2D- $\Gamma$ -H(C)P

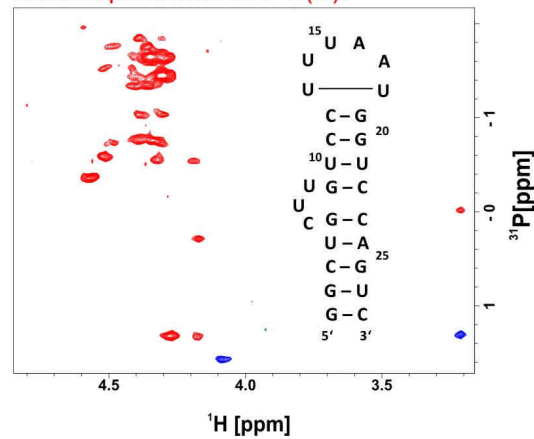


Abbildung 2-9: A.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -2D- $\Gamma$ -HC(P)-Spektre aufgenommen bei 600 MHz und 298K. Überlagerung der Kreuz- und Referenzspektren für die C3'-Region der 27mer RNA. B.  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ -2D- $\Gamma$ -H(C)P-Spektre der C4'-Region und schematische Darstellung der Sekundärstruktur der 27mer RNA. C. Analyse der Torsionswinkel  $\epsilon$  und  $\zeta$  ausgehend von  $\Gamma_{(C3'_i H 3'_i), P_{i+1}}^{DD, CSA}$  und  $\Gamma_{(C4'_i H 4'_i), P_{i+1}}^{DD, CSA}$  und der Vergleich mit den Torsionswinkel, die aus dem Strukturbündel, das ohne Eingabe der Winkel  $\epsilon$  und  $\zeta$  gerechnet wurde.

**2.4 Diskussion**

In dieser Arbeit wurde die Entwicklung von 2D- und 3D- $\Gamma$ -HCP-Experimenten, die für die CH- und  $\text{CH}_2$ -Gruppe optimiert wurden, vorgestellt. Die Methode ermöglicht die Messung von fünf CH-Dipol,  $^{31}\text{P}$ -CSA kreuz-korrelierten Relaxationsraten entlang des RNA/DNA-Rückgrats und die Bestimmung der Torsionswinkel  $\alpha$  und  $\zeta$ . Die Methode basiert auf der Messung der kreuz-korrelierten Relaxationsraten in einer quantitativen Art und Weise und wurde an der  $^{13}\text{C}$ -markierten 14mer cUUCGg-Tetraloop RNA angewandt. Die daraus folgenden Ergebnisse wurden für die Strukturrechnung der

14mer RNA eingesetzt (Kapitel 3). In dem ursprünglichen Experiment folgte die Entwicklung der  $^{13}\text{C}, ^{31}\text{P}$ -DQ/ZQ-Kohärenzen unter dem Einfluss der skalaren Kopplung  $J(\text{C},\text{H})$ , und die kreuz-korrelierte Relaxationsrate  $\Gamma_{\text{CH},\text{P}}^{\text{DD},\text{CSA}}$  entwickelte sich während einer gewählten Mischzeit [6]. Dies führte zu einem Duplett mit unterschiedlichen Intensitäten aufgrund des unterschiedlichen Relaxationsverhalten von den Komponenten  $\text{H}^\alpha$  und  $\text{H}^\beta$  des Multipletts, wie in Richter et al. vorgestellt wurde. In dem neuen Experiment findet die Entkopplung statt und führt intrinsisch zu einer höheren Auflösung und einem besseren S/N-Verhältnis. Des Weiteren erlaubt die neue Methode die Unterscheidung zwischen  $\Gamma_{(\text{C}5',\text{H}5' \text{ proR}),\text{P}_i}^{\text{DD},\text{CSA}}$  und  $\Gamma_{(\text{C}5',\text{H}5' \text{ proS}),\text{P}_i}^{\text{DD},\text{CSA}}$ , sowie zwischen  $\Gamma_{(\text{C}4',\text{H}4'),\text{P}_i}^{\text{DD},\text{CSA}}$  und  $\Gamma_{(\text{C}4',\text{H}4'),\text{P}_i}^{\text{DD},\text{CSA}}$ . Carlomagno et al. haben die Vorteile der J-aufgelösten und der quantitativen  $\Gamma$ -Experimente für die Bestimmung solcher Relaxationsraten diskutiert [34]. Es folgt daraus, dass für größere RNA der Gewinn an Auflösung und Sensitivität, der mit dem quantitativen Experiment erreicht wird, ein wichtige Verbesserung im Vergleich zu der vorherigen Methode darstellt. Das wiederum erlaubt uns die Bestimmung der Fehler auf der Basis des S/N-Verhältnisses. Fluktuationen der Signalintensität von 10% führen wegen der nahezu linearen Korrelation zwischen der Signalintensität und der Rate zu Veränderungen der Rate um ungefähr den gleichen Betrag von 10 %. Die resultierende Variation des Torsionswinkels ist meistens in der Größenordnung von wenigen Grad, weil die Korrelation zwischen dem Winkel und der Rate mit einer großen Steigung beschrieben wird.

Ein weiterer Faktor, der die Raten beeinflussen kann, ist der Orderparameter, der die kreuz-korrelierte Rate skaliert. Für höhere Raten kann ein niedriger Orderparameter eine größere Auswirkung auf den Torsionswinkel haben. Andererseits wird der Orderparameter für kleine kreuz-korrelierte Raten nur wenig Einfluss auf den Torsionswinkel ausüben. In früheren Arbeiten wurden die auto-korrelierten Orderparameter für die  $^{13}\text{C}$  Kerne des Zuckers und die  $^{31}\text{P}$ -Kerne des Rückgrats bestimmt [16]. Unter der Annahme, dass eine schnelle, nicht korrelierte Bewegung zwischen dem CH-Bindungsvektor und der Phosphatgruppe vorliegt, so kann der kreuz-korrelierte Orderparameter als Produkt der beiden Orderparameter ausgerechnet werden

$$\left( \left( {}^{\text{kreuz}} S_{\text{P},\text{C}3'\text{H}3'}^{\text{CSA},\text{DD}} \right)^2 = {}^{\text{auto}} S_{\text{P},\text{P}}^{\text{CSA},\text{CSA}} * {}^{\text{auto}} S_{\text{C}3'\text{H}3',\text{C}3'\text{H}3'}^{\text{DD},\text{DD}} \right).$$

Insgesamt zeigt der gerechnete kreuz-korrelierte Orderparameter wenig Variation innerhalb der 14mer RNA und nimmt einen Durchschnittswert von  $0,86 \pm 0,04$  an. Der kleinste kreuz-korrelierte Orderparameter liegt für das Nukleotid U7, welches den Wert 0,79 aufweist, vor und findet sich damit nur wenig unterhalb des Durchschnitts. Zusätzlich ist die für das U7 gemessene Rate klein, so dass der Effekt des Orderparameters für die Bestimmung des Torsionswinkels als klein angenommen werden kann.

Bezüglich des Magnetisierungstransfers unterscheiden sich das Referenz- und Kreuzexperiment in der zusätzlichen Periode  $\Delta''$ , welche aufgrund der Relaxationseffekte zum Verlust der Signalintensität führen kann. Von früheren Untersuchungen bei der Bestimmung von  $\Gamma_{(\text{C}6/8,\text{H}6/8),\text{N}1/\text{N}9}^{\text{DD},\text{CSA}}$  und

$\Gamma_{(C1',H1'),C2'}^{DD,CSA}$  ist bereits bekannt, dass der Effekt weniger als 1% beträgt und deshalb vernachlässigt werden kann [9, 35].

Die Präzision der extrahierten Winkel ist weiterhin von der Genauigkeit in der Bestimmung des zweiten bzw. dritten Winkels, der in der Konformationsanalyse involviert ist, abhängig. Diese Ungenauigkeiten können aufgrund einer ungeeigneten Karplus-Parametrisierung für  ${}^3J(C,P)$  und  ${}^3J(H,P)$ -Kopplungskonstante oder erhöhter Flexibilität entstehen. Die Ungenauigkeit der  ${}^3J$ -Kopplungen, die im Kapitel 3 weiter diskutiert werden, wurde in Form einer höheren Toleranz der Winkelbeschränkung bei der Strukturrechnung berücksichtigt.

Die Interpretation der Daten hängt weiterhin von der genauen Kenntnis der Größe und der Orientierung des  ${}^{31}\text{P}$ -CSA-Tensors ab. Vor Kurzem haben Precechtelova et al. die  ${}^{31}\text{P}$ -CSA in verschiedenen RNA-Konformationen mithilfe von theoretischen Rechnungen untersucht und finden, dass die Tensorkomponenten der CSA zwischen 16 und 22 ppm und die Orientierung des Tensors innerhalb des Molekülkoordinatensystems variieren [15]. Der Einfluss beider Faktoren, der Größe und der Orientierung, wurden hier analysiert. Es zeigt sich, dass für bestimmte RNA-Konformationen die Unterschiede zwar einen Einfluss auf die  $\Gamma$ -Raten haben, aber generell klein sind. Deshalb ist es in erster Linie ausreichend, wenn für alle Phosphat-Gruppen von dem gleichen  ${}^{31}\text{P}$ -CSA-Tensor ausgegangen wird.

## 2.5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine Methode für die Messung fünf verschiedener kreuz-korrelierte Relaxationsraten, die von sechs Torsionswinkeln entlang des Phosphordiesterrückgrats abhängig sind, vorgestellt. Es wurden zusätzlich skalare Kopplungen verwendet, um die  $\Gamma$ -Raten in Torsionswinkel zu übersetzen. Es muss dabei erwähnt werden, dass die  $\Gamma$ -Raten in den meisten Fällen zu mehreren Lösungen führen. Jedoch war es möglich in Verbindung mit der Strukturrechnung mit nur NOE-Daten die Auswahl der Lösungen zu beschränken und die tatsächliche Konformation zu ermitteln. Wenn die Zuckerkonformation aus anderen Daten bereits bekannt ist, so ergibt sich die vorteilhafte Situation, dass fünf experimentelle Parameter fünf Freiheitsgraden gegenüberstehen. In diesem Fall wären die Messungen der Kopplungskonstanten nicht nötig und man könnte dazu übergehen, die Relaxationsraten direkt in die Strukturrechnung einzugeben.

Schneider et al. haben die ribosomale RNA-Struktur in jeweils zwei Nukleotideinheiten unterteilt und dabei bei der Untersuchung der Konformation 18 nicht-A-Form und 14 A-Form RNA-Konformationsklassen identifiziert [1]. Diese 32 RNA Konformationsklassen wurden genutzt um theoretische kreuz-korrelierte Relaxationsraten für das erste Nukleotid zu berechnen (Abbildung 2-10, Abbildung 2-11). Zusätzlich wurden die resultierenden Raten der Gruppen C4'H4 und C5'H5', wie sie im  ${}^1\text{H}, {}^{13}\text{C}$ -2D-HC(P)-Experiment als Summe der einzelnen Raten erscheinen, bestimmt.

Jede RNA Konformationsklasse führt zu einem spezifischen Muster für die Größe und das Vorzeichen der kreuz-korrelierten Relaxationsraten, welches bereits eine qualitative Einschätzung der Konformationsklasse ohne weitere rechnerische Analyse ermöglicht. Zum Beispiel kann bereits durch die Selektion nach dem Vorzeichen der experimentellen Daten für den Helixbereich die Auswahl der Konformationsklassen auf sechs A-RNA-Konformationsklassen reduziert werden. Die  $\Gamma$ -Raten des *Loop*-Bereichs folgen keinem klaren Trend, welches auf eine nicht kanonische Konformation hindeutet. Insbesondere sind die intensiven Signale der C5'H5'-Gruppe des Nukleotids U7 im  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -2D-HC(P)-Kreuzexperiment für eine nicht kanonische Konformation indikativ, da sich dieses Signal für die meisten A-Form-Konformationen aufhebt (Abbildung 2-11 f). In dem  $^1\text{H},^{31}\text{P}$ -2D-H(C)P-Kreuzexperiment zeigen die Reste U7 und G9 positive Signale, die ebenfalls nicht für eine A-RNA-Konformation erwartet werden.

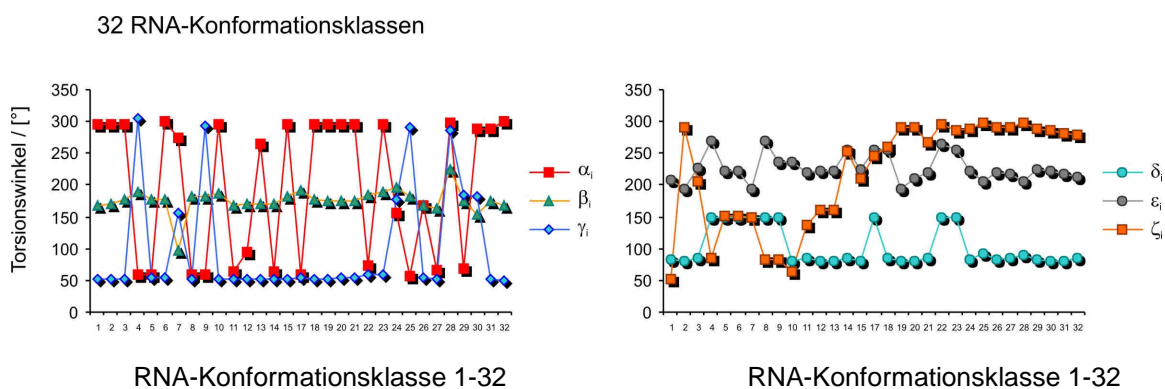


Abbildung 2-10: Charakterisierung der Konformation des ersten Nukleotids in den RNA-Konformationen 1-32 nach Schneider et al. [1].

Die Verwendbarkeit der Methode wurde bei der Strukturrechnung der 14mer *cUUCGg-TetraLoop* RNA, in welcher die Torsionswinkel  $\alpha$  und  $\zeta$  eingesetzt wurden, demonstriert. In dem Kapitel 3 wird die Strukturrechnung der 14mer-*TetraLoop* RNA vorgestellt. In Kombination mit anderen NMR-Daten (NOEs, Torsionswinkel und RDCs) konvergiert die Strukturrechnung in ein sehr präzises Strukturbündel mit einem RMSD von 0,37 Å. Resultierende Torsionswinkel  $\alpha$  und  $\zeta$  sind in einer sehr guten Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen. Die Kreuzvalidierung der experimentellen Daten und der gerechneten Struktur war für den *cUUCGg-TetraLoop* über den Vergleich mit den bisher gelösten NMR- und Kristallstrukturen möglich. Die Überlagerung der neuen Lösungsstruktur mit vorherigen Strukturen zeigt eine sehr gute Übereinstimmung.

Mit der Untersuchung der 27mer RNA wurde gezeigt, dass die Methode für größere RNA anwendbar ist. Es wurde gezeigt, dass die Torsionswinkel  $\epsilon$  und  $\zeta$  alleine aus  $\Gamma$ -Raten ermittelt werden können.

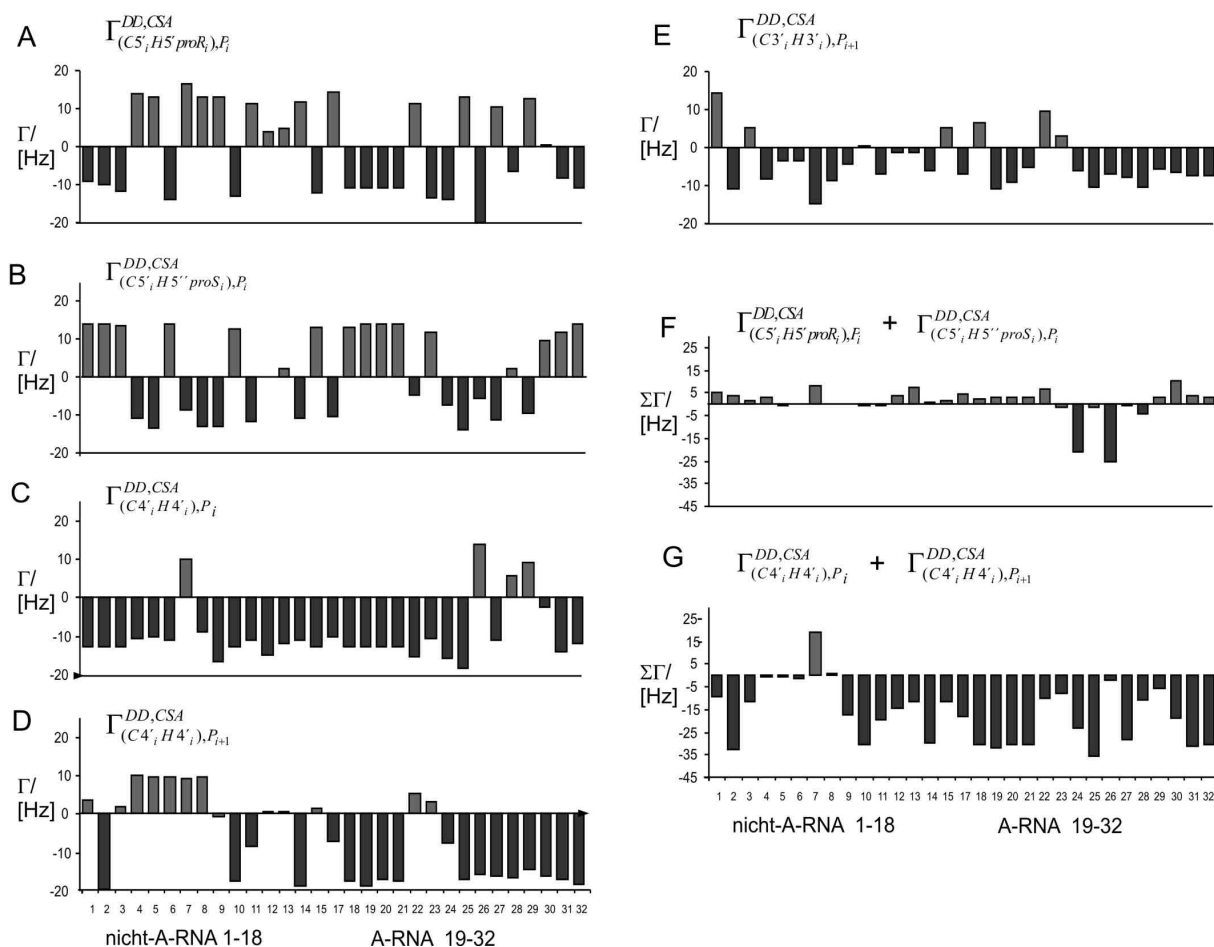


Abbildung 2-11: Theoretische Werte für  $\Gamma_{(C5',H5' proR),P_i}^{DD,CSA}$  (A),  $\Gamma_{(C5',H5' proS),P_i}^{DD,CSA}$  (B),  $\Gamma_{(C4',H4'),P_i}^{DD,CSA}$  (C),  $\Gamma_{(C4',H4'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$  (D) und  $\Gamma_{(C3',H3'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$  (E) gerechnet für das erste Nukleotid der 32 Konformationsklassen, die mit den Torsionswinkel  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  und  $\zeta$ , wie in der Abbildung 2-10 gezeigt, definiert sind. Diagramme F) und G) zeigen die Summe der  $\Gamma_{(C5',H5' proR),P_i}^{DD,CSA}$  und  $\Gamma_{(C5',H5' proS),P_i}^{DD,CSA}$ , sowie  $\Gamma_{(C4',H4'),P_i}^{DD,CSA}$  und  $\Gamma_{(C4',H4'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$ , wie sie im  $^1H$ ,  $^{13}C$ -2D-HC(P)-Experiment resultieren.

## 2.6 Literatur

1. Schneider B, Moravek Z, Berman HM. **2004**. *Nucleic Acids Res.* 32: 1666-77
2. Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore PB, Steitz TA. **2000**. *Science* 289: 905-20
3. Gorenstein DG. 1984. *Phosphorus-31 NMR: Principles and Applications* New York: Academic Press.
4. Varani G, Aboul-ela F, Allain FHT. **1996**. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 29: 51-127
5. Wu Z, Tjandra N, Bax A. **2001**. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 3617-8
6. Richter C, Reif B, Griesinger C, Schwalbe H. **2000**. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 12728-31
7. Pelupessy P, Chiarparin E, Ghose R, Bodenhausen G. **1999**. *J. Biomol. NMR* 13: 375-80
8. Felli IC, Richter C, Griesinger C, Schwalbe H. **1999**. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 1956-7
9. Duchardt E, Richter C, Ohlenschläger O, Görlach M, Wöhnert J, Schwalbe H. **2004**. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 1962-70
10. Rinnenthal J, Richter C, Ferner J, Duchardt E, Schwalbe H. **2007**. *J. Biomol. NMR* 39: 17-29

11. Fürtig B, Richter C, Bermel W, Schwalbe H. **2004**. *J. Biomol. NMR* 28: 69-79
12. Duchardt-Ferner E, Weigand J, Ohlenschläger O, Schmidtke S, Suess B, Wöhnert J. **2010**. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 49: 6216-9
13. Schmidtke SR, Duchardt-Ferner E, Weigand JE, Suess B, Wöhnert J. **2010**. *Biomol. NMR Assign.* 4: 115-8
14. Herzfeld J, Griffin RG, Hauberkorn RA. **1978**. *Biochemistry* 17: 5353-59
15. Precechtelova J, Padrta P, Munzarova ML, Sklenar V. **2008**. *J. Phys. Chem. B* 112: 3470-8
16. Ferner J, Villa A, Duchardt E, Widjajakusuma E, Wöhnert J, et al. **2008**. *Nucleic Acids Res.* 36: 1928-40
17. Marino JP, Schwalbe H, Anklin C, Bermel W, Crothers DM, Griesinger C. **1994**. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 6472-3
18. Schwalbe H, Carlomagno T, Hennig M, Junker J, Reif B, et al. **2001**. *Methods Enzymol.* 338: 35-81
19. Palmer AG, Cavanagh J, Wright PE, Rance M. **1991**. *J. Magn. Reson.* 93: 151-70
20. Kay L, Keifer P, Saarinen T. **1992**. *J. Am. Chem. Soc.* 114: 10663-5
21. Schleucher J, Schwendinger M, Sattler M, Schmidt P, Schedletzky O, et al. **1994**. *J. Biomol. NMR* 4: 301-6
22. Roehrl MH, Heffron GJ, Wagner G. **2005**. *J. Magn. Reson.* 174: 325-30
23. Shaka AJ, Barker PB, Freeman RJ. **1985**. *J. Magn. Reson.* 64: 547-52
24. Emsley L, Bodenhausen G. **1992**. *J. Magn. Reson.* 97: 135-48
25. T. D. Goddard DGK, ,, . SPARKY 3, University of California, San Francisco.
26. Mathematica W. 2007. <http://www.wolfram.com/>.
27. Rinnenthal J, Richter C, Nozinovic S, Fürtig B, Lopez J, et al. **2009**. *J. Biomol. NMR* 45: 143-55
28. Duchardt E, Schwalbe H. **2005**. *J. Biomol. NMR* 32: 295-308
29. Fürtig B, Richter C, Wöhnert J, Schwalbe H. **2003**. *Chembiochem* 4: 936-62
30. Ennifar E, Nikulin A, Tishchenko S, Serganov A, Nevskaya N, et al. **2000**. *J. Mol. Biol.* 304: 35-42
31. Tishchenko S, Nikulin A, Fomenkova N, Nevskaya N, Nikonov O, et al. **2001**. *J. Mol. Biol.* 311: 311-24
32. Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. **2000**. *Nature* 407: 340-8
33. Richter C, Reif B, Wörner K, Quant S, Marino JP, et al. **1998**. *J. Biomol. NMR* 12: 223-30
34. Carlomagno T, Griesinger C. **2000**. *J. Magn. Reson.* 144: 280-7
35. Fiala R, Czernek J, Sklenar V. **2000**. *J. Biomol. NMR* 16: 291-302

---

### 3 NMR-Lösungsstruktur der 14mer cUUCGg-Tetra $loop$

#### RNA

---

Das folgende Kapitel fasst Arbeiten zusammen, die in der Publikation Nozinovic et al. (2010) veröffentlicht wurden. Für die hier durchgeführte Strukturrechnung wurden  $^3J$ -Kopplungen,  $\Gamma$ -Raten und NOESY-Spektren verwendet, die von Dr. Boris Fürtig und Dr. Christian Richter gemessen wurden. Diese Daten wurden in der vorliegenden Arbeit zusammen mit Dr. Hendrik R. A. Jonker neu analysiert und in Torsionswinkel übersetzt. Die Strukturanalyse wurde durch die Zuordnung und Konformationsbestimmung der 2'OH-Gruppen erweitert. Die hier gezeigte Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der  $^{2h}J$ -Kopplung ist in der zitierten Veröffentlichung nicht enthalten.

Nozinovic, S., Fürtig, B., Jonker, H. R. A., Richter, C., Schwalbe, H. (2010), High-resolution NMR structure of an RNA model system: the 14-mer cUUCGg tetraloop hairpin RNA.

*Nucleic Acids Res.* 38, 683-694.





### 3.1 Einleitung

Die Möglichkeit isotopenmarkierte Oligonukleotide herzustellen, hat die NMR-Spektroskopie zu einem wertvollen Werkzeug für die Bestimmung von RNA-Strukturen in Lösung gemacht [1-4]. Eine Vielzahl an NMR-Parametern reflektiert die Struktur und die dynamischen Eigenschaften der RNA-Oligonukleotide in Lösung. Eine besondere Stärke der NMR-Spektroskopie ist die direkte Detektion der vorhandenen Wasserstoffbrücken innerhalb der Basenpaare, wodurch die Sekundärstruktur abgeleitet werden kann. Dennoch treten Schwierigkeiten bei der Strukturbestimmung von RNA mittels NMR-Spektroskopie auf. Verglichen mit Proteinen weisen RNA-Moleküle eine niedrigere Anzahl von Protonen auf, welches dazu führt, dass die Anzahl der zu messenden NOE-Kontakte geringer ist. In den meisten Fällen ist deshalb die Strukturrechnung basierend auf NOE-Signale nicht genügend, um eine präzise Strukturbestimmung zu erreichen. Hinzu kommt, dass die Anzahl der freien Torsionswinkel in RNA bedeutend höher ist als in Proteinen. Im Phosphatrückgrat der RNA befinden sich sechs frei rotierbare Bindungen, während es in Proteinen nur zwei sind. Des Weiteren gibt es drei Konformationsparameter für die Beschreibung der Riboseeinheit und der Ausrichtung der Nukleobase. Erschwerend ist außerdem, dass viele RNA-Moleküle eine längliche Form aufweisen und daher mit traditionellen, nämlich nur lokalen Strukturparametern schwer zu definieren sind.

In diesem Kapitel wird die Strukturbestimmung einer Modell-RNA, der 14mer cUUCGg-*Tetra*loop RNA, mit verschiedenen und umfassenden NMR-Datensätzen vorgestellt. Die RNA besteht aus einem Doppelstrang mit fünf Basenpaaren, welcher mit einem stabilem UUCGg-*Tetra*loop verbrückt ist (Abbildung 3-1). Die gewählte Sequenz zeichnet sich mit einer Schmelztemperatur von 74°C als eine besonders stabile Struktur aus. Dies lässt sich auf den cUUCGg-*Tetra*loop, der als das stabilste *Tetra*loop bereits bekannt ist, zurückführen [5]. Zwei definierte Struktureinheiten können betrachtet werden, zum einen der Doppelstrang in einer kanonischen A-Form Helix und zum anderen der *Tetra*loop mit einer ungewöhnlichen nicht kanonischen Konformation einschließlich des *trans*-wobble Basenpaars GU (L1-L4). Die 14mer RNA ist deshalb gut geeignet als Modellsystem für Untersuchungen der RNA-Dynamik mittels NMR-Spektroskopie und Molekulardynamik (MD)-Methoden, sowie für die Entwicklung neuer EPR- und NMR-Experimente [6-17]. Die Zuordnung der <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-, <sup>15</sup>N- und <sup>31</sup>P-Resonanzen wurde bereits veröffentlicht [12].

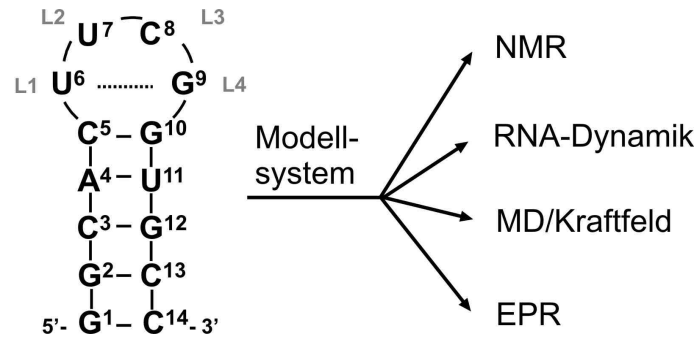


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur der 14mer cUUCGg-Tetraloop RNA. Der Tetraloop ist zusätzlich mit der Notation L1-L4 für die Loop-Nucleotide bezeichnet und das *trans*-wobble Basenpaar U6-G9 ist mit einer unterbrochenen Linie angedeutet.

Der cUUCGg-Tetraloop wurde bereits eingehend mit verschiedenen biophysikalischen Methoden untersucht, um Erkenntnisse über die ungewöhnliche thermale Stabilität zu gewinnen. Aus Untersuchungen des Schmelzvorgangs konnte geschlossen werden, dass sowohl die Anwesenheit der 2'OH-Gruppen innerhalb des Loops als auch der Aminogruppe am Nucleotid G9 wichtig sind für die ungewöhnliche Stabilität der Struktur [18]. Die erste NMR-Struktur des cUUCGg-Tetraloops in dem sequenziellen Kontext der P1 Helix der *Group-Intron I*-RNA wurde von Varani und Allain in 1995 veröffentlicht [19]. Der Einblick in die Struktur auf atomarer Ebene offenbarte die charakteristischen Merkmale der Loop-Struktur. Dazu gehört das *trans*-wobble Basenpaar (U6-G9) mit der ungewöhnlichen Wasserstoffbrücke zwischen der 2'OH-Gruppe des Zuckers am U6 und dem Sauerstoffatom der G9-Nucleobase. Des Weiteren bestehen zwei Wasserstoffbrücken zwischen der U6 (O2) und den beiden Stickstoffatomen N1 und N3 von G9. Diese Interaktionen werden als die Hauptkräfte für den Zusammenhalt der tertiären Faltung und der Stabilität des Loops betrachtet [19]. Weitere stabilisierende Kräfte beruhen auf mehreren Stapelwechselwirkungen und einer weiteren Wasserstoffbrücke zwischen der C8-Nucleobase und der Phosphatgruppe am U7. In anderen Arbeitsgruppen wurden freie MD-Simulationen mit dem cUUCGg-Tetraloop durchgeführt und die Richtigkeit der Struktur bestätigt [20]. Eingehende thermodynamische Studien von Williams and Hall zeigten, dass die 2'OH-Gruppen der jeweiligen Reste einen unterschiedlichen Beitrag zur Stabilität der Loop-Struktur beitragen. So wurde festgestellt, dass die Stabilität auch von den 2'OH-Gruppen von den Resten C8 und G9 beeinflusst wird, obwohl sie in keiner direkten Wechselwirkung innerhalb der Struktur gesehen wurden.

Die erste Kristallstruktur des cUUCGg-Tetraloops wurde im Jahr 2000 mit der Auflösung von 2,8 Å erreicht, und es wurden weitere Wasserstoffbrücken zwischen U7 (2'OH) und G9 (O6), sowie C8 (2'OH) und C8 (O2), die nicht in der Lösungsstruktur beobachtet wurden, nachgewiesen [21]. Generell zeigen die Lösungs- und Kristallstrukturen eine gute Übereinstimmung in der globalen Konformation [18-19, 21-24]. Dennoch können Unterschiede entlang des Rückgrats beobachtet werden, so-

wohl zwischen verschiedenen Strukturen als auch innerhalb einer Kristallstruktur mit zwei Repräsentanten des *Loops* [21].

Für die hier vorgestellte Strukturrechnung wurde eine  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  markierte Probe innerhalb unserer Arbeitsgruppe mithilfe aller bisher etablierten NMR-Techniken vermessen und eine Fülle von unabhängigen Strukturparametern gesammelt, um die Konformation des Rückgrats, des Zuckers und der Base zu bestimmen (NOE-Intensitäten, skalare Kopplungen (J), kreuz-korrelierte Relaxationsraten ( $\Gamma$ ), vorgestellt im Kapitel 2 und dipolare Restkopplung (RDCs)). In Anlehnung an die kürzlich veröffentlichte Arbeiten [25-27] wurde zudem in dieser Arbeit eine qualitative Konformationsanalyse der 2'-OH-Gruppen anhand der NOE-Intensitäten zu benachbarten Protonen des Zuckers (H1'-H3') sowie der nachfolgenden Nukleobase (H6/H8<sub>i+1</sub>) vorgenommen.

Die Gesamtheit der Daten liefert nach der Strukturrechnung und der Verfeinerung mit Wasser eine sehr genau definierte Struktur der 14mer RNA mit einem RMSD von 0,25 Å für den Loop und 0,30 Å für den Doppelstrangbereich und markiert damit die gegenwärtige Grenze für die Genauigkeit, die mittels NMR-basierter Strukturbestimmung erreicht werden kann.

## 3.2 Material und Methoden

### 3.2.1 Probe und NMR-Spektroskopie

Die 14mer cUUCGg-Tetra-loop RNA mit der Sequenz 5'-PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-PO<sub>4</sub><sup>-</sup>-PO<sub>3</sub><sup>-</sup>-GGCAC(UUCG)GUGCC-3' wurde von Silantes GmbH (München, Deutschland) bezogen. Die Probe für die NMR-Spektroskopie hatte eine RNA-Konzentration von 0,7 mM in einem Puffer mit 20 mM KHPO<sub>4</sub>, 0,4 mM EDTA, 10% D<sub>2</sub>O bei einem pH-Wert von 6,4. Die  $^1\text{H}$ -chemische Verschiebung wurde mit TSP als externe Standard referenziert. Die Spektren wurden bei Temperaturen von 25 °C, 10 °C und 5 °C an Bruker Spektrometern DRX600, AV600, AV700 und AV800, die mit den Probenköpfen 5 mm x,y,z-Gradienten TXI-HCN-RT ausgestattet sind, aufgenommen. Homonukleare  $^3\text{J}(\text{H},\text{H})$ -Kopplungskonstanten wurden gemessen in einem 3D-*forward-directed*-HCC-TOCSY-CCH-E-COSY [28]. Die heteronuklearen Kopplungen  $^3\text{J}(\text{H},\text{P})$  und  $^3\text{J}(\text{C}, \text{P})$  wurden mithilfe des quantitativen HCP-Experiments [29-36] und der  $\alpha/\beta$  selektiven HC(C)H-TOCSY-Experimente bestimmt [37]. Im Kapitel 2 wurden die kreuz-korrelierten Raten  $\Gamma_{\text{CH},\text{P}}^{\text{DD,CSA}}$  vorgestellt und mit dem quantitativen  $\Gamma$ -HCP-Experiment gemessen [38]. Für die Messung der  $^{\text{h}2}\text{J}(\text{N}, \text{N})$ -Kopplungen wurden zwei Pulssequenzen verwendet, die sich prinzipiell in der Art des Magnetisierungsrücktransfers vom Stickstoff zum Wasserstoff unterscheiden. In der Abbildung 3-2 sind beide Pulssequenzen dargestellt. Die erste Pulssequenz beinhaltet einen COSY-Rücktransfer und wird im Weiteren als die HNN-COSY-Pulssequenz bezeichnet. Sie entspricht der ersten Veröffentlichung dieser Methode [39] und wurde aus der Bruker-Vorgabe entnommen (*na\_hnncosygpphwg*)

und mit jeweils zwei Gradienten um die 180°-Pulse während des N,N-COSY-Transfers erweitert. Die zweite Version wurde im Jahr 2001 weiterentwickelt und baut auf einem TROSY-Rücktransfer der Magnetisierung auf (HNN-TROSY-Pulssequenz) [40].

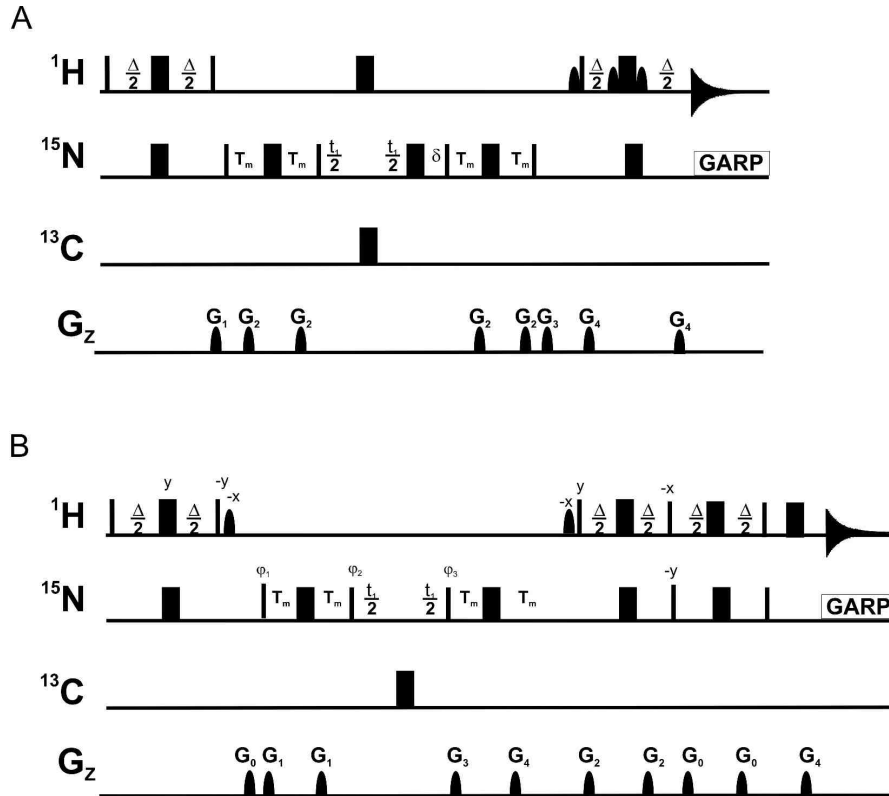


Abbildung 3-2: Pulssequenzen für das HNN-COSY-Experiment in zwei Versionen für den Rücktransfer der Magnetisierung vom Stickstoff zum Proton: A. COSY-Transfer mit der anschließenden Wasserunterdrückung durch die Methode *Soft Watergate* [41]. B. TROSY-Transfer und Detektion mit der Methode States-TPPI [42]. Schmale und breite, gefüllte Rechtecke entsprechen 90°- und 180°-Rechteckpulsen. Selektive Pulse und Gradienten sind als Semiellipsen dargestellt. Die Standardpulsphase ist x. Die Pulssequenz wurde an Bruker Spektrometern mit der für Bruker typischen Phasendefinition optimiert. Phasenzklus, für A:  $\phi_1=R_1$  mit  $R_1=x$ ;  $\phi_2=R_2$  mit  $R_2=y$ ;  $\phi_3=R_3$  mit  $R_3=x, -x$ ;  $\phi_4=R_1$ ;  $\phi_5=R_4$  mit  $R_4=x, x, -x -x$ ;  $\phi_6=R_5$  mit  $R_5=y,y,y,y,-y,-y,-y,-y$ ;  $\phi_7=R_2$ ;  $\phi_{rec} = x, -x, -x, x$ . Für B:  $\phi_1=R_1$  mit  $R_1= x, y,-x,-y$ ;  $\phi_2=R_2, -R_2$  mit  $R_2=y, -x, -y, x$ ;  $\phi_3=-R_2, -R_2, R_2, R_2$ ,  $\phi_{rec} = x, -y, -x, y$ . Die Protonenträgerfrequenz wird auf die Wasserresonanz (4.7 ppm) und die Stickstoffträgerfrequenz auf 185 ppm gesetzt. Das Zeitintervall  $\Delta/2$  ist auf 2,25 ms gesetzt,  $T_m$  ist die variable Mischzeit für den  $^{15}\text{N}$ - $^{15}\text{N}$ -COSY-Transfer (hier gesetzt auf 20 ms). Der 90°-Wasser-Flipback-Rechteckpuls (kleine schwarze Semiellipse) hat eine Länge von 1,5 ms, der 90°-Rechteckpuls zur Wasserunterdrückung (kleine schwarze Semiellipse, *Soft Watergate* Wasserunterdrückung) hat eine Länge von 0,85 ms. Es wird asynchrone GARP-Entkopplung [43] auf dem  $^{13}\text{C}$ - und dem  $^{15}\text{N}$ -Kanal verwendet, um heteronukleare skalare Kopplungen während der Akquisition zu unterdrücken. Die Amplitude der gepulsten ist sinusförmig. Die Feldgradienten *smoothed chirp amplitude* (Bruker Topspin 2.0, 2006) wurden entlang der z-Achse mit den folgenden Stärken und Längen angelegt. In A:  $G_1$ : 50%,  $G_2$ : 40%,  $G_3$ : 60%,  $G_4$ : 70% (alle 1ms Länge). In B:  $G_0$ : -50% (2,5 ms),  $G_1$ : -50% (2,1 ms),  $G_2$ : 50% (0,2 ms),  $G_3$ : 50% (2ms),  $G_4$ : -50% (0,405 ms). 100% der Gradientenstärke bedeutet 55 Gauss/cm.

### 3.2.2 Strukturrechnung

Alle Strukturrechnungen wurden mit der Rechenbasis von CNS 1.1 [44], die im Programmpaket ARIA 1.2 [45] integriert ist, durchgeführt. Dabei wurden das Kraftfeld „*dna\_rna\_allatom*“ und das Standardrechenprotokoll für das *Annealing* (Hybridisierung), welches die automatische Kalibrierung der NOE-Abstandsbeschränkungen und die Korrektur der Spin-Diffusion enthält, genutzt. Zu Beginn wurden aus einem linearen Templat 50 Anfangsstrukturen mit einer zufälligen Geschwindigkeitsverteilung für alle Atome generiert. Die NOE-Signale wurden in einem iterativen Prozess (0-7) immer wieder kalibriert, indem nach jedem Durchlauf 10 Strukturen mit der niedrigsten Energie zum Vergleich herausgenommen wurden. Die Toleranz der Abweichung wurde progressiv auf 0,1 Å für die letzte Iteration reduziert (8). Im letzten Durchgang wurden 200 Strukturen gerechnet. Für die Strukturrechnung wurde das vierstufige Simulationsprotokoll (SA), das auf einer Torsionswinkeldynamik (TAD) basiert, verwendet mit einer letzten Verfeinerung im kartesischen Winkelraum (CAD, *cartesian angle dynamics*). Der erste Prozess auf höchster Temperatur (interne Temperaturskala in K) besteht aus 10000 Schritten bei der Temperatur von 10000 K. Daraufhin folgen drei Abkühlungsprozesse mit 8000 Schritten bei 2000 K, 20000 Schritten bei 1000 K und 15000 Schritten bei 50 K. Während des Abkühlens wurden die Kraftkonstanten für die NOE-Beschränkungen auf 0, 10 und 50 kcalmol<sup>-1</sup>Å<sup>-2</sup> gesetzt. Die finalen 20 Strukturen mit der niedrigsten Energie wurden zum Schluss innerhalb ARIA mit explizitem Wasser verfeinert. Für diesen Zweck wurde das Kraftfeld mit zusätzlichen OPLS-Ladungen (*optimized potentials for liquid simulations*) und nicht-bindenden Parameter ergänzt [46-47]. Des Weiteren wurden schwache Beschränkungen für die Basenpaarplanarität hinzugefügt und die Möglichkeit gegeben, dass die Zuordnung der H5'-Wasserstoffe gewechselt wird.

## 3.3 Ergebnisse

### 3.3.1 NMR-Daten und Strukturparameter

Die komplette Zuordnung der 14mer-Tetraloop RNA wurde bereits früher vorgestellt [12] und wird hier mit den Zuordnung der 2'OH-Gruppen erweitert. Die NMR-Experimente, die für die Bestimmung aller Strukturparameter durchgeführt wurden, sind in der Tabelle 3-1 zusammengefasst. Ergebnisse der NMR-Experimente und deren Auswertung sind in den Tabelle 3-2 bis Tabelle 3-9 zusammengestellt. Ergebnisse dieser Messungen sind in der Datenbanken PDB und BMRB veröffentlicht (PDB: 2koc, BMRB: 5705).

Tabelle 3-1: Experimentellen Daten, die für die Strukturrechnung der 14mer cUUCGg-Tetraloop RNA genutzt wurden.

Experimentellen Daten für die 14mer cUUCGg-Tetraloop RNA		
Winkel-Beschränkungen		Referenz
Rückgrat	$\alpha$	$\Gamma_{C5'H5'/H5'',P_i}^{DD,CSA}$ [38]
	$\beta$	${}^3J(H5',P_i), {}^3J(H5'',P_i), {}^3J(C4',P_i)$ [29-36]
	$\gamma$	${}^3J(H4',H5'), {}^3J(H4',H5''), {}^2J(C4',H5'), {}^2J(C4',H5'')$ [28, 37, 48]
	$\epsilon$	${}^3J(H3',P_{i+1}), {}^3J(C4',P_{i+1}), {}^3J(C2',P_{i+1})$ [29-36]
	$\xi$	$\Gamma_{C3'H3',P_{i+1}}^{DD,CSA}$ [38]
Glykosidische Bindung	$\chi$	$\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}, \Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}, \Gamma_{C1'H1',N1/N9}^{DD,CSA}$ [6, 10]
Zuckerkonformation	P, $v_{max},$ $v_0-v_4,$ $\phi_{12},$ $\phi_{34}$	${}^3J(H1',H2'), {}^3J(H2',H3'), {}^3J(H3',H4'), \Gamma_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD},$ [28, 31, 37, 48-49] $\Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD}, \Gamma_{C1'H1',C1'}^{DD,CSA}$
Gesamtanzahl der Winkel-Beschränkungen <sup>a</sup>	96	
<b>Andere Beschränkungen</b>		
Basenpaarplanarität	5	${}^hJ(HN,N)$ [39]
RDCs	32	C8H8, C6H6, N1H1, C1'H1' [50]
<b>Abstandsbeschränkungen</b>		
NOE-Signale		2D- ${}^1H, {}^1H$ -NOESY ( $T_m = 50$ ms und 250 ms)
innerhalb eines Restes	141	Anhang II (6.2)
zw. benachbarten Resten	111	
sequenziell	74	
mittlere Entfernung	16	
weit entfernt	21	
Wasserstoffbrücken	15	${}^hJ(HN,N)$ [39]
Gesamtanzahl der Abstandsbeschränkungen	267	
Durchschnitt pro Rest	19	
<b>Gesamtzahl der Beschränkungen</b>	400	
<b>Durchschnitt pro Rest</b>	28,6	

a) Torsionswinkeln ( $v_0-v_4, \phi_{12}, \phi_{34}$ ) werden für die Statistik als zwei Winkelbeschränkungen für die Zuckerkonformation gezählt.

Tabelle 3-2: Experimentelle Ergebnisse für den Torsionswinkel  $\alpha$ .<sup>a</sup>

Rest	$\alpha$ [°]	$\Gamma_{(C4', H4'), P_i}^{DD, CSA}$ [Hz]	$\Gamma_{(C5', H5' proR), P_i}^{DD, CSA}$ [Hz]	$\Gamma_{(C5', H5' proS), P_i}^{DD, CSA}$ [Hz]
G1				
G2				
C3	-83 ± 35	-15,9	-5,9	4,7
A4		-16,1		
C5	-86 ± 25		-4,2	2,7
U6	-85 ± 35	-14,8	-2,0	3,4
U7	176 ± 60	15,1	-10,4	-7,7
C8	-74 ± 35	-8,6	-8,3	2,5
G9	76 ± 50	11,0	4,6	-0,4
G10	-94 ± 50		-2,4	-0,2
U11	-85 ± 40	-17,3	-1,2	6,5
G12	-81 ± 25	-18,1	-3,2	1,8
C13	-84 ± 35	-18,3	-5,4	4,3
C14	-84 ± 60	-17,5	-5,4	4,2

a) Ergebnisse aus dem Kapitel 2.

Tabelle 3-3: Experimentelle Ergebnisse für den Torsionswinkel  $\beta$ .

Rest	$\beta$ [°]	$^3J_{((proS)H5'', P_i)}$ [Hz]	$^3J_{((proR)H5', P_i)}$ [Hz]	$^3J_{(C4', P_i)}$ [Hz]
G1	180 ± 40	5,7	6,9	
G2	180 ± 40	2,0	2,1	7,8
C3	177 ± 30	1,7	0,5	
A4				
C5	176 ± 15	3,0	1,8	
U6	176 ± 25	2,9	1,7	9,6
U7	180 ± 60	5,7	3,7	6,3
C8	184 ± 25	1,3	2,3	9,3
G9	/ <sup>a</sup>	8,6	9,0	8,0
G10	/ <sup>a</sup>	1,3	2,3	6,1
U11	184 ± 30	0,0	1,7	
G12				
C13	180 ± 20	1,7	1,7	
C14	175 ± 40	3,1	1,8	7,7

a) Kopplungskonstanten konnten nicht durch eine oder Mischung aus mehreren Konformationen reproduziert werden.

Tabelle 3-4: Experimentelle Ergebnisse für den Torsionswinkel  $\gamma$ .

Rest	$\gamma^a$ [°]	$^2J$ (C4', H5'') (pro S) [Hz]	$^2J$ (C4', H5') (pro R) [Hz]	$^3J$ (H4', H5') (pro R) [Hz]	$^3J$ (H4', H5'') (pro S) [Hz]
G1	60 ± 50	0,3	2,0	0,6	5,2
G2	60 ± 50	-0,4	1,6	1,7	2,7
C3					
A4					
C5	60 ± 50	0,7	2,8	1,0	1,5
U6	60 ± 50	-1,4	2,3	-0,6	0,6
U7	60 ± 50	-1,0	3,8	0,3	1,2
C8	60 ± 50	-0,9	3,4	-0,3	1,1
G9	180 ± 50	2,7	-0,8	-2,8	-4,6
G10					
U11	60 ± 50	-2,1	3,3	-0,9	4,5
G12					
C13	60 ± 50	-1,3	3,2	-1,7	2,8
C14	60 ± 50	-0,6	3,0	-0,8	1,3

a) Übersetzung der Kopplungen in *trans*- oder *gauche*-Konformation.

Tabelle 3-5: Experimentelle Ergebnisse für den Torsionswinkel  $\epsilon$ .

Rest	$\epsilon$ [°]	$^3J$ (H <sub>3'</sub> <sub>i</sub> , P <sub>i+1</sub> ) [Hz]	$^3J$ (C <sub>2'</sub> <sub>i</sub> , P <sub>i+1</sub> ) [Hz]	$^3J$ (C <sub>4'</sub> <sub>i</sub> , P <sub>i+1</sub> ) [Hz]
G1	228 ± 20			6,0
G2				
C3	194 ± 40		0,8	
A4	189 ± 20	3,8		
C5	220 ± 15	9,4	1,4	
U6	207 ± 15	7,3	0,9	9,5
U7	300 ± 40	3,7	7,7	
C8	215 ± 60	7,5		7,1
G9	212 ± 15	7,5	1,2	7,7
G10	194 ± 40		0,9	
U11	212 ± 20	8,0		
G12	217 ± 20	7,8	0,7	6,5
C13	217 ± 20	9,3	0,6	
C14				



Tabelle 3-6: Experimentelle Ergebnisse für den Torsionswinkel  $\zeta$  aus dem Kapitel 2.

Rest	$\zeta$ [°]	$\Gamma_{(C3', H3'), P_{i+1}}^{DD, CSA}$ [Hz]	$\Gamma_{(C4', H4'), P_{i+1}}^{DD, CSA}$ [Hz]
G1			
G2			-18,4
C3	-80 ± 50	-6,3	-18,1
A4	-79 ± 30	-6,5	-18,3
C5	-66 ± 30	-4,8	-17,4
U6	-100 ±	-4,6	-11,2
U7	-48 ± 30	1,2	
C8	99 ± 60	-3,7	
G9	-46 ± 30	-4,3	-16,1
G10	-75 ± 40		-17,7
U11	-83 ± 30	-6,2	-18,5
G12	-97 ± 30	-4,7	
C13	-102 ± 50	-3,7	
C14			

Tabelle 3-7: Experimentelle Ergebnisse für die Zuckerkonformation.

Rest	P [°]	$\nu_{\max}$ [°]	$^3J(H1', H2')$ [Hz]	$^3J(H2', H3')$ [Hz]	$^3J(H3', H4')$ [Hz]
G1	/ <sup>a</sup>	/ <sup>a</sup>			
G2	343	40	0,7	6,0	9,9
C3	1	34	0,4		11,5
A4	350	32			11,2
C5	21 <sup>b</sup>	40	0,4	3,3	10,2
U6	24	27	0,2	5,5	11,0
U7	148	30	8,0	5,2	1,0
C8	153	36	9,3	4,9	0,6
G9	353	29	0,6	3,4	7,6
G10	/ <sup>c</sup>	/ <sup>c</sup>	0,6		4,9
U11	348	29	0,0		11,3
G12	337 <sup>b</sup>	40	1,2		11,5
C13	21 <sup>b</sup>	40	0,8	5,8	9,1
C14	31 <sup>b</sup>	40	0,3	5,5	5,3

a) Keine experimentellen Daten für G1. b) Pseudorotationsphase wurde ermittelt für  $\nu_{\max} = 40$ ,

c)  $\Gamma_{C3'H3', C4'H4'}^{DD, DD}$  von G10 konnte nicht analysiert werden.

Tabelle 3-8: Experimentelle Ergebnisse für die Zuckerkonformation.

Rest	$\phi_{12}$ [°]	$\Gamma_{H1',H2'}^{DD,DD}$ [Hz]	$\phi_{34}$ [°]	$\Gamma_{H3',H4'}^{DD,DD}$ [Hz]
G1				
G2	80 ± 25	-10,1	-153 ± 10	13,1
C3	94 ± 15	-8,7	-160 ± 10	15,3
A4	92 ± 15	-9,0	-154 ± 10	13,5
C5	102 ± 10	-6,8		
U6	108 ± 10	-5,0	-157 ± 10	14,5
U7	156 ± 10	15,8	-109 ± 10	-4,5
C8	161 ± 25	17,3	-99 ± 10	-7,0
G9	96 ± 15	-8,3	-153 ± 15	12,6
G10			/ <sup>a</sup>	20,7
U11	95 ± 15	-6,8	-150 ± 10	12,0
G12	89 ± 25	-9,4		
C13	101 ± 10	-6,9		
C14	108 ± 10	-4,7		

a)  $\Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD}$  von G10 ist größer als erwartet und kann nicht analysiert werden.

Tabelle 3-9: Experimentelle Ergebnisse für den Torsionswinkel  $\chi$ .<sup>a</sup>

Rest	$\chi$ [°]	$\Gamma_{H6,H1'}^{DD,DD}, \Gamma_{H8,H1'}^{DD,DD}$ [Hz]
G1		/
G2	-167 ± 10	-2,3
C3	-166 ± 10	-4,3
A4	-163 ± 10	-0,9
C5	-161 ± 10	-3,1
U6	-158 ± 15	-2,5
U7	-136 ± 15	1,5
C8	-138 ± 20	1,3
G9	59 ± 20	17,0
G10	-180 ± 20	-5,7
U11	-169 ± 15	-5,0
G12	-167 ± 10	-2,1
C13	-158 ± 10	-2,6
C14	-151 ± 15	-0,9

a) übernommen aus Rinnenthal et al., 2007 [10].

### 3.3.2 NOE-Abstandsbeschränkungen

Die große Mehrheit der Beschränkungen für die Strukturrechnung bestehen aus NOE-Abstandsbeschränkungen, die aus der Analyse von NOESY-Spektren abgeleitet wurden. Zwei 2D-<sup>1</sup>H<sup>1</sup>H-NOESY Spektren wurden mit verschiedenen Mischzeiten (50 und 250 ms) aufgenommen und liefern im Durchschnitt 19 Abstandsbeschränkungen pro Rest. Die NOE-Signale der 2'OH Protonen

wurden ebenfalls in die Strukturrechnung eingebunden. Für die Kalibrierung der NOE-Daten zu Abständen wurde das Programm ARIA verwendet [45]. Die Abstandsbeschränkungen wurden mit Bedingungen der Wasserstoffbrücken sowie Basenplanarität innerhalb der Basenpaare, welche mithilfe des HNN-COSY Experiments festgestellt wurden, erweitert [39, 51].

### 3.3.3 Winkelbeschränkungen und dipolare Restkopplungen (RDC)

Die NOE-Abstandsbeschränkungen sind meistens nicht ausreichend, um eine genaue Struktur der RNA zu definieren, weil sie keine Informationen über die globale Orientierung enthalten. Außerdem ist die Anzahl der NOE-Signale durch die geringe Protonendichte in RNA-Molekülen im Vergleich zu Proteinen begrenzt. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, weitere Strukturparameter für die Beschreibung der globalen Struktur hinzuzuziehen. Zur Verfügung steht die Vermessung der torsionswinkelabhängigen skalaren Kopplungen, kreuz-korrelierter Relaxationsraten und der dipolaren Restkopplungen, die die globale Konformation besser beschreiben können.

Für die 14mer RNA zeigt die Strukturrechnung mit NOE-Abstandsbeschränkungen dennoch eine gut konvergierte Struktur mit einem lokalen RMSD von 0,45 Å für die *Loop*-Region. Die meisten Winkel, außer  $\alpha(O3'_{i-1}-P_i-O5'_i-C5'_i)$  and  $\gamma(O5'_i-C5'-C4'-C3'_i)$ , stimmen gut mit der finalen Struktur überein, die mit allen NMR-Daten einschließlich der NOE- und Torsionswinkelbeschränkungen sowie RDCs bestimmt wurde. Deshalb kann die NOE-Struktur zur Einschätzung der lokalen Geometrie, wie z.B. der einzelnen Torsionswinkel, herangezogen werden; insbesondere wenn die Analyse von Kopplungskonstanten mehrere Lösungen für einen Torsionswinkel liefert.

Um die Winkel  $\beta(P_{i-1}-O5'_i-C5'_i-C4'_i)$  and  $\varepsilon(C4'_i-C3'_i-O3'_i-O3'_i)$  zu definieren, wurden heteronukleare  $^3J$ -Kopplungskonstanten zwischen dem  $^{31}P$ -Atom zu den Zuckerprotonen H5'/H5'', H3' und den Kohlenstoff C4' und C2' mithilfe eines quantitativen HCP-Experiments und eines J-modulierten HP-HSQC-Experiments in unserer Gruppe gemessen [29-35]. Daraus resultierten 54 Kopplungskonstanten, womit im Durchschnitt jeder Winkel durch zwei Kopplungskonstanten charakterisiert wird. Die Kopplungskonstanten wurden in dieser Arbeit in drei Ansätzen analysiert. Im ersten Ansatz wurden die Kopplungen unter der Annahme, dass nur eine Konformation vorliegt, ausgewertet und in Torsionswinkel übersetzt. In den meisten Fällen lieferte dies bereits eine gute Übereinstimmung mit der Vorhersage aus der NOE-Struktur, welches die konformationelle Einheit der Struktur bestätigt. In einem zweiten Ansatz wurden die Kopplungen unter der Annahme von zwei parallel vorliegenden Konformationen mit einem kontinuierlichen Winkelbereich analysiert. Im dritten Ansatz dagegen wurden drei definierte Winkel, die mit der *gauche*(+60°, -60°)- und *trans*(180°)-Konformation korrelieren, angenommen. Auf diese Weise konnte herausgearbeitet werden, dass die Kopplungskonstanten für den Winkel  $\beta$  für die Reste G1, G2 und U7 besser durch eine konformationelle Verteilung beschrie-

ben werden. Dennoch lässt sich feststellen, dass der Hauptanteil von ca. 70% in der *trans*-Konformation vorgefunden wird, was zu der Entscheidung geführt hat, die *trans*-Konformation als die Hauptkonformation zu definieren. Für die Reste G9 und G10 war es nicht möglich, die Kopplungskonstanten durch die vorgestellten Modelle zu beschreiben. Diese Beobachtung vermag darauf hinzuweisen, dass im Bereich von G9 und G10 Strukturpolitik vorliegt, die mit den NMR-Parametern und der klassischen Analyse nicht erfasst werden können. In Übereinstimmung damit zeigen Messungen der Orderparameter für die Rückgrat-Phosphoratome ( $^{31}\text{P}$ ) höchste Flexibilität für diesen Bereich [14]. Ein weiterer Grund für die unerwarteten Kopplungen könnte sein, dass die gegenwärtig verfügbare Karplus-Parametrisierung nicht für die nicht-kanonische Konformation der RNA, wie im Bereich des *Loops*, geeignet ist. Kopplungskonstanten für den Torsionswinkel  $\varepsilon$  konnten überwiegend zu einer Konformation übersetzt werden und lagen im erwarteten Bereich nach NOE-Strukturanalyse mit der Ausnahme von den Resten U7 und C8. In dieser Region kann eine breite, konformationelle Verteilung um die Hauptkonformation der *trans*-Stellung erwartet werden. Insgesamt wurden 10 und 12 von insgesamt 14 Torsionswinkeln für  $\beta$  und  $\varepsilon$  jeweils bestimmt. Die *Loop*-Reste U7 und C8 wurden mit einem höheren Freiheitsgrad für die  $\varepsilon$ - und  $\beta$ -Winkelbeschränkung versehen, während die  $\beta$ -Winkelbeschränkung für die Reste G9 und G10 ausgelassen wurde.

Die Torsionswinkel  $\alpha(\text{O}3'_{i-1}-\text{P}_i-\text{O}5'_{i-1}-\text{C}5'_i)$  und  $\zeta(\text{C}3'_i-\text{O}3'_{i-1}-\text{P}_{i+1}-\text{O}5'_{i+1})$  zeigen die höchste Streuung in RNA-Strukturen [52]. Da für diese zwei Winkel aufgrund der nicht NMR-aktiven Sauerstoffatome keine skalaren Kopplungen messbar sind, beruhte die bisherige Konformationsanalyse hauptsächlich auf der qualitativen Auswertung der chemischen Verschiebung der  $^{31}\text{P}$ -Kerne, womit lediglich die *trans*-Konformation ausgeschlossen werden konnte [53-54]. Um quantitative Daten für die beiden Winkel zu erhalten, wurde für diese Arbeit die im Kapitel 2 vorgestellte Methode zur Messung der kreuz-korrelierten Relaxationsraten angewendet [38]. Insgesamt wurden 22 von 23 möglichen Torsionswinkeln für  $\alpha$  und  $\zeta$  bestimmt und für die Strukturrechnung eingesetzt.

Die Bestimmung der Zuckerkonformation, die mit dem Phasenwinkel der Pseudorotation  $P[^\circ]$  und der Amplitude  $v_{\max}$  beschrieben wird, basiert auf der Messung der homonuklearen Kopplungskonstanten  $^3J(\text{H},\text{H})$  für alle Zuckerprotonen und der dipolaren kreuz-korrelierten Relaxationsraten  $\Gamma_{\text{C}1'\text{H}1',\text{C}2'\text{H}2'}^{DD,DD}$ ,  $\Gamma_{\text{C}3'\text{H}3',\text{C}4'\text{H}4'}^{DD,DD}$  and  $\Gamma_{\text{C}1'\text{H}1',\text{C}1'}^{DD,CSA}$ , die innerhalb der Gruppe gemessen wurden [28, 31, 37, 48-49, 55].

Aufgrund der guten spektralen Auflösung in den Spektren der 14mer RNA konnten 52 von 70 möglichen  $^3J(\text{H},\text{H})$ -Kopplungskonstanten innerhalb der Riboseinheit mit der Anwendung des *forward-directed* HCC-TOCSY-CCH-E ,COSY Experiments [28] bestimmt werden. Anhand dieser Daten wurde die Zuckerkonformation mit der Beschränkung der endozyklischen Torsionswinkel  $\nu_0-\nu_4$  definiert. Des Weiteren wurden 32 kreuz-korrelierte Relaxationsraten gemessen, die für die weitere Verfeinerung der Zuckerkonformation mit den Torsionswinkeln  $\phi_{12}(\text{H}2'_i-\text{C}1'_i-\text{C}2'_i-\text{H}2'_i)$  und  $\phi_{34}(\text{H}3'_i-\text{C}3'_i-\text{C}4'_i-\text{H}4'_i)$  gedient haben. Hierfür wurde der Phasenwinkel der Pseudorotation  $P$  zunächst anhand des Verhält-

nisses von  $\Gamma_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD} / \Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD}$  abgeschätzt, während die Amplitude  $v_{\max}$  durch die Analyse der einzelnen Raten extrahiert wurde [49, 56]. Wie erwartet, zeigen die Daten, dass die Reste U7 und C8 eine S-Konformation annehmen, während alle anderen Reste N-Konformation einschließlich der C2'-exo und C3'-endo Konformationen aufweisen (Abbildung 3-3).

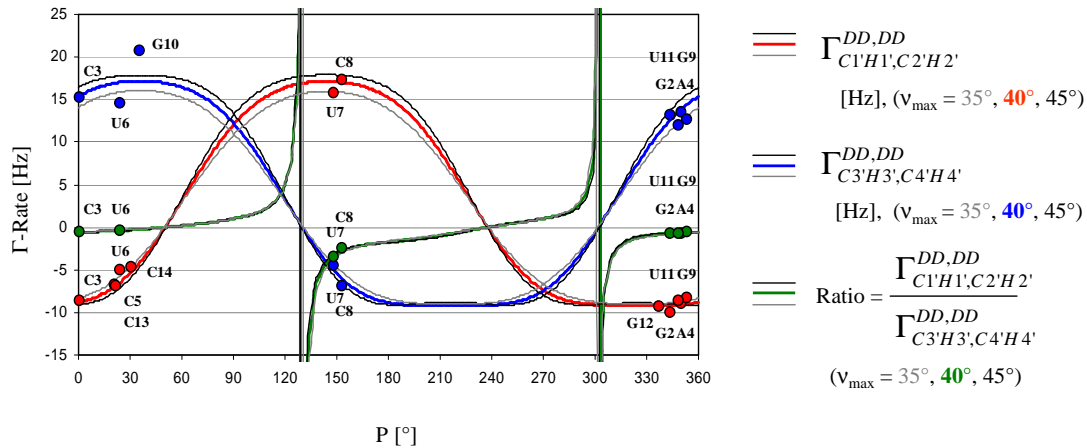


Abbildung 3-3: Die gemessenen kreuz-korrelierten Relaxationsraten  $\Gamma_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD}$  (rot),  $\Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD}$  (blau) und das Verhältnis  $\Gamma_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD} / \Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD}$  (grün) sind dargestellt als Funktionen des Phasenwinkels der Pseudorotation  $P$  für das  $\tau_c = 2,3$  ns und die Amplitudenwerte von  $35^\circ$ ,  $40^\circ$  und  $45^\circ$ . Die experimentellen Daten sind als Kreise mit der gleichen Farbkodierung dargestellt.

Der exozyklische Torsionswinkel  $\gamma(O5'_i-C5'_i-C4'_i-C3'_i)$  wurde abgeleitet von den  $^3J(H3',H4')$ -,  $^3J(H4',H5')$ -,  $^2J(H5',C4')$ - und  $^2J(H5'',C4')$ -Kopplungskonstanten, die gleichzeitig die stereospezifische Zuordnung der diastereotopischen  $H5'/H5''$  Wasserstoffe ermöglichte [48]. Für die Strukturrechnung wurde der Torsionswinkel  $\gamma$  qualitativ entweder in die *gauche* ( $60^\circ$ ) oder *trans* Konformation, hier nur für G9, beschränkt.

Die Orientierung der Nukleobase, charakterisiert durch den glykosidischen Torsionswinkel  $\chi(C2'_i-C1'-N1_i-C2_i)$ , wurde aus der Arbeit von Rinnenthal et al. entnommen [6, 10]. Die Winkel wurden mithilfe der kreuz-korrelierten Relaxationsraten, die im  $\Gamma$ -HCNCH-Experiment zu messen sind, bestimmt. Schließlich lässt sich zusammenfassen, dass 96 von insgesamt 112 möglichen Torsionswinkeln der 14mer RNA Struktur in quantitativer Weise bestimmt werden konnten. Sie machen deutlich, dass für den Doppelstrang eine A-Form Helix vorliegt, während der *Loop* eine nicht-kanonische Konformation zeigt.

Für die weitere Verfeinerung der globalen Struktur stehen noch weitere 32 RDCs von den Bindungsvektoren der Zuckereinheit ( $C1'H1'$ ), der Base ( $C6H6$ ,  $C8H8$ ) und den Iminogruppen ( $N1H1$ ,  $N3H3$ ) zur Verfügung (Tabelle 10)[50].

Tabelle 10: Experimentelle Ergebnisse zu RDCs.

Rest	Bindung	RDC	Rest	Bindung	RDC
G1	C1' H1'	-2,39	G1	C8 H8	7,29
G2	C1' H1'	-0,32	G2	C8 H8	1,63
C3	C1' H1'	6,36	C3	C6 H6	3,54
A4	C1' H1'	6,44	A4	C8 H8	6,02
C5	C1' H1'	4,95	C5	C6 H6	10,99
U6	C1' H1'	6,89	U6	C6 H6	4
U7	C1' H1'	-1,95	U7	C6 H6	3,47
C8	C1' H1'	-14,66	C8	C6 H6	-3,66
G9	C1' H1'	-5,14	G9	C8 H8	0,34
U11	C1' H1'	-0,43	G10	C8 H8	11,1
G12	C1' H1'	6,77	U11	C6 H6	9,09
C13	C1' H1'	6,53	G12	C8 H8	5,36
C14	C1' H1'	7,28	C13	C6 H6	2,83
G2	N1 H1	-0,3	C14	C6 H6	6,43
G9	N1 H1	6,32			
G10	N1 H1	3,88			
G12	N1 H1	0,37			
U11	N3 H3	1,75			

### 3.3.4 Basenplanarität und Temperaturabhängigkeit der $^hJ(N,N)$ -Kopplungen

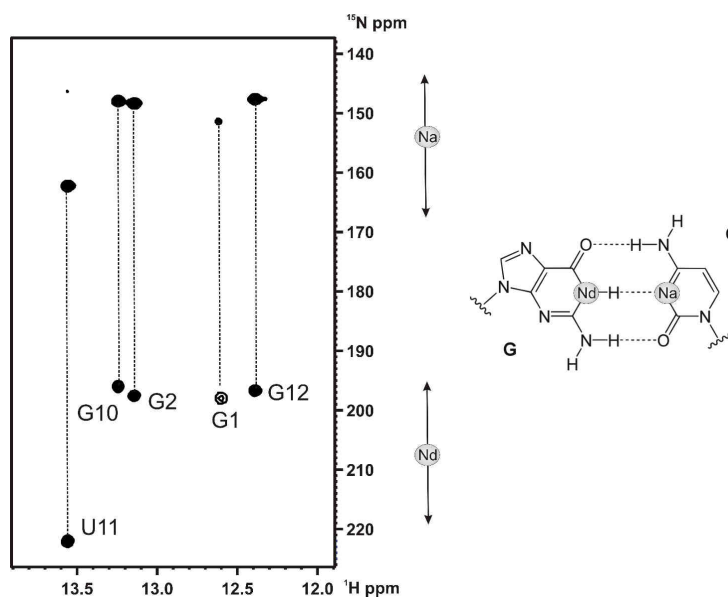


Abbildung 3-4: 2D- $^1H$ - $^{15}N$ -COSY-Spektrum der 14mer RNA bei 278 K und 600 MHz. Beispiel für ein Basenpaar (GC) mit Hervorhebung der detektierbaren  $^{15}N$ -Atome innerhalb der Wasserstoffbrücke: Nd-Donor, Na-Akzeptor.

Bei einer tiefen Temperatur von 278 K können im HNN-COSY-Spektrum alle fünf kanonischen Basenpaare detektiert werden. Diese befinden sich innerhalb der Helix und geben sowohl Diagonal- als auch Kreuzsignale (Abbildung 3-4). Die Signale des terminalen Basenpaars G1-C14 sind wegen höherer Dynamik und dem Austausch mit Wasser besonders schwach. Dennoch kann für alle Basenpaare von Planarität ausgegangen werden.

Die Messungen der Kopplungen mit der HNN-TROSY-Pulssequenz wurden für den Temperaturbereich von 278 bis 308 K jeweils einmal durchgeführt. Das Experiment mit der HNN-COSY-Pulssequenz konnte drei Mal für den Temperaturbereich 278 bis 318 K wiederholt werden. Die Kopplungen wurden berechnet nach der folgenden Gleichung:

$${}^h_2J(N, N) = \text{atan}[(-I_{Na}/I_{Nd})^{1/2}]/2\pi T_m$$

$I_{Na}/I_{Nd}$  sind die Intensitäten der Diagonal- und Kreuzsignale im HNN-COSY-Spektrum,  $T_m$  ist die variable Mischzeit für den  ${}^{15}\text{N}$ - ${}^{15}\text{N}$ -COSY-Transfer.

In der Abbildung 3-5 sind die gemessenen Kopplungen für die 14mer RNA dargestellt. Zunächst fällt auf, dass die Kopplungen einen unterschiedlichen Verlauf in Abhängigkeit von der Temperatur beschreiben. Die Temperaturabhängigkeit der Kopplungen, wie sie mit der TROSY-Pulssequenz gemessen wurden, zeigt keinen klaren Trend. Die im HNN-COSY-Experiment gemessenen Kopplungen dagegen weisen eine annähernd lineare Abnahme mit steigender Temperatur auf. Die Differenz zwischen den Kopplungen bei der kleinsten und höchsten Temperatur beträgt weniger als 0,3 Hz. Die klare Tendenz ist trotzdem gut zu erkennen, weil die Kopplungen mit einer sehr hohen Genauigkeit gemessen werden konnten. Die Reduktion der Kopplung ist in Übereinstimmung mit der Erwartung, dass bei höheren Temperaturen zum einen die Basenpaarung geschwächt wird und zum anderen der Austausch mit Wasser zunimmt. Beide Vorgänge führen zur Verringerung des COSY-Transfers und damit zur Reduktion der gemessenen Kopplungskonstanten.

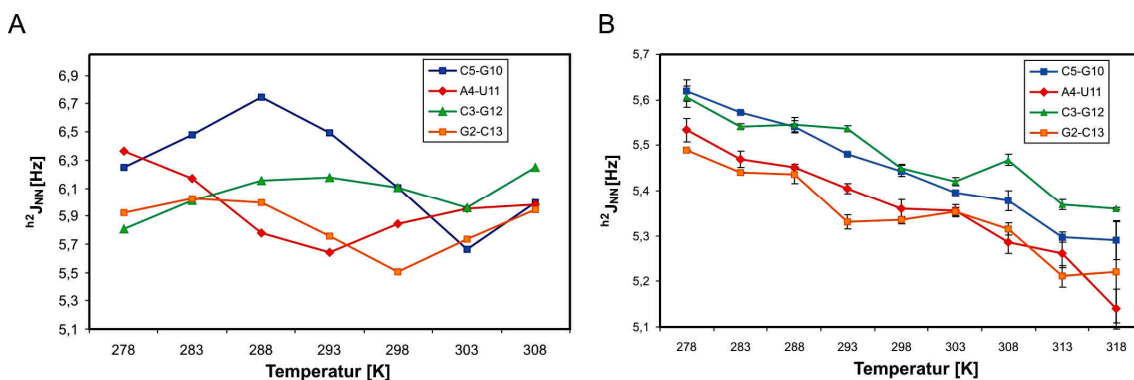


Abbildung 3-5: Temperaturabhängigkeit der  ${}^h_2J(N,N)$ -Kopplungen in der 14mer RNA. A. Gemessen mit der Pulssequenz mit dem TROSY-Rücktransfer für die Temperaturen 278-308 K. B.  ${}^h_2J(N,N)$ -Kopplungen gemessen mit der Pulssequenz mit dem COSY-Rücktransfer für die Temperaturen 278-318 K. Fehleranalyse beruht auf der Berechnung der Standardabweichung aus drei Experimenten.

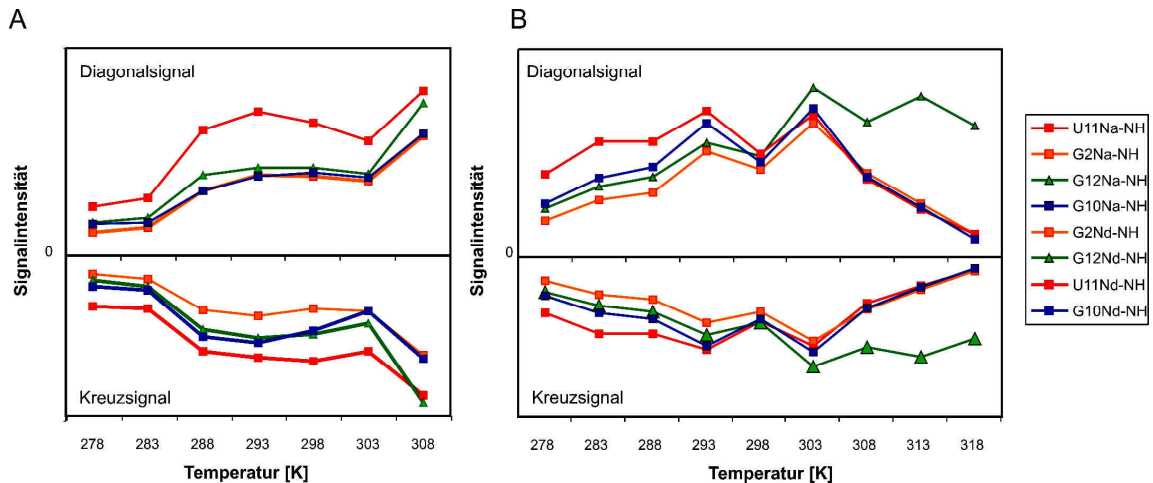


Abbildung 3-6: Temperaturabhängigkeit der Intensität der Diagonal (Nd)- und Kreuzsignale (Na) aufgenommen mit zwei unterschiedlichen Pulssequenzen (HNN-TROSY-Pulssequenz (A), HNN-COSY-Rücktransfer (B), siehe Abbildung 3-2 und Erklärung im Text.

Die Analyse der Signalintensitäten in den Spektren der beiden Pulssequenzen deutet auf einen Unterschied in der Effizienz des Magnetisierungstransfers auf (Abbildung 3-6). Der Verlauf der Signalintensität des HNN-COSY-Experiments ist wie erwartet. Mit der steigenden Temperatur steigt zunächst die Signalintensität aufgrund der kleiner werdenden Rotationskorrelationszeit und somit kleiner werdenden Relaxationsraten. Ab einer bestimmten Temperatur überwiegt der schneller werdende Austausch mit Wasser, der zum Signalverlust und zur Linienverbreiterung führt. Im Diagramm ist klar zu erkennen, dass das mittlere Basenpaar C3-G12 von dem Austausch mit dem Wasser geschützt bleibt und weiter von der kleiner werdenden Relaxationsrate profitiert. Im HNN-TROSY-Experiment tritt weder dieses Verhalten ein, noch kann das beobachtete Verhalten zu diesem Zeitpunkt plausibel erklärt werden.

#### 3.3.5 Lösungsstruktur der 14mer cUUCGg-Tetraloop RNA

Die Lösungsstruktur der 14mer RNA wurde in vier Ansätzen mit verschiedenen Kombinationen der NMR-Daten gerechnet:

- A) NOEs
- B) NOEs+RDCs
- C) NOEs+Torsionswinkel
- D) NOEs+Torsionswinkel+RDCs

Die im Folgenden angeführten RMSD-Werte sind bezogen auf 20 Strukturen mit der niedrigsten Gesamtenergie nach der Strukturrechnung und Wasserverfeinerung für alle Atome in drei verschiedenen Regionen, nämlich globaler RMSD (Rest 2-13, ohne terminale Nukleotide), Helix-RMSD (Reste 2-



5, 10-13) und die *Loop*-RMSD (Reste 6-9). Die Standardparameter für das „*dna\_rna\_allatom*“ Kraftfeld in ARIA/CNS ermöglicht keine gute Wasserverfeinerung für RNA-Moleküle. Deshalb, wurden OPLS nicht-bindenden Lennard-Jones Parameter und Ladungen [57] hinzugefügt, welches die Wasserverfeinerung deutlich verbesserte.

Die Strukturrechnung basierend auf NOE-Abstandsbeschränkungen, Wasserstoffbrücken und Basenplanarität resultiert in einem bereits gut definiertem Strukturbündel mit einem globalen RMSD von 0,85 Å und einer lokalen Konvergenz von 0,45 Å für die *Loop*-Region (Abbildung 3-7 A). Die gesamte Struktur tendiert dazu leicht gewölbt zu sein. Das Hinzufügen von allen zur Verfügung stehenden Torsionswinkeln erhöht die Konvergenz der Struktur mit einem resultierenden, globalen RMSD von 0,41 Å (Abbildung 3-7C). Insbesondere die *Loop*-Region wird mit einem RMSD von 0,27 Å gut definiert. Die finale Strukturrechnung mit dem kompletten Datensatz einschließlich der RDCs liefert ein sehr präzises Strukturbündel mit einem globalen RMSD von 0,37 Å (Abbildung 3-7 D).



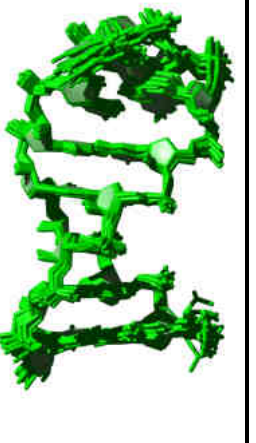

Daten	A	B	C	D
RMSD [Å]	NOEs	NOEs + RDCs	NOEs + Winkel	NOEs + RDCs + Winkel
Global	0,85	0,69	0,41	0,37
Loop	0,45	0,33	0,27	0,25
Helix	0,78	0,71	0,31	0,30
				
RDCs	0,82	-	0,99	-
Corr R				

Abbildung 3-7: Überlagerung der 20 Strukturen mit der niedrigsten Energie nach der Strukturrechnung und Wasserverfeinerung für die verschiedenen Kombinationen an NMR-Daten (A-D). Der RMSD ist bezogen auf global (Reste 2-13), Helix (Reste 2-5, 10-13) und den Loop (Reste 6-9). A. Nur NOE-Abstandsbeschränkungen (orange). B. NOEs + RDCs (blau). C. NOEs und Winkel (grün). D. NOEs, Winkel und RDCs (rot).

Die Struktur wurde analysiert mit dem Programm *w3DNA* [58], welches die A-Form der Helix bestätigt (Reste 1-5, 10-14). Alle Reste bis auf U7 und C8 weisen eine C3'-endo Konformation der Zuckereinheit auf. Die C2'-exo Konformation, die aus der Analyse der  $\Gamma_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD}$  und  $\Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD}$  für G2, A4, G9 und U11 abgeleitet wurde, wird von der Struktur nicht wiedergegeben (Abbildung 3-7 C). Ein Grund dafür könnte sein, dass andere Daten wie die NOE-Abstandsbeschränkungen und RDCs in Kombination mit dem Kraftfeld die Zuckereinheit in die stabilere C3'-endo Konformation leiten. Die 2'OH-Gruppe nimmt zwei von drei möglichen Ausrichtungen (O3'- und Basen-Domäne) an, welche in Übereinstimmung mit den NOE-Daten ist (Abbildung 3-7 B, C). Ein Vergleich der Winkelwerte aus der Endstruktur mit den NMR-Eingabedaten (Abbildung 3-7 B, C) lässt eine sehr gute Übereinstimmung erkennen. Einzige Ausnahme ist für den Winkel  $\epsilon$  von C8 mit einer Abweichung von 50° zu beobach-

ten, die aber innerhalb der Messungenauigkeit für diesen Winkel liegt. Im Vergleich zu der Kristallstruktur gibt es eine Abweichung von 25° (Abbildung 3-8). Eine höhere Winkelstreuung für die Reste G1 und G2 deutet darauf hin, dass diese Region weniger definiert ist, welches aus Dynamikuntersuchungen bereits erwartet wird [11].

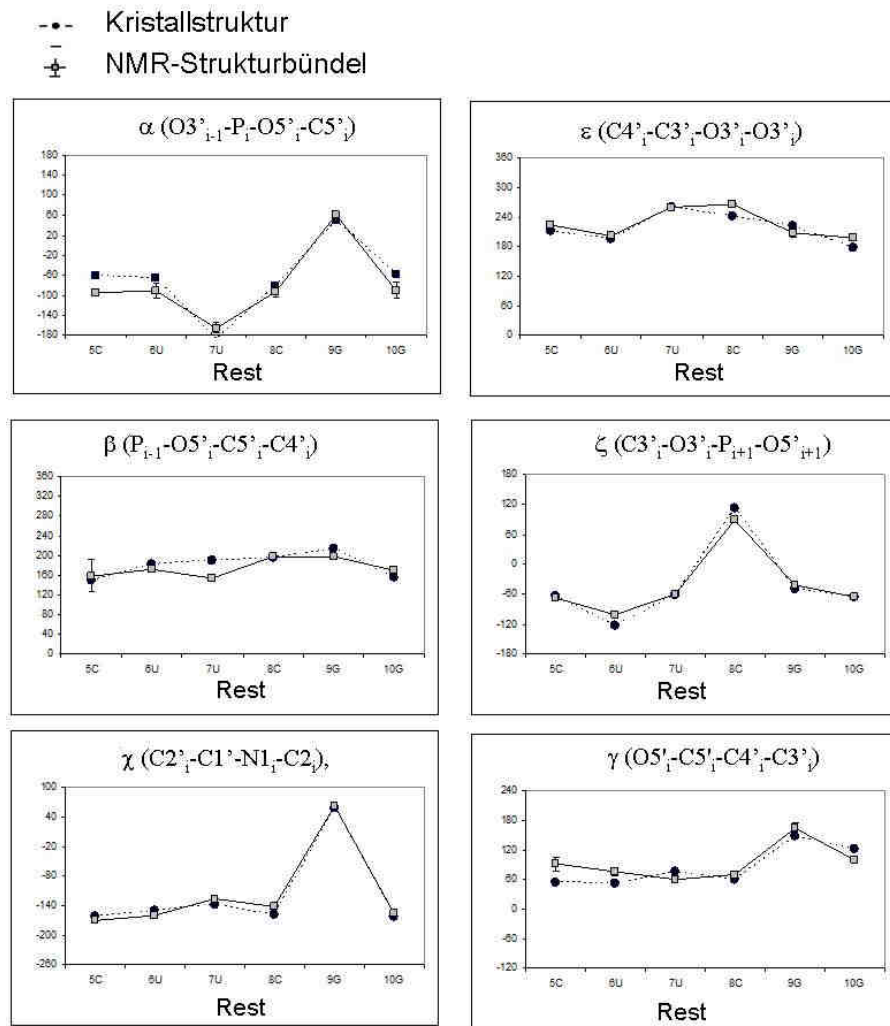


Abbildung 3-8: Vergleich der Winkel  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\chi$  und  $\zeta$  in der Kristallstruktur (1F7Y, TL1, [21]) und der NMR-Struktur.

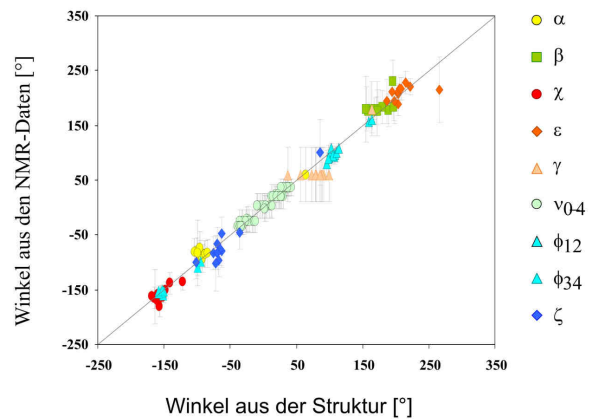
A

**Statistik der Strukturrechnung**

Abweichungen zu den experimentellen Daten

NOE-Abweichungen > 0,3 Å	0
Torsionswinkelabweichungen > 5 °	0
RDCs - Abweichungen > 1 Hz	1
Rms der Abweichung	
Bindungen [Å] / Kraftfeld	0,003
Winkel [°] / Kraftfeld	0,54
Torsionswinkel [°] /NMR-Beschränkung	0,57
NOEs [Å] /NMR-Beschränkung	0,03
RDCs [Hz]/NMR-Beschränkung	0,36
RDC Corr R	0,99

B



C

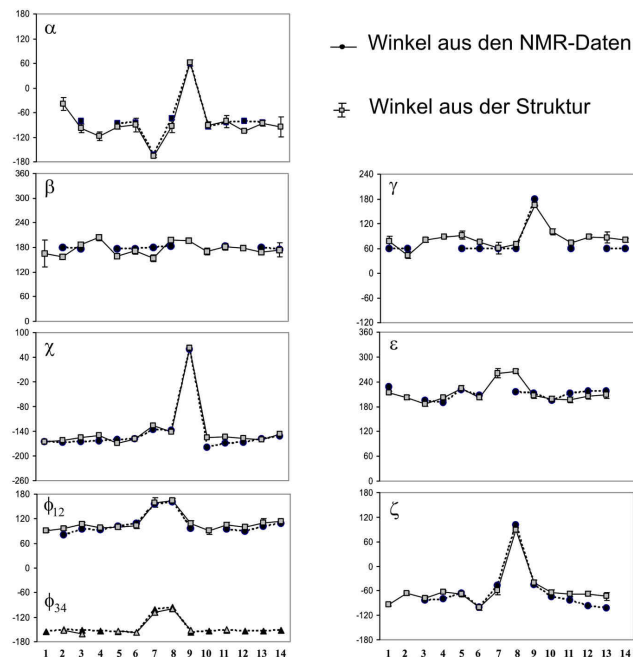


Abbildung 3-9: Analyse der Strukturrechnung. A. Statistik der Strukturrechnung mit der finalen Struktur gerechnet mit NOE-Abstandsbeschränkungen, Torsionswinkel und RDCs. B. Korrelation zwischen den experimentell bestimmten Winkeln und dem durchschnittlichen Winkel, die in der Endstruktur vorliegen. Fehlerbalken deuten die experimentelle Präzision der Eingabedaten an. C. Korrelation der experimentell bestimmten Winkeln mit den Winkeln aus der Struktur, dargestellt über die Sequenz. Fehlerbalken stellen die Abweichung innerhalb des gerechneten Strukturbündels dar.

### 3.3.6 Zuordnung und Konformationsanalyse der 2'OH-Gruppen

Die 2'OH-Gruppen kommen zwischen 6,7 und 7,1 ppm zur Resonanz (Abbildung 3-10). In 2D  $^1\text{H}^1\text{H}$ -NOESY Spektren mit einer Mischzeit von 250 ms und bei der Temperatur von 5 °C, können NOE-Kreuzsignale zwischen dem Proton der 2'OH-Gruppe und den Protonen des Zuckers ( $\text{H}1'_{i-1}$ - $\text{H}5'_{i-1}$ ) und der Base ( $\text{H}6/\text{H}8_{i+1}$ ) des nachfolgenden Nukleotids beobachtet werden. Diese Signale enthalten daher sequenzielle Informationen zwischen einem Zucker und der nachfolgenden Base und haben den Vorteil, dass sie weit vom Wassersignal entfernt sind. In der 14mer RNA konnten neun 2'OH-Gruppen zugeordnet werden. Die fehlenden Wasserstoffe befinden sich an den *Loop*-Nukleotiden U7-G9 und den terminalen Nukleotiden G1 und C14, wo das Signal aufgrund des Austausches mit Wasser verloren geht. Die Konformationsanalyse der 2'OH-Gruppe basiert auf dem Vergleich der NOE-Intensitäten zu benachbarten Protonen im 2D  $^1\text{H}^1\text{H}$ -NOESY Spektrum mit einer Mischzeit von 50 ms und wurde wie bereits veröffentlicht vorgenommen [25, 59]. Die Ergebnisse zeigen, dass die 2'OH-Gruppen hauptsächlich die Orientierung in Richtung des O3' Sauerstoffs (O3'-Domäne) aufweisen (Tabelle 3-11, Abbildung 3-10). Diese Orientierung wurde auch in anderen RNA-Molekülen als Hauptausrichtung bestimmt [25-27]. Diese Beobachtung wird unterstützt durch das Vorliegen der NOE-Signale zwischen der 2'OH-Gruppe und dem H1'-Proton, die intensiver sind als die Kreuzsignale zu den nachfolgenden H6/8<sub>i+1</sub>, aber schwächer als zu den H2'-Protonen. Kreuzsignale zu den H5'/H5'' der nachfolgenden Nukleotide (A4, C5, G12) und zu H6/8 der nachfolgenden Base bei längerer Mischzeit bestätigen das Konzept, dass die O3'-Domäne häufiger besetzt ist [25-27]. Die einzige Ausnahme findet sich für G10; die 2'OH-Gruppe zeigt NOE-Kontakte, die eine Orientierung zur O4'-Domäne implizieren. Das finale Strukturbündel zeigt eine gute Übereinstimmung mit der Analyse der NOE-Kontakte und weist 2'OH-Gruppen mit einer Ausrichtung in der O3'-Domäne innerhalb des Doppelstrangbereichs (Abbildung 3-10). Die 2'OH-Gruppe von U6 ist durch die Wasserstoffbrücke zu G9 in eine spezielle Orientierung ausgerichtet.

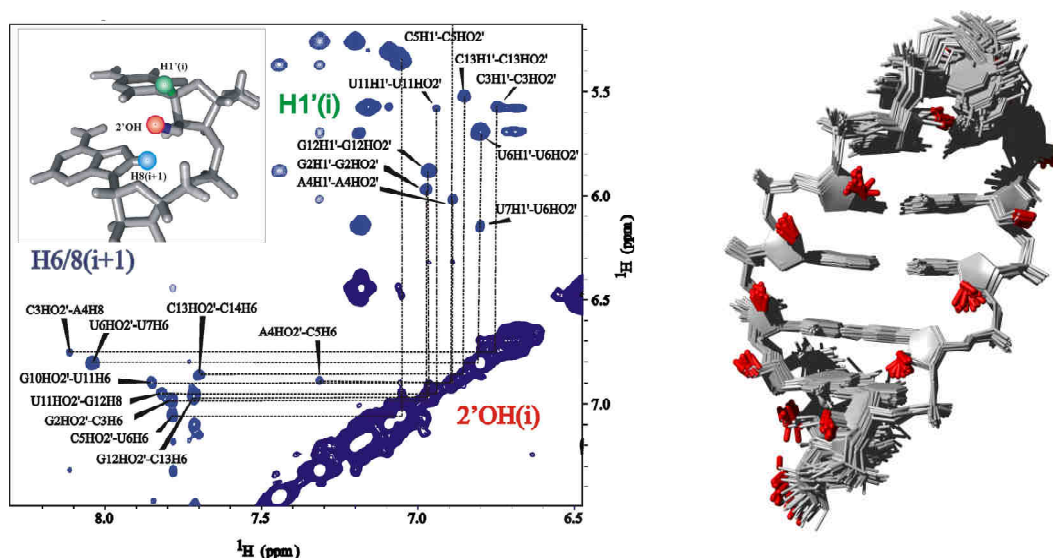


Abbildung 3-10: Links: Ausschnitte aus dem 2D-<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-NOESY-Spektrum aufgenommen bei einer Temperatur von 5 °C und einer Mischzeit von 250 ms. Es zeigt die Kreuzsignale zwischen der 2'OH-Gruppe und den Protonen H1' des eigenen sowie H6/H8 des nachfolgenden Restes. Rechts: Strukturbündel aus 20 Strukturen mit der niedrigsten Energie gerechnet mit allen NMR-Daten. Die 2'OH-Gruppen sind in rot hervorgehoben.

Tabelle 3-11: Konformationsanalyse der Endstruktur bezüglich der Zucker und der 2'OH-Gruppe, die Resonanzzuordnung der 2'OH Wasserstoffe.

Rest	2'-OH: <sup>1</sup> H chemische Verschiebung und Konformationsanalyse				Konformationsanalyse der Ribose			
	$\delta$ [ppm]	2'-OH Orientierung /NOE-Kontakte	2'-OH Orientierung in der NMR-Struktur $\theta$ [°]	Domäne	P [°] aus kreuz-korrelierten $\Gamma$ - Raten	$v_{\max}$ [°]	P [°] in der NMR-Struk- tur	$v_{\max}$ [°]
G1					/ <sup>a</sup>	/ <sup>a</sup>	7 ± 3	39 ± 2
G2	6,97	O3'	107 ± 21	O3'	343 ± 2	40 ± 1	2 ± 3	37 ± 1
C3	6,74	O3'	59 ± 33	O3'	1 ± 11	34 ± 6	26 ± 2	35 ± 1
A4	6,89	O3'	90 ± 11	O3'	350 ± 8	32 ± 4	11 ± 1	35 ± 1
C5	7,06	Base	102 ± 26	O3'	21 <sup>b</sup> ± 10	40	14 ± 1	40 ± 1
U6	6,80	Base	-45 ± 14	Base	24 ± 5	27 ± 2	21 ± 2	38 ± 2
U7	/				148 ± 4	30 ± 3	149 ± 4	32 ± 2
C8	/				153 ± 7	36 ± 6	158 ± 4	41 ± 2
G9	/				353 ± 9	29 ± 5	32 ± 1	38 ± 1
G10	6,89	O4'	130 ± 12	O3'	/ <sup>c</sup>	/ <sup>c</sup>	1 ± 1	42 ± 1
U11	6,94	O4'	63 ± 37	O3'	348 ± 10	29 ± 7	22 ± 2	35 ± 1
G12	6,96	O3'	91 ± 34	O3'	337 <sup>b</sup> ± 8	40	15 ± 1	36 ± 2
C13	6,85	O3'	71 ± 36	O3'	21 <sup>b</sup> ± 10	40	32 ± 2	34 ± 2
C14					31 <sup>b</sup> ± 7	40	38 ± 4	32 ± 2

a) Keine Daten für das G1, b) Phasenwinkel der Pseudorotation wurde bestimmt für  $v_{\max} = 40^\circ$ , <sup>c</sup>

$\Gamma_{C3'H3';C4'H4'}^{DD,DD}$  von G10 ist höher als nach der Definition erwartet und konnte nicht analysiert werden.

## 3.4 Diskussion

### 3.4.1 Konformationsanalyse der 14mer cUUCGg-Tetraloop RNA

Die *Loop*-Region ist der geeignete Bereich um die Richtigkeit der vorliegenden Struktur zu überprüfen. Mit beiden Methoden, der NMR-Spektroskopie und Röntgenanalyse, wurden spezifische Strukturelemente, die zu der ungewöhnlichen Stabilität beitragen, aufgedeckt. Das *trans*-wobble U6-G9 Basenpaar mit der ungewöhnlichen 2'OH Wasserstoffbrücke ist in der gerechneten Struktur vorhanden. Die Riboseeinheiten der Nukleotide U7 und C8 nehmen die Konformation C2'-endo an, wie in den Kristallstrukturen beobachtet wird. Die Aminogruppe des C8 bildet eine Wasserstoffbrücke zu der Phosphatgruppe des U7 aus und ist deshalb vom Wasseraustausch geschützt, was man am Vorhandensein starker NOE-Signale zu weiteren Protonen erkennen kann. Ein Netzwerk aus Stapelwechselwirkungen wird für die *Loop*-Reste mit der Ausnahme der Base von U7 beobachtet. Diese klappt nach außen und ist dem Lösungsmittel exponiert, wie man sie in allen weiteren Kristall- und Lösungsstrukturen vorfindet [11]. Der Vergleich der neuen Lösungsstruktur mit der Kristallstruktur zeigt eine große Ähnlichkeit zwischen den beiden Strukturen [21]. Eine detaillierte Betrachtung des *trans*-wobble Basenpaars U6-G9 deckt kleine Unterschiede zu der Kristallstruktur auf, welche zwei Wasserstoffbrücken vom U6 (O2) sowohl zu der Imino- als auch zu der Aminogruppe des Restes G9 aufweist [21]. In der neuen Lösungsstruktur ist die Aminogruppe am G9 dagegen mehr nach außen gedreht, dem Lösungsmittel exponiert und zeigt keine NOE-Signale zu anderen Protonen. Die Distanz zwischen U6 (O2) und G9 (N2) beträgt im Durchschnitt mehr als 3,5 Å, während der Winkel der Wasserstoffbrücke bei 130° liegt. Es deutet darauf hin, dass eine Wasserstoffbrücke prinzipiell möglich ist, diese aber nicht stark genug zu sein scheint, um die Aminoprotonen vor dem Wasseraustausch zu schützen.

Für das Nukleotid U7 findet sich eine potentielle Wasserstoffbrücke zwischen der 2'OH-Gruppe und der Base von G9 (N7) in einem Drittel der gerechneten Strukturen. Dies widerspricht der Tatsache, dass das 2'OH Proton kein detektierbares Signal liefert, könnte aber dadurch erklärbar sein, dass das Nukleotid U7 am weitesten dem Lösungsmittel exponiert ist, und daher der Austausch mit Wasser das Signal trotz der Interaktion verschwinden lässt.

Die vorgefundene Wasserstoffbrücke ist im Einklang mit dem Befund aus der Kristallstruktur, wo eine Interaktion zu dem Sauerstoff O6 der Base G9 vorliegt [21].

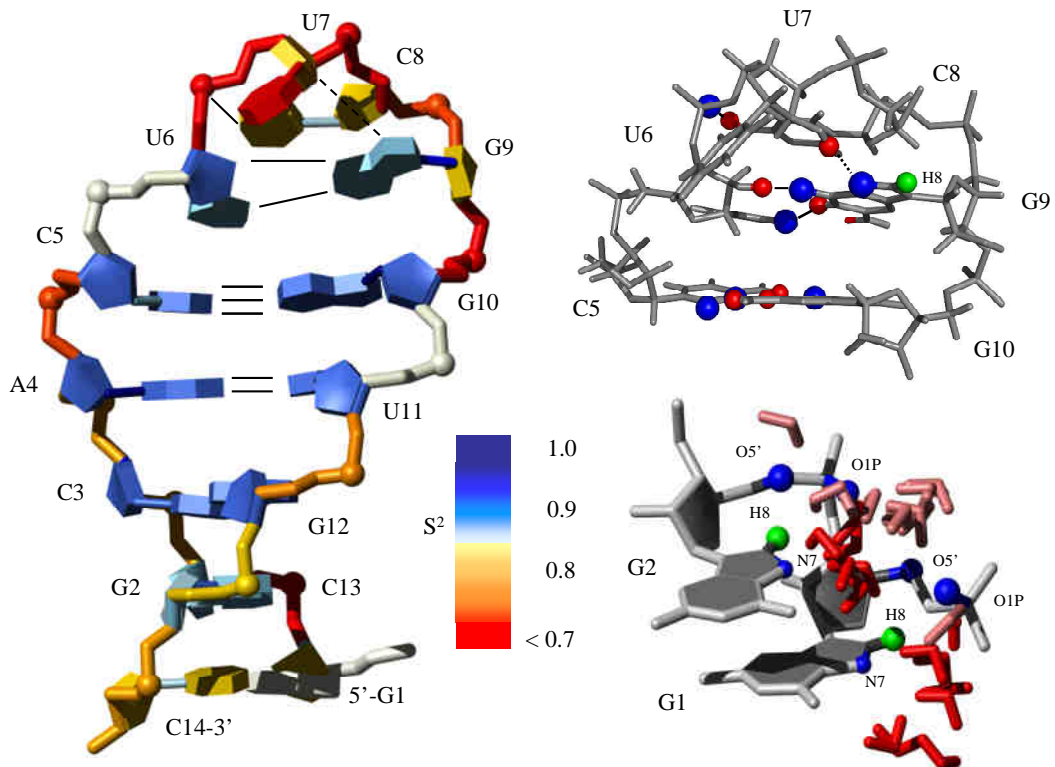


Abbildung 3-11: Links: Darstellung der Orderparameter ( $S^2$ ), die für die Zucker (C1'H1') und die Base (C6H6, C8H8) bei 317 K, sowie für die Rückgrat-Phosphoratome bei 310 K in früheren Arbeiten ermittelt wurden [7, 11, 14]. Für das G1 (grau) konnten keine Daten gesammelt werden. Wasserstoffbrücken sind mit durchgezogenen Linien symbolisiert. Die gestrichelte Linie deutet auf eine potenzielle Wasserstoffbrücke zwischen der 2'OH-Gruppe von U7 und dem N7 von G9, die in einem Drittel der gerechneten Strukturen vorgefunden wird. Rechts oben: Lösungsstruktur des cUUCGg-Tetraloops mit Hervorhebung der Wasserstoffbrücken; unten: Reste G1 und G2 und Wassermoleküle, die in 20 Strukturen nach Wasserverfeinerung gebunden sind.

In früheren Studien, die sich mit Relaxationsverhalten befassen, wurde gezeigt, dass der Rest U7 und das *Loop*-Rückgrat zu beachtender Dynamik auf der ns-Zeitskala aufweisen (Abbildung 3-11) [7, 11, 14]. Auch die Analyse der Kopplungskonstanten zu den Winkeln  $\beta$  und  $\epsilon$  stehen in diesem Zusammenhang, weil sie mehr einer flexiblen als einer rigiden Konformation zugeteilt werden konnten. Die erwartete, höhere Flexibilität in der Region des U7 wird von der Lösungsstruktur dagegen nicht reflektiert. Im Gegenteil, sie zeigt an der Stelle eine höhere Konvergenz als im Doppelhelixbereich. Dies wird zurückgeführt auf eine große Zahl an NOE-Abstandsbeschränkungen, beruhend auf einer höheren Protonendichte und einer besseren spektralen Dispersion für den *Loop*-Bereich. Für die präsentierte Struktur kann daher angenommen werden, dass sie die Dynamik des Nucleotids U7 unterbewertet. Andererseits sind alle Daten mit der gemittelten Struktur in Übereinstimmung, welches betätigt, dass die konformationelle Flexibilität nicht weit von der Gleichgewichtsstruktur, der gemittelten Lösungsstruktur, entfernt ist. Diese Aussage ist für die zwei Zeitskalen der NOE-Daten als auch der J- und RDCs-Daten zutreffend.



### 3.4.2 Vergleich mit anderen Strukturen des cUUCGg-Tetraloops

Für den Vergleich mit anderen Strukturen wurden vier Kristall- und fünf Lösungsstrukturen, die den cUUCGg-Tetraloop enthalten, gewählt (Abbildung 3-12) [19, 21, 60-68]. Alle betrachteten Strukturen sind in guter Übereinstimmung und zeigen das charakteristische *trans*-wobble Basenpaar U6-G9 und die nach außen ragende Base an der Position L2. Bei einem genaueren Vergleich werden Unterschiede zwischen den Strukturen aber auch zwischen den Methoden (Röntgenanalyse und NMR-Spektroskopie) deutlich. Auf den ersten Blick sind vor allem Unterschiede entlang des Rückgrats zu erkennen. Während Kristallstrukturen in der Rückgratkonformation abweichen, stimmen sie in der lokalen Position und Orientierung der Nukleobasen sowie der Zuckerringe gut überein. Die NMR-Strukturen dagegen zeigen mehr Variationen sowohl im Rückgrat als auch in der Position der Nukleotide, welches einer realen konformationellen Vielfalt in Lösung zugeschrieben werden kann.

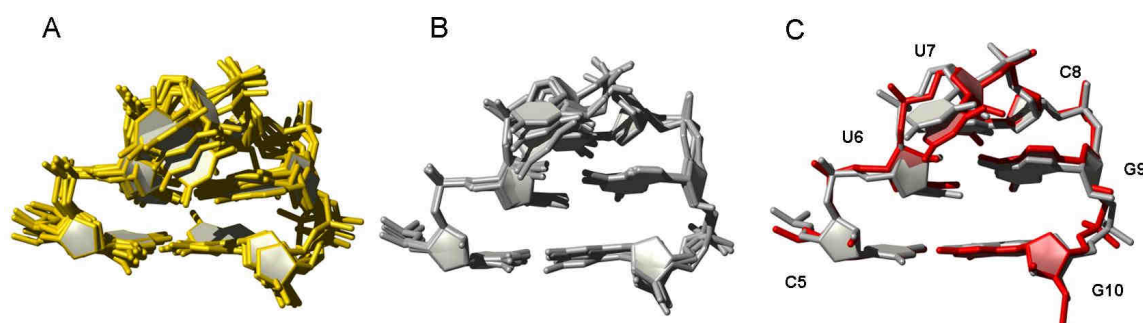


Abbildung 3-12: Vergleich der bereits veröffentlichten NMR- und Kristallstrukturen für den cUUCGg-Tetraloop. A. Überlagerung der sieben NMR-Lösungsstrukturen in gelb (pdb: 1byj, 1ikd, 1hlx, 1fyo, 1c0o, 1m5l, 1jo7). Abgebildete Strukturen repräsentieren die Struktur mit dem kleinsten RMSD-Wert innerhalb des jeweiligen Bündels. B. Überlagerung der vier Kristallstrukturen in grau (pdb: 1f7y (Tetraloop TL1 und TL2), 1i6u, 1fjg). C. Neue NMR-Lösungsstruktur (rot, 2koc) überlagert mit der Kristallstruktur (grau, 1f7y (TL1)).

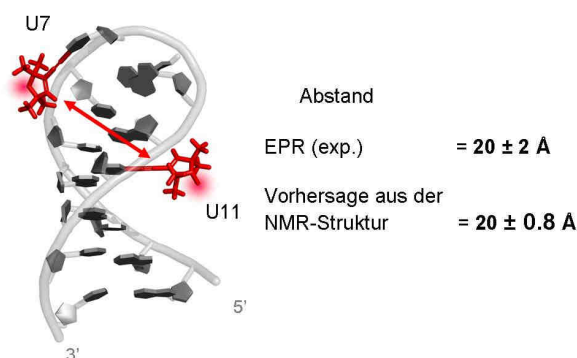
### 3.4.3 Austausch mit Wasser

Die NOESY-Spektren zeigen vier Kreuzsignale zwischen der RNA und dem Wasser. Zwei davon kommen in der direkten Dimension bei 5,04 ppm zur Resonanz und können den Iminprotonen des terminalen Nukleotids G1 und des Loop-Nukleotids U6 zugeordnet werden. Sie sind nicht vollständig vom Wasseraustausch geschützt. Kreuzsignale, die bei 4,77 ppm aufkommen, können den Basenwasserstoffen H8 der Nukleotide G1 (8,17 ppm) und G2 (7,70 ppm) zugeordnet werden. Es ist bereits bekannt, dass C8H8-Protonen der Purine mit dem Wasser austauschen können [69], und in der Tat fehlen im Spektrum, das von einer älteren 14mer-Probe in D<sub>2</sub>O aufgenommen wurden, die H8-Protonen von G1 und G9. Dies zeigt, dass diese Wasserstoffe mehr dem Lösungsmittel zugänglich sind als die entsprechenden Protonen anderen Purinbasen (G2, A4, G10, G12). Im Strukturbündel nach der

Wasserrefinerung befindet sich eine höhere Anzahl von gebundene Wassermolekülen in der Nähe des H8 von G1, die durch die Atome N7, O1P und O5' von G1 und G2 koordiniert sind (Abbildung 3-11). Für das Nukleotid G9 liegt die Nummer der gebundenen Wassermoleküle im Durchschnitt der anderen Purine (A4, G10, G12). Eine mögliche Erklärung für den Austausch des H8 von G9 könnte das Vorhandensein der potentiellen Wasserstoffbrücke zwischen U7 (2'OH) zu G9 (N7), die in einem Drittel der gerechneten Strukturen beobachtet wird, sein.

#### 3.4.4 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte eine sehr präzise Lösungsstruktur der Modellsystem-RNA der 14mer cUUCGg-Tetraloop RNA mit Hilfe einer umfassenden NMR-Datensammlung, wie den NOEs, J-Kopplungskonstanten, kreuz-korrelierten Relaxationsraten und dipolaren Restkopplungen, bestimmt werden. Mit der Verwendung der neusten NMR-Methoden ist es zum ersten Mal bei der Strukturbestimmung einer RNA gelungen, nahezu jeden Torsionswinkel experimentell zu bestimmen. Die erhaltene Konformation des cUUCGg-Tetraloops ist in Übereinstimmung mit den früher veröffentlichten Strukturen und zeigt das erwartete Netzwerk aus Wasserstoffbrücken und Stapelwechselwirkungen. Für die 2'OH-Gruppe konnte aus der Analyse der NOE-Kontakte abgeleitet werden, dass sie hauptsächlich die Ausrichtung zur O3'-Domäne annehmen. Im Kapitel 4 wird dieses Thema weiter vertieft. Die Genauigkeit der gesamten Struktur wurde durch kürzlich veröffentlichte EPR-Messungen an der TEMPO-markierten 14mer RNA bestätigt [70]. Hierbei wurde der Abstand zwischen zwei angebrachten TEMPO-Markern an den Positionen U7 und U11 gemessen. Der experimentell ermittelte Abstand von  $20 \text{ \AA}$  stimmt mit der Vorhersage aus der NMR-Struktur überein ( $20 \text{ \AA}$ ) und bestätigt somit die hohe Genauigkeit dieser Struktur.



---

Abbildung 3-13: Ergebnisse einer EPR-spektroskopischen Untersuchung einer TEMPO-merkierten 14mer cUUCGg-Tetraloop RNA.

### 3.5 Literatur

1. Batey RT, Inada M, Kujawinski E, Puglisi JD, Williamson JR. **1992**. *Nucleic Acids Res.* 20: 4515-23
2. Nikonowicz EP, Sirr A, Legault P, Jucker FM, Baer LM, Pardi A. **1992**. *Nucleic Acids Res.* 20: 4507-13
3. Quant S, Wechselberger RW, Wolter MA, Wörner KH, Schell P, et al. **1994**. *Tetrahedron Lett.* 35: 6649-51
4. Batey RT, Battiste JL, J.R. W. **1995**. *Methods Enzymol.* 261: 300-22
5. Tuerk C, Gauss P, Thermes C, Groebe DR, Gayle M, et al. **1988**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1364-8
6. Duchardt E, Richter C, Ohlenschläger O, Görlach M, Wöhnert J, Schwalbe H. **2004**. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 1962-70
7. Duchardt E, Schwalbe H. **2005**. *J. Biomol. NMR* 32: 295-308
8. Vallurupalli P, Kay LE. **2005**. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 6893-901
9. Fiala R, Sklenar V. **2007**. *J. Biomol. NMR* 39: 153-63
10. Rinnenthal J, Richter C, Ferner J, Duchardt E, Schwalbe H. **2007**. *J. Biomol. NMR* 39: 17-29
11. Ferner J, Villa A, Duchardt E, Widjajakusuma E, Wöhnert J, et al. **2008**. *Nucleic Acids Res.* 36: 1928-40
12. Fürtig B, Richter C, Bermel W, Schwalbe H. **2004**. *J. Biomol. NMR* 28: 69-79
13. Fiala R, Jiang F, Patel DJ. **1996**. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 689-90
14. Rinnenthal J, Richter C, Nozinovic S, Fürtig B, Lopez J, et al. **2009**. *J. Biomol. NMR* 45: 143-55
15. Blose JM, Proctor DJ, Veeraghavan N, Misra VK, Bevilacqua PC. **2009**. *J. Am. Chem. Soc.* 131: 8474-84
16. Banáš P, Hollas D, Zgarbová M, Jurečka P, Orozco M, et al. **2010**. *J. Chem. Theory Comp.* 6: 3836-49
17. Cherepanov A, Glaubitz C, Schwalbe H. **2010**. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 49: 4747-50
18. Sakata T, Hiroaki H, Oda Y, Tanaka T, Ikehara M, Uesugi S. **1990**. *Nucleic Acids Res.* 18: 3831-9
19. Allain FHT, Varani G. **1995**. *J. Mol. Biol.* 250: 333-53
20. Miller JL, Kollman PA. **1997**. *J. Mol. Biol.* 270: 436-50
21. Ennifar E, Nikulin A, Tishchenko S, Serganov A, Nevskaya N, et al. **2000**. *J. Mol. Biol.* 304: 35-42
22. Cheong C, Varani G, Tinoco I. **1990**. *Nature* 346: 680-2
23. Tuerk C GP, Thermes C, Groebe DR, Gayle M, Guild N, Stormo G, d'Aubenton-Carafa Y, Uhlenbeck OC, Tinoco I Jr **1988**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1364-8
24. Williams DJ HK. **2000**. *J. Mol. Biol.* 297: 251-65
25. Hennig M, Fohrer J, Carlomagno T. **2005**. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 2028-9
26. Fohrer J, Hennig M, Carlomagno T. **2006**. *J. Mol. Biol.* 356: 280-7
27. Ying J, Bax A. **2006**. *J. Am. Chem. Soc.* 128: 8372-3
28. Schwalbe H, Marino JP, Glaser SJ, Griesinger C. **1995**. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 7251-2
29. Legault P, Jucker FM, Pardi A. **1995**. *FEBS Lett.* 362: 156-60
30. Marino JP, Schwalbe H, Anklin C, Bermel W, Crothers DM, Griesinger C. **1994**. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 6472-3
31. Schwalbe H, Marino JP, King GC, Wechselberger R, Bermel W, Griesinger C. **1994**. *J. Biomol. NMR* 4: 631-44
32. Schwalbe H, Samstag W, Engels JW, Bermel W, Griesinger C. **1993**. *J. Biomol. NMR* 3: 479-86
33. Richter C, Reif B, Wörner K, Quant S, Marino JP, et al. **1998**. *J. Biomol. NMR* 12: 223-30
34. Hu W, Bouaziz S, Skripkin E, Kettani A. **1999**. *J. Magn. Reson.* 139: 181-5
35. Carlomagno T, Hennig M, Williamson JR. **2002**. *J. Biomol. NMR* 22: 65-81
36. Clore GM, Murphy EC, Gronenborn AM, Bax A. **1998**. *J. Magn. Reson.* 134: 164-7
37. Duchardt E, Richter C, Reif B, Glaser SJ, Engels JW, et al. **2001**. *J. Biomol. NMR* 21: 117-26
38. Nozinovic S, Richter C, Rinnenthal Jr, Fürtig B, Duchardt-Ferner E, et al. **2010**. *J. Am. Chem. Soc.* 132: 10318-29
39. Dingley AJ, Grzesiek S. **1998**. *J. Am. Chem. Soc.* 120: 8293-7
40. Dingley AJ, Nisius L, Cordier F, Grzesiek S. **2008**. *Nat. Protoc.* 3: 242-8

41. Piotto M, Saudek V, Sklenář V. **1992**. *J. Biomol. NMR* 2: 661-5
42. Marion D, Ikura M, Tschudin R, Bax AJ. **1989**. *J. Magn. Reson.* 85: 393-9
43. Shaka AJ, Barker PB, Freeman RJ. **1985**. *J. Magn. Reson.* 64: 547-52
44. Brunger AT AP, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T, Warren GL. **1998**. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54: 905-21
45. Linge JP, O'Donoghue SI, Nilges M. **2001**. *Methods Enzymol.* 339: 71-90
46. Pranata J, Wierschke SG, Jorgensen WL. **1991**. *J. Am. Chem. Soc.* 113: 2810-9
47. OPLS and OPLS-AA Parameters for Organic Molecules I, and Nucleic Acids" as provided by W. L. Jorgensen, Yale University.
48. Marino JP, Schwalbe H, Glaser SJ, Griesinger C. **1996**. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 4388-95
49. Richter C, Griesinger C, Felli I, Cole PT, Varani G, Schwalbe H. **1999**. *J. Biomol. NMR* 15: 241-50
50. Hansen MR, Mueller L, Pardi A. **1998**. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 5: 1065-74
51. Kuszewski J, Schwieters C, Clore GM. **2001**. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 3903-18
52. Schneider B, Moravek Z, Berman HM. **2004**. *Nucleic Acids Res.* 32: 1666-77
53. Gorenstein DG. 1984. *Phosphorus-31 NMR: Principles and Applications*  
New York: Academic Press.
54. Varani G, Aboul-ela F, Allain FHT. **1996**. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 29: 51-127
55. Boisbouvier J, Brutscher B, Pardi A, Marion D, Simorre J-P. **2000**. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 6779-80
56. Felli IC, Richter C, Griesinger C, Schwalbe H. **1999**. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 1956-7
57. Jorgensen WL, Tirado-Rives J. **1988**. *J. Am. Chem. Soc.* 110: 1657-66
58. Lu X-J, Olson WK. **2008**. *Nat. Protoc.* 3: 1213-27
59. Jeffrey I, Gyi ANL, Graeme L, Conn1, and Tom Brown. **1998**. *Nucleic Acids Res.* 26: 3104-10
60. Greatorex J, Gallego J, Varani G, Lever A. **2002**. *J. Mol. Biol.* 322: 543-57
61. Ramos A, Varani G. **1997**. *Nucleic Acids Res.* 25: 2083-90
62. Yoshizawa S, Fourmy D, Puglisi JD. **1998**. *Embo J.* 17: 6437-48
63. Carter AP, Clemons WM, Brodersen DE, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. **2000**. *Nature* 407: 340-8
64. Tishchenko S, Nikulin A, Fomenkova N, Nevskaya N, Nikonov O, et al. **2001**. *J. Mol. Biol.* 311: 311-24
65. Lynch SR, Puglisi JD. **2001**. *J. Mol. Biol.* 306: 1023-35
66. Colmenarejo G, Tinoco Jr I. **1999**. *J. Mol. Biol.* 290: 119-35
67. Bae SH, Cheong, H. K., Lee, J. H., Cheong, C., Kainosho, M., Choi, B. S. **2001**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10602-7
68. Nikulin A, Serganov A, Ennifar E, Tishchenko S, Nevskaya N, et al. **2000**. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 7: 273-7
69. Walters KJ, Russu IM. **1992**. *Biopolymers* 33: 943-51
70. Krstić I, Hänsel R, Romainczyk O, Engels JW, Dötsch V, Prisner TF. **2011**. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 50: 5070-4

---

## 4 Konformationsbestimmung der 2'OH-Gruppe in RNA mittels NMR-Spektroskopie und DFT- Rechnungen

---

Das folgende Kapitel fasst die Arbeit zusammen, die in der Publikation Nozinovic et al. (2011) veröffentlicht wurde. Dr. Boris Fürtig und Dr. Christian Richter danke ich für die Messung der  $^1\text{J}$ -Kopplungskonstanten an der 14mer RNA. Sandor Tüllmann und Puneet Gupta aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Max C. Holthausen haben die DFT-Rechnungen durchgeführt. Die 27mer RNA-Probe wurde von Dr. Julia Weigand aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beatrix Süß synthetisiert. Dr. Elke Duchardt-Ferner aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Jens Wöhnert stellte die Struktur der 27mer RNA zur Verfügung.

Nozinovic, S., Gupta, P., Fürtig, B., Richter, C., Tüllmann, S., Duchardt-Ferner, E., Holthausen, M. C., Schwalbe, H. (2011),

Determination of the Conformation of the 2'OH Group in RNA by NMR Spectroscopy and DFT Calculations.

*Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 5397-5400.



## 4.1 Einleitung

Im Gegensatz zu DNA besitzt RNA eine erheblich höhere funktionelle, strukturelle und chemische Diversität, die als essentiell für die Evolution der RNA-Welt erachtet wird [1]. Die Hydroxyl-Gruppe (2'OH) beeinflusst die Konformation der Zuckereinheit der RNA und verleiht der RNA ihre katalytische Aktivität, reduziert aber auch ihre chemische Stabilität. Die 2'OH-Gruppe kann in nicht-kanonischen Strukturregionen in Wasserstoffbrücken involviert sein und ist in kanonischen Doppelstrangstrukturen dafür verantwortlich, dass sich ein geordnetes Wassernetzwerk über die kleine Furche spannt [2]. Es ist daher von großem Interesse, die Konformation der 2'OH-Gruppe experimentell zu bestimmen. Molekulare Dynamiksimulation (MD) sagen für eine C3'-endo Konformation des Zuckers drei bevorzugte Orientierungen der 2'OH-Gruppe voraus (Abbildung 4-1) [3]. Dabei wird die 2'OH-Gruppe durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den Atomen O3', O4' des Zuckers und N3 bzw. O2 der Nukleobase gelenkt. Im Falle der C2'-endo Konformation wird ausschließlich die O3'-Domäne vorausgesagt.

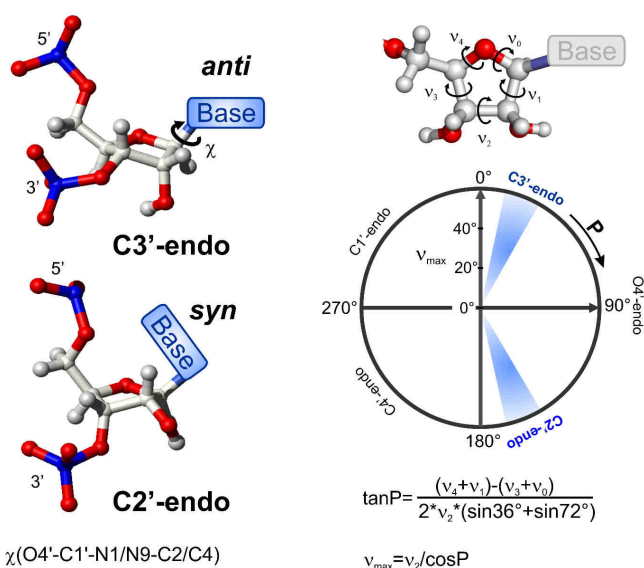
Experimentelle Untersuchung des exozyklischen Winkels stellen eine große Herausforderung für die RNA-Strukturbestimmung dar, weil die Elektronendichte des Wasserstoffatoms der 2'OH-Gruppe nur in Kristallstrukturen mit einer Auflösung von  $<1 \text{ \AA}$  bestimmt werden kann und deshalb in der Regel nicht detektierbar ist. Neutronen-Diffraktometrie stellt eine alternative Methode zur Detektion von Wasserstoffatomen dar, jedoch gibt es wenige Veröffentlichungen insbesondere für größere RNAs. Kürzlich eingeführte Tieftemperatur-NMR-Untersuchungen erlauben eine Konformationsanalyse der 2'OH-Gruppe. Sie sind aber aufgrund des chemischen Austausches mit dem Lösungsmittel begrenzt [4-7]. 2'OH-Gruppen, die sich in nicht-kanonischen Bereichen der RNA befinden, werden schnell durch Wasserstoffatome des Lösungsmittels ausgetauscht, so dass das Signal nicht beobachtet werden kann und Messungen der Strukturparameter zur Bestimmung des exozyklischen Torsionswinkels nicht möglich sind.

Im Kapitel 3 wurde eine sehr präzise Lösungsstruktur der 14mer RNA vorgestellt. Sie dient hier als Basis für die kombinierten NMR- und DFT-Untersuchungen der  $^1\text{J}(\text{C},\text{H})$ -Kopplungen in Abhängigkeit von der Konformation. Basierend auf der strukturellen Interpretation von  $^1\text{J}(\text{C},\text{H})$ -Kopplungskonstanten wird hier eine allgemein anwendbare Methode zur Bestimmung der Zuckerkonformation, der Orientierung der Nukleobase und der 2'OH-Gruppe in großen RNAs eingeführt.

Im Gegensatz zu  $^3\text{J}(\text{H},\text{H})$ -Kopplungskonstanten, die typischerweise sehr gut durch ihre Torsionswinkelabhängigkeit einem einzelnen Torsionswinkel zugeschrieben werden können, sind  $^1\text{J}(\text{C},\text{H})$ -Kopplungen von der Bindungslänge abhängig [8-9], die ihrerseits von der lokalen Struktur und somit von mehreren Winkeln beeinflusst werden [10-18]. Deshalb lassen sich  $^1\text{J}$ -Kopplungen schwer in konformationelle Information übersetzen, wie es für Proteine mit einer schwachen Korrelation zwischen den  $^1\text{J}(\text{C},\text{H})$  und der Rückgratkonformation gezeigt wurde [19-21]. Daviet et al. haben sehr früh in RNA-Nukleotiden die Abhängigkeit der  $^1\text{J}(\text{C}1',\text{H}1')$ -Kopplung von dem *N*-glykosidischen Torsionswin-

kel beobachtet [10]. Diese Arbeit wurde weiter durch theoretische Rechnungen vertieft und mit einer Karplus-ähnlichen Kurve für den Torsionswinkel  $\chi$  für ausgewählte DNA- und RNA-Nukleotide erweitert [11-13]. Serianni et al. zeigten anhand experimenteller Ergebnisse und theoretischer Rechnungen, dass beide Kopplungskonstanten in Furanose,  $^1J(C1',H1')$  und  $^1J(C2',H2')$ , von der Ringkonformation abhängig sind [9, 14-17]. Später präsentierten Ippel et al. eine umfangreiche Messung von Kopplungen für kleine Nukleotid-ähnliche Moleküle in verschiedenen Konformationen [18].

## Konformation des Zuckers und der Nukleobase



## 2'OH Orientierung

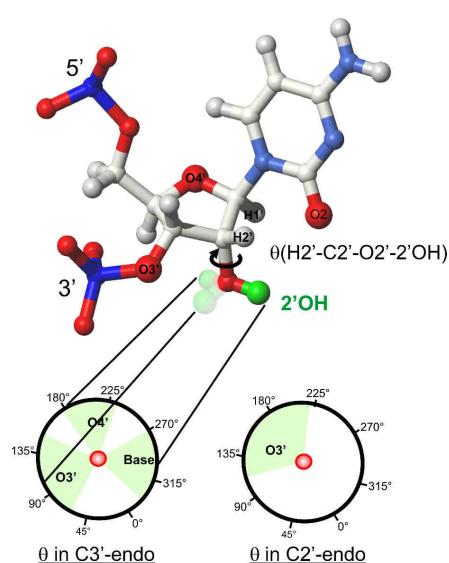


Abbildung 4-1: Links: Darstellung der Konformation des Zuckers und der Nukleobase anhand von zwei Beispielsstrukturen mit den C3'-endo/anti und C2'-endo/syn-Konformationen. Definition der Pseudorotationsphase P und der maximalen Amplitude  $v_{\max}$  durch die endozyklischen Torsionswinkel  $v_0$ - $v_4$ . Rechts: Orientierung der 2'OH-Gruppe (grün) zur O3'-, O4'- und der Nukleobase-Domäne. Das unten gezeigte Konformationsrad zeigt die Verteilungsmaxima des Torsionswinkels  $\theta(H2'-C2'-O2'-2'OH)$ , wie es in MD-Simulationen ermittelt wurde [3].

Die Berichte über Konformationsabhängigkeit der  $^1J(C,H)$ -Kopplungen in RNA und DNA gab es dementsprechend schon lange, es fehlte jedoch eine systematische Untersuchung und Quantifizierung für alle RNA-Nukleotide, die für eine Strukturanalyse herangezogen werden konnte. Die vorliegende Untersuchung wurde insbesondere durch die Arbeit von Anderson und Watanabe inspiriert, die den Einfluss eines hyper-konjugativen Effekts ( $n \rightarrow \sigma^*$ -Donation) auf die Größe der  $^1J(C,H)$ -Kopplungskonstante nachwiesen [22-24]. Das freie Elektronenpaar der 2'OH-Gruppe könnte demnach einen ähnlichen Einfluss auf die Größe der  $^1J(C,H)$ -Kopplungskonstanten der benachbarten C1'- und C2'-Ringpositionen ausüben. Die Ermittlung einer solchen Abhängigkeit sollte dann die Bestimmung der Konformation der 2'OH-Gruppe erlauben.



Um die unterschiedlichen Einflüsse der Konformationsabhängigkeit der  $^1J(\text{C,H})$ -Kopplungskonstante zu quantifizieren, wurden experimentelle NMR-Messungen mit Vorhersagen aus DFT-Rechnung verglichen.

Im ersten Schritt wurden DFT-Rechnungen von  $^1J(\text{C,H})$ -Kopplungskonstanten an nukleotidähnlichen Modellstrukturen durchgeführt, um die Abhängigkeit der  $^1J(\text{C,H})$ -Kopplungskonstanten von Zuckerkonformation und der Orientierung der Nucleobase zu quantifizieren.

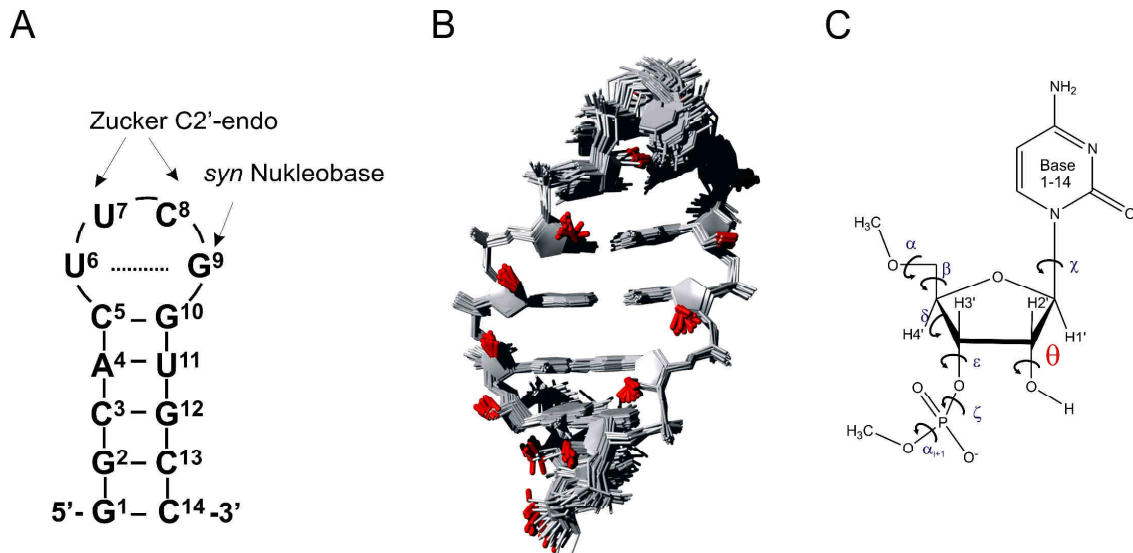


Abbildung 4-2: A. Sequenz und Sekundärstruktur der 14mer cUUCG-Tetraloop RNA. Nucleotide mit der ungewöhnlichen C2'-endo Zuckerkonformation (U7, C8) und der syn Nucleobase (G9) sind mit Pfeilen ange- deutet. B. NMR-Lösungsstrukturbandel (10 Strukturen) der 14mer RNA (2koc) mit 2'OH-Gruppen in rot. C. Chemische Struktur der für die DFT-Rechnung verwendeten Modelle. Torsionswinkel wurden entspre- chend der Lösungsstruktur eingestellt.

## 4.2 Material und Methode

### 4.2.1 Probe

14mer cUUCGg-Tetraloop RNA: siehe Kapitel 2.

27mer Neomycin RNA-Schalter: siehe Kapitel 2.

### 4.2.2 Messung der $^1J(\text{C,H})$ -Kopplungskonstanten

$^1J(\text{C,H})$ -Kopplungskonstanten wurden in der indirekten Dimension im *constant-time*  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -IPAP- HSQC-Experiment gemessen. Das  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -IPAP-HSQC-Experiment wurde aufgenommen mit 464 x 2k Datenpunkten in  $t_1$  und  $t_2$ , einer spektralen Weite von 36 und 10 ppm in  $\omega_2$  und  $\omega_1$ , sowie 8 Scans pro  $t_1$ -Inkrement. Die Protonenträgerfrequenz wird auf die Wasserresonanz (4,7 ppm) und die Kohlen-

stoffträgerfrequenz auf 77 ppm gesetzt. Es wurde eine asynchrone GARP-Entkopplung auf dem  $^{13}\text{C}$ - und dem  $^{15}\text{N}$ -Kanal verwendet, um die heteronukleare skalare Kopplungen während der Akquisition zu unterdrücken [25]. Die Pulssequenz stammt aus der Bruker-Datenbank.

### 4.2.3 DFT-Rechnungen

Details zur Methode und Kalibrierung der DFT-Rechnung wurden vom Kooperationspartner der Arbeitsgruppe vom Prof. Dr. M. Holthausen in der gemeinsamen Veröffentlichung beschrieben [26].

### 4.3 Ergebnisse

Für die DFT-Rechnung wurde die Methode B3LYP/TZVP(+PCM:water) nach genauen Benchmark-Rechnungen von NMR-Spin-Kopplungen und verwandten Modellsystemen ausgewählt [26]. Für jeden Nukleotidtyp wurden vier Modellstrukturen mit der für RNA charakteristischen Hauptkonformation bezüglich des Zuckers und der Nukleobase (C3'endo/anti oder syn, C2'endo/anti oder syn) konstruiert. Als Ausgangstrukturen dienten dabei die Ribosom-Kristallstruktur (pdc-code:2ffk) [27] und die zuvor bestimmte NMR-Lösungsstruktur der 14mer RNA (pdb-code:2koc) (Tabelle 4-1) [7]. Die Orientierungen der 2'OH-Gruppe wurden mit den Torsionswinkeln  $160^\circ$  für C3'-endo und  $100^\circ$  für C2'-endo in der jeweiligen O3'-Domäne festgehalten.

Die Abbildung 4-3 zeigt die so vorhergesagten  $^1\text{J}(\text{C},\text{H})$ -Kopplungen für jeden Nukleotid-Typ mit der Base in *anti*- oder *syn*-Orientierung für beide Zuckerkonformationen (C3'- oder C2'endo). Die berechneten Daten zeigen, dass die Zuckerkonformation einen eindeutigen Einfluss auf beide Kopplungen hat, während die Orientierung der Base (*anti* oder *syn*) hauptsächlich einen Einfluss auf die  $^1\text{J}(\text{C}1',\text{H}1')$ -Kopplung aufweist.

Tabelle 4-1: DFT-gerechnete  $^1J(C,H)$ -Kopplungskonstanten für jedes Nukleotid mit der Nukleobase Cytosin (C), Uridin (U), Guanosin (G), Adenosin (A) in den vier Hauptkonformationen bezüglich der Zuckerkonformation (C3'- and C2'-endo) und der Orientierung der Nukleobase (*anti* und *syn*). Die Geometrie der Nukleotide stammt aus der 14mer NMR-Lösungsstruktur (2koc) und der Ribosom-Kristallstruktur (1ffk)[27].

Zuckerkonformation	Nukleobase	$\chi(^{\circ})^a$	$P(^{\circ})^b$	$\nu_{max}(^{\circ})^b$	$^1J(C1',H1')^c$ (Hz)	$^1J(C1',H1')^d$ (Hz)	$^1J(C2',H2')^c$ (Hz)	
C3'endo	C	62	33,8	35,6	164,9	167,9	160,3	
		206	8,6	36,7	175,3	178,3	161,3	
	U	70	50,0	37,8	162,4	165,4	160,2	
		201	9,3	35,6	176,9	179,9	161,7	
	G	61	37,9	39,8	163,7	166,7	159,4	
		205	5,3	34,6	170,8	173,8	161,4	
	A	62	17,7	32,5	167,9	170,9	160,1	
		211	3,3	33,6	170,2	173,2	161,5	
	C2'endo	C	62	174,8	36,5	159,1	162,1	151,3
			237	165,0	35,7	165,7	168,7	147,1
U		62	172,4	37,5	161,5	164,5	150,5	
		239	158,4	32,9	167,3	170,3	148,6	
G		72	164,8	36,5	159,3	162,3	149,7	
		217	176,7	34,9	164,1	167,1	151,1	
A		62	174,7	37,1	161,8	164,8	149,2	
		197	172,5	38,4	166,5	169,5	146,4	

a)  $\chi(^{\circ})$ : Der glycosidische Winkel ist festgesetzt auf *syn* oder *anti* während der Geometrieoptimierung. b) P: Phase der Pseudorotation,  $\nu_{max}$ : maximale Amplitude nach der Geometrieoptimierung mit DFT-Rechnung. c)  $^1J$  DFT-gerechnete Kopplungen ohne Korrektur. d)  $^1J$  DFT-gerechnete Kopplungen mit einer linearen Korrektur von + 3 Hz.

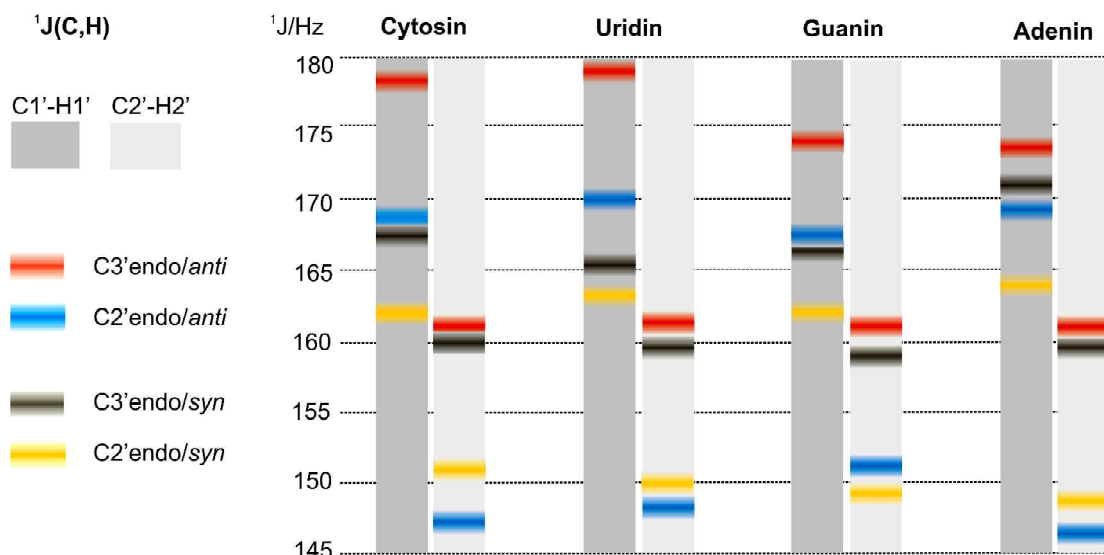


Abbildung 4-3: DFT gerechnete  $^1J(C1',H1')$ - und  $^1J(C2',H2')$ -Kopplungen für jedes Nukleotid mit der Nukleobase Cytosin Cytosin, Uridin, Guanosin, Adenosin in jeweils vier Hauptkonformationen mit dem Zucker in der C3'-endo oder C2'-endo und der Nukleobase in *anti*- oder *syn*-Orientierung (Tabelle 4-1)).

Die kombinierte Untersuchung der beiden Kopplungskonstanten mit einer Differenz von bis zu 14 Hz erlaubt eine verlässliche Unterscheidung der vier Hauptkonformationen. Wir schlagen deshalb das Diagramm in der Abbildung 4-3 als ein Instrument zur Bestimmung der RNA-Konformation und testen es hier mit der Analyse eines 27mer RNA-Schalters, über dessen Struktur und Dynamikeigenschaften kürzlich in einer NMR-Untersuchung berichtet wurden [28-29].

Die experimentellen Ergebnisse und die Vergleichsprüfung mit den vorhergesagten Werten sind in der Abbildung 3-4 dargestellt. Insgesamt kann auf diese Weise die Konformation von 21 Resten eindeutig zugeordnet werden. Die verbleibenden fünf Reste sind durch Kopplungen charakterisiert, die nicht durch eine einzelne Konformation reproduziert werden können. Tatsächlich befinden sich diese Reste innerhalb der Ausbuchtung und am 3'-terminalen Ende der RNA; beides Regionen, denen in der vorausgegangenen NMR-Untersuchung anhand der gemessenen  $^3J(H,H)$ -Kopplungen und hetNOEs höhere Dynamik und Flexibilität zugewiesen wurde [29].

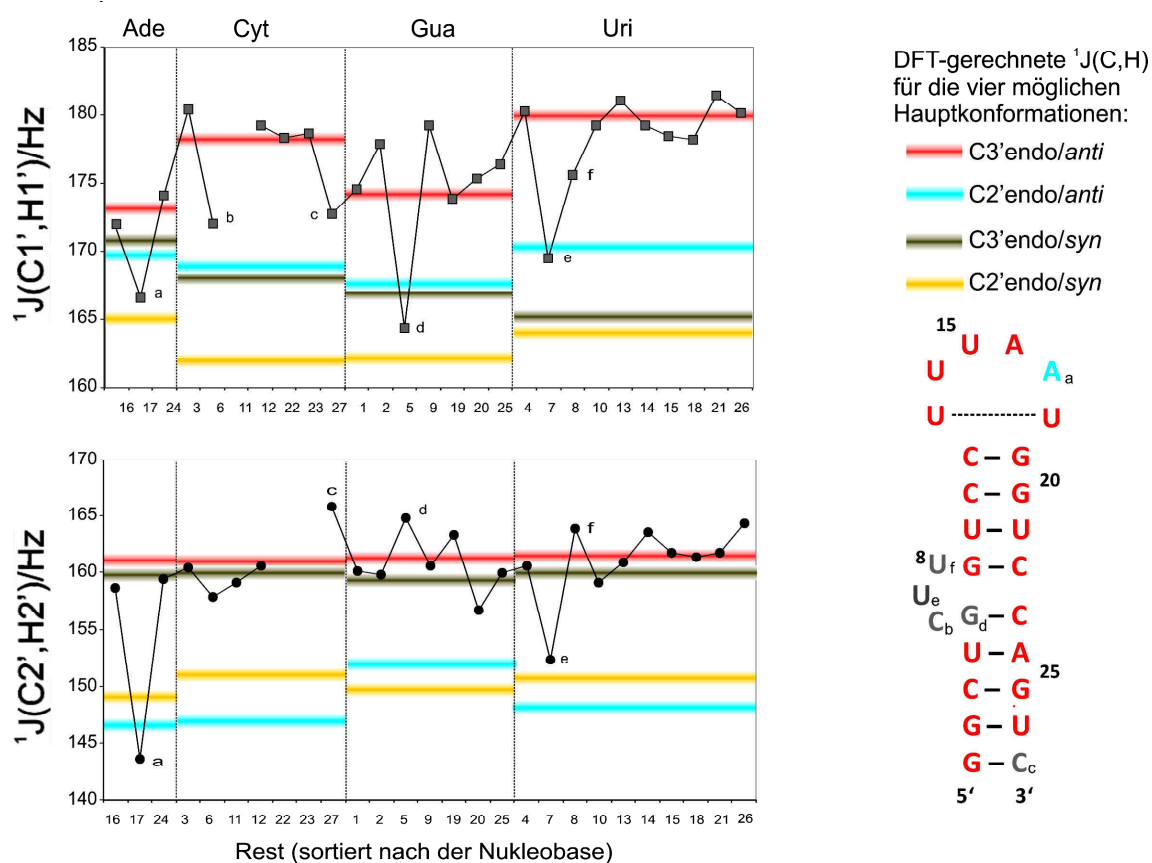


Abbildung 4-4: Experimentell bestimmte  $^1J(C,H)$ -Kopplungskonstanten für den 27mer RNA-Schalter mit dem Liganden Neomycin bei einer Temperatur von 298K [28, 30]. Im Hintergrund sind Referenzwerte für vier Hauptkonformationen bezüglich der Zuckerkonformation und der Orientierung der Nucleobase durch Farbbalken angegeben (vgl. Abbildung 4-4). Die Sequenz und Sekundärstruktur der 27mer RNA ist unten rechts dargestellt. Die Farbe der Reste repräsentiert die Konformation, wie sie aus den gemessenen  $^1J(C,H)$ -Kopplungskonstanten abgeleitet werden kann. Reste mit ungewöhnlichen Kopplungskonstanten, die in keine eindeutige Konformation übersetzt werden können, sind mit kleinen Buchstaben markiert und im Diagramm referenziert.

Im zweiten Satz von DFT-Rechnungen wurde der Torsionswinkel  $\theta(\text{H}2'-\text{C}2'-\text{O}2'-2'\text{OH})$ , der die Orientierung der exozyklischen 2'OH-Gruppe beschreibt, von  $0^\circ$  bis  $340^\circ$  in Schritten von  $20^\circ$  variiert. Die Abbildung 4-5 zeigt die Ergebnisse für die Nucleotide Cytosine und Uridine, die aus den Resten C3 und U7 der 14mer RNA-Lösungsstruktur mit jeweils der C3'- und C2'-endo Konformation des Zuckers und *anti* Stellung der Nucleobase konstruiert wurden.

Es lässt sich ein beträchtlicher Einfluss der Orientierung der 2'OH-Gruppe auf die  $^1\text{J}(\text{C},\text{H})$ -Kopplung beobachten:  $^1\text{J}(\text{C}1',\text{H}1')$  variiert um 6 Hz (Cyt) und 3 Hz (Uri),  $^1\text{J}(\text{C}2',\text{H}2')$  ist mit Unterschieden von 7 Hz (Cytosin) und 9 Hz (Uridin) empfindlicher. Eine Übereinstimmung zwischen den experimentellen und gerechneten Kopplungen für diese angeführten Reste der 14mer RNA (C3, U7) lässt sich nur für eine bestimmte Orientierung der 2'OH finden. In beiden Fällen entspricht es den Orientierungen, die in der MD-Simulation als bevorzugte Orientierungen (O3'-Domäne) gefunden wurden.

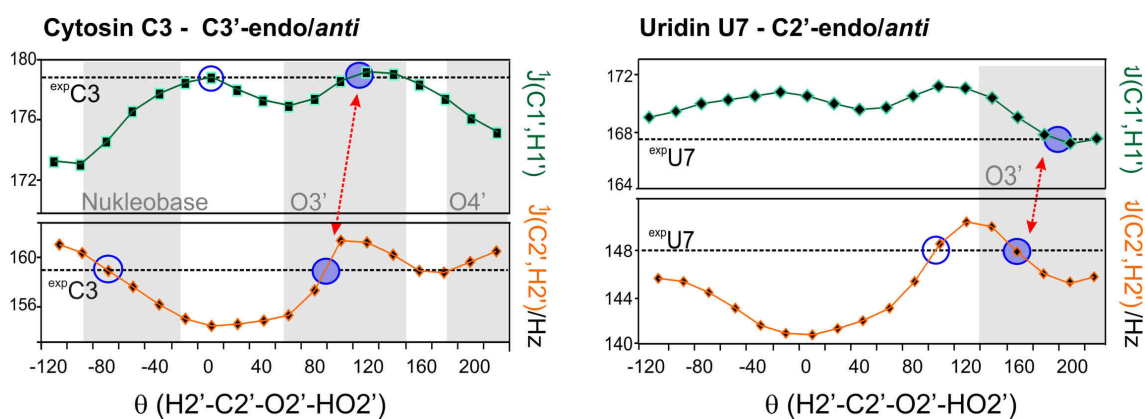


Abbildung 4-5: DFT-gerechnete  $^1\text{J}(\text{C},\text{H})$ -Kopplungskonstanten für die Reste C3 (links) und U7 (rechts) als Funktion des Torsionswinkels  $\theta(\text{H}2'-\text{C}2'-\text{O}2'-2'\text{OH})$ . Die 2'OH-Orientierungen, welche am häufigsten in der MD-Simulation populiert sind, sind mit einem grauen Hintergrund bezogen auf die vertikale Achse angedeutet (Nucleobase-, O3'- und O4'-Domäne). Experimentelle Werte für die  $^1\text{J}(\text{C},\text{H})$ -Kopplungskonstanten der Reste C3 und U7 der 14mer RNA sind mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet. Die Übereinstimmung mit den theoretischen Werten ist mit einem Kreis hervorgehoben und befindet sich in beiden Fällen in der O3'-Domäne (blau gefüllter Kreis).

Der Einfluss der 2'OH-Gruppe bestätigt sich in DFT-Rechnungen für alle Nucleotide mit der Zuckerkonformation C3'- und C2'-endo und der Nucleobase in *anti*-Stellung. Die Werte zeigen auch, dass sich die Orientierung der 2'OH-Gruppe in Zuckern mit der C3'-endo-Konformation stärker auf die  $^1\text{J}(\text{C}1',\text{H}1')$  auswirkt, dagegen für die C2'-endo-Konformation stärker auf die  $^1\text{J}(\text{C}2',\text{H}2')$ -Kopplung. In der C2'-endo Konformation bewegen sich die  $^1\text{J}(\text{C}1',\text{H}1')$ -Kopplungen für alle Nucleotide in der gleichen Größenordnung. Beim Übergang zur Konformation C3'-endo bewegen sich Uridin und Cytosin bei 5-7 Hz höheren Werten als Adenin und Guanin. Die  $^1\text{J}(\text{C}2',\text{H}2')$ -Kopplung fällt in C3'-endo Konformation dagegen für alle Nucleotide ähnlich aus und variiert nur im Bereich von  $0$  bis  $90^\circ$ . In der C2'-endo Konformation ändern sich die elektronischen Eigenschaften an der C2'H2'-Bindung vor allem bei Guanin, das mit systematisch höheren  $^1\text{J}(\text{C}2',\text{H}2')$ -Kopplung von anderen Nucleotiden abweicht.

Die 14mer RNA wurde mit umfassenden NMR-Untersuchungen strukturell charakterisiert (Kapitel 3). Die Analyse der homonuklearen Kopplungen und der kreuzkorrelierten Relaxationsraten hat ergeben, dass die Zuckerreste innerhalb der Doppelhelix und des Schlaufenbasenpaars U6-G9 eine C3'-endo Konformation annehmen (Kapitel 3, Tabelle 3-11). Die beiden Schlaufenreste U7 und C8 nehmen C2'-endo Konformation ein und unterlaufen auf der NMR-Zeitskala keinen konformationellen Austauschprozessen. Die G9-Nukleobase nimmt die ungewöhnliche *syn*-Konformation ein [31-32].

Im Kapitel 2 wurden die NOE-Kontakte der 2'OH-Gruppen analysiert, um eine bevorzugte Orientierung zu ermitteln. Das finale Strukturbündel, das mit der NOE-Analyse konsistent ist, zeigt, dass sich die 2'OH-Gruppen der Doppelhelixreste hauptsächlich in Richtung der O3'-Domäne ausrichten, während die 2'OH-Gruppe von U6 eine Orientierung in Richtung der Base-Domäne annimmt, um eine H-Brücke auszubilden. Sowohl für die endständigen Reste G1 und C14, als auch die Schlaufenreste U7, C8 und G9 war es aufgrund des Austausches mit dem Wasser nicht möglich, ein NMR-Signal der 2'OH-Gruppen zu detektieren und die entsprechende NOE-Analyse durchzuführen. Daher sind die resultierenden Orientierungen der genannten Reste innerhalb des Strukturbündels nur durch das Kraftfeld des ARIA-Programms bestimmt und nicht experimentell definiert [33-34].

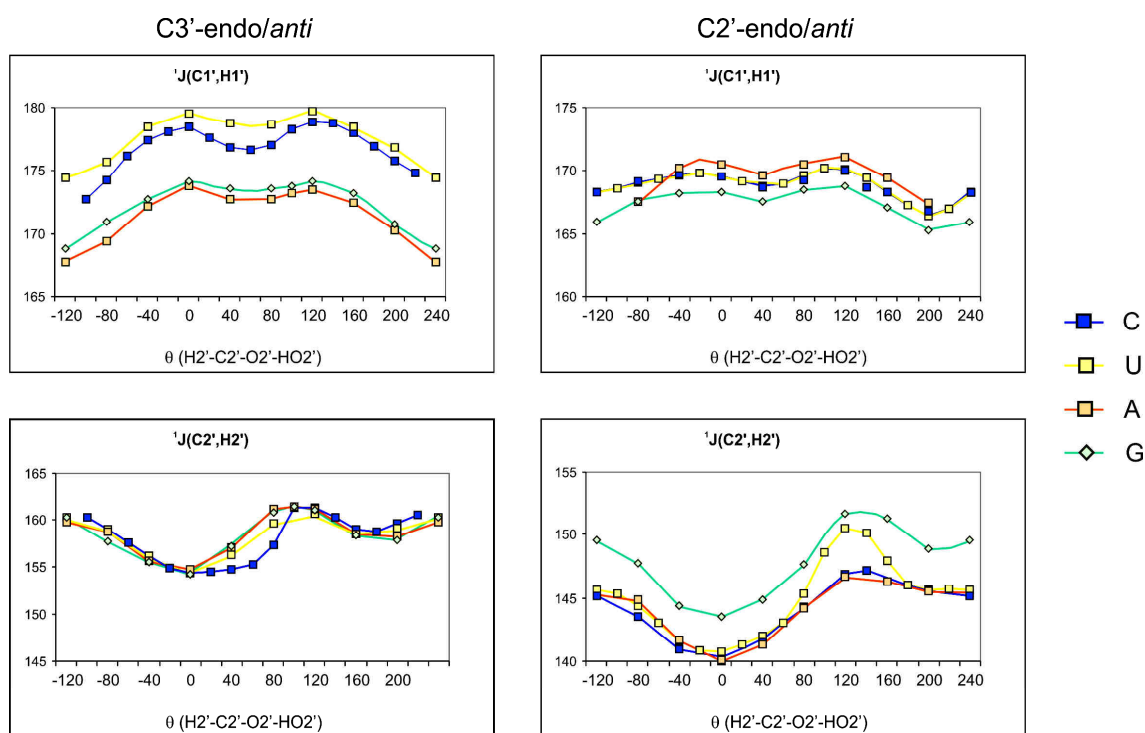


Abbildung 4-6: DFT-gerechnete  $^1J(C,H)$ -Kopplungskonstanten für alle Nukleotide mit der Base Guanin (G), Adenin (A), Cytosin (C), Uridin (U) in der Konformation C3'-endo/*anti* als Funktion des Torsionswinkels  $\theta$ (H2'-C2'-O2'-2'OH).

Die experimentell bestimmten  $^1J(C,H)$ -Kopplungen der 14mer RNA gemessen in Wasser als Lösungsmittel sind in Abbildung 4-7 dargestellt. Die  $^1J(C,H)$ -Kopplungen sind tendenziell für die Reste mit C3'-endo Konformation größer als die mit C2'-endo. Eine Ausnahme sind die Ergebnisse zum Rest G9, was sich mit der *syn*-Konformation der Nucleobase erklären lässt.

Alle Kopplungen für die 14mer RNA wurden mit DFT gerechnet und dabei die Modellstrukturen basierend auf der hoch aufgelösten NMR-Lösungsstruktur genutzt. Die 2'OH-Gruppe wurde entsprechend der experimentell bestimmten Orientierung fixiert. Die Abbildung 4-7 zeigt, dass die theoretisch gerechneten Kopplungskonstanten sehr gut die experimentellen Daten reproduzieren, sowohl in Hinsicht auf die absolute Größe als auch auf die konformationellen Abhängigkeit. Eine Ausnahme stellt G10 (gekennzeichnet mit einem Stern in der Abbildung 4-7) dar. Zur Erklärung der geringen Diskrepanz sei erwähnt, dass auch andere NMR Daten an dieser Stelle auf einen Austauschprozess hindeuten (Kapitel 3). In dem gemessenen Bereich der Kopplungen (140-180 Hz) weichen die gerechneten Werte um 3,7 und 3,3 Hz von den experimentellen ab. Der Fehler wird auf 0,7 Hz für  $^1J(C1',H1')$  reduziert, wenn eine lineare Korrektur von +3 Hz vorgenommen wird [35]. Die kombinierte Analyse aus NMR und DFT gibt genaue Informationen über die Orientierung der 2'OH-Gruppen der 14mer RNA und erlaubt sogar die Konformationsanalyse für 2'OH-Gruppen, die aufgrund des Lösungsmittelaustausches experimentell nicht direkt detektierbar sind. Die Ergebnisse demonstrieren, dass die  $^1J(C,H)$ -Kopplungen, wie sie anhand der systematischen Veränderung des Torsionswinkels  $\theta$  berechnet wurden, eine eindeutige Charakterisierung der 2'OH-Gruppe ermöglichen.

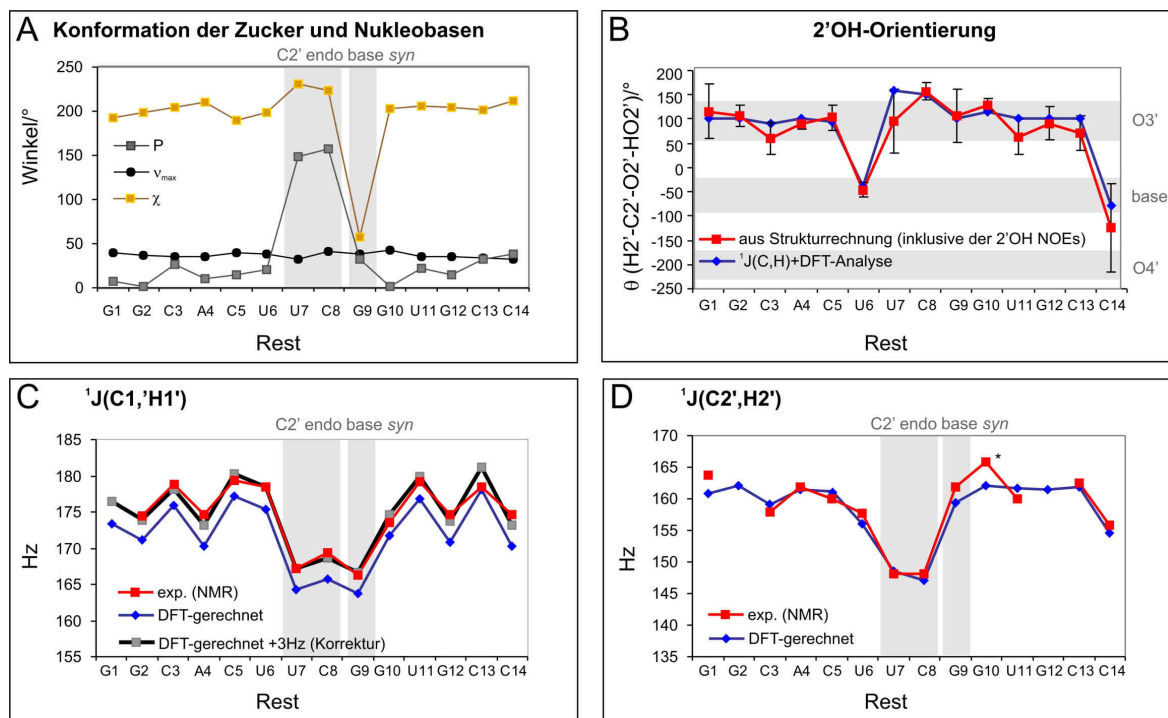


Abbildung 4-7: Konformation der 14mer RNA in Lösung (2koc) und Analyse der  $^1J(H1',C1')$ / $^1J(H2',C2')$ -Kopplungskonstanten mit NMR und DFT. A. Orientierung der Nucleobase beschrieben durch den Torsionswinkel  $\chi$ , Zuckermodus beschrieben durch P und  $\nu_{max}$ . B. Die 2'OH-Orientierung beschrieben durch  $\theta$ .

den Torsionswinkel  $\theta$  wurden aus den 20 Strukturen mit der niedrigsten Energie aus der Strukturrechnung ermittelt. Schlaufenreste mit der Nukleobase in *syn*-Orientierung (G9) und C2'-endo Zuckerkonformation (U7 und C8) sind durch den grauen Hintergrund hervorgehoben in A und C. D. Die Orientierungen in Richtung der O3'-, O4'- und Nukleobasen-Domäne sind durch einen grauen Hintergrund hervorgehoben in B. C+D. Experimentelle (NMR) and DFT gerechnete  $^1J(\text{H}1',\text{C}1')/^1J(\text{H}2',\text{C}2')$ -Kopplungskonstanten. Die DFT gerechneten Daten für die  $^1J(\text{C}1',\text{H}1')$ -Kopplungen sind mit und ohne die lineare Korrektur von + 3 Hz gezeigt. Die experimentelle  $^1J(\text{C}2',\text{H}2')$ -Kopplung von G10 ist mit einem Stern gekennzeichnet, siehe Text.

Die hier vorgeschlagene Methode setzt auf die Analyse von nicht austauschbaren Protonen (H1', H2') und kann deshalb an Proben, die D<sub>2</sub>O als Lösungsmittel enthalten, angewandt werden. Auf diesem Weg kann das Wassersignal, das in der Region der C1'H1'- und C2'H2'-Signale überlappt, vermieden werden. Die Übereinstimmung der gemessenen Kopplungen in D<sub>2</sub>O und H<sub>2</sub>O (Abbildung 4-8) versichert, dass die Untersuchung in D<sub>2</sub>O durchgeführt werden kann.

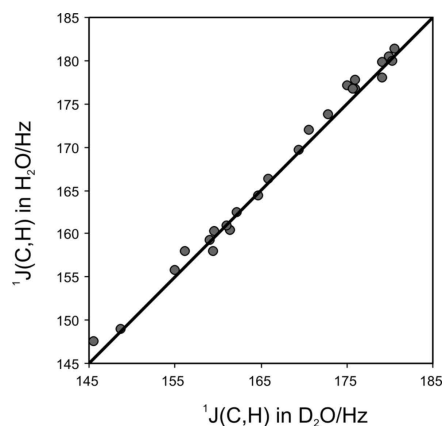


Abbildung 4-8: Korrelation der experimentellen  $^1J(\text{C}1', \text{H}1')$  und  $^1J(\text{C}2', \text{H}2')$ -Kopplungen der 14mer RNA gemessen in H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O bei einer Temperatur von 298 K.

#### 4.4 Temperaturabhängigkeit der $^1J(\text{C},\text{H})$ -Kopplungskonstanten

Die Temperaturabhängigkeit der  $^1J(\text{C},\text{H})$ -Kopplungskonstante wurde an den Ringpositionen C1', C2', C3' und C4' für die Temperaturen von 278 bis 298 K gemessen. Der geringe Einfluss der Temperatur auf die  $^1J(\text{C}1',\text{H}1')$ -Kopplungen verdeutlicht, dass die Konformation des Zuckers und der Nukleobase über den gemessenen Temperaturbereich stabil ist. Für die  $^1J(\text{C}2',\text{H}2')$ -Kopplungskonstante gilt ein ähnlicher Trend jedoch mit lokalen Ausnahmen. Große Variationen der Kopplungskonstanten an der Position C2' können für die Reste G1, G2, G5, G9 und U11 beobachtet werden. Aufgrund der im Vergleich gleichbleibenden Kopplungen an der C1'-Position kann davon ausgegangen werden, dass die Veränderungen der  $^1J(\text{C}2',\text{H}2')$ -Kopplung für diese Reste auf eine Konformationsänderung der 2'OH-Gruppe zurückgeführt werden können. Ebenfalls ist denkbar, dass die Ausbildung oder Unterbrechung von Wasserstoffbrücken zwischen der 2'OH-Gruppe und der Umgebung einen Einfluss auf die



Kopplungskonstante haben kann. Die größten Schwankungen der Kopplungskonstante lässt sich an der Position C3', an der die freien Elektronenpaare des O3'-Sauerstoffatoms einen Einfluss ausüben können, detektieren. Die große Temperaturabhängigkeit deutet auf eine Veränderung der Rückgratkonformation oder der Dynamik um den C3'-O3'-Bindung hin. Eine genaue Korrelation zwischen den Schwankungen der Kopplungskonstante und dem Ausmaß der konformationellen Änderungen kann an dieser Stelle nicht hergestellt werden, weil theoretische Berechnungen für diese Kopplung nicht durchgeführt wurden. In der Reihe der  $^1J(\text{C3}',\text{H3}')$ -Kopplungen ist der Rest U7 hervorzuheben, weil hier für alle Temperaturen die gleiche Konstante gemessen wurde. Die in früheren NMR-Untersuchungen identifizierte Dynamik bleibt bei tiefen Temperaturen erhalten und sorgt für die gleiche Mittelung der Konstante bei allen Temperaturen. Weitere lokale Unterschiede können nicht in einen direkten Zusammenhang mit der Struktur und Dynamikeigenschaften gebracht werden. Ebenso kann die ungewöhnlich kleine Kopplungskonstante für den Rest U21 nicht erklärt werden. Die  $^1J(\text{C4}',\text{H4}')$ -Kopplungskonstanten sind im Vergleich zu  $^1J(\text{C3}',\text{H3}')$ -Kopplungskonstanten weniger empfindlich auf Temperaturänderungen und nehmen für die Reste C3 und C11 ungewöhnlich niedrige Werte an, die durch die Struktur nicht erklärt werden können.

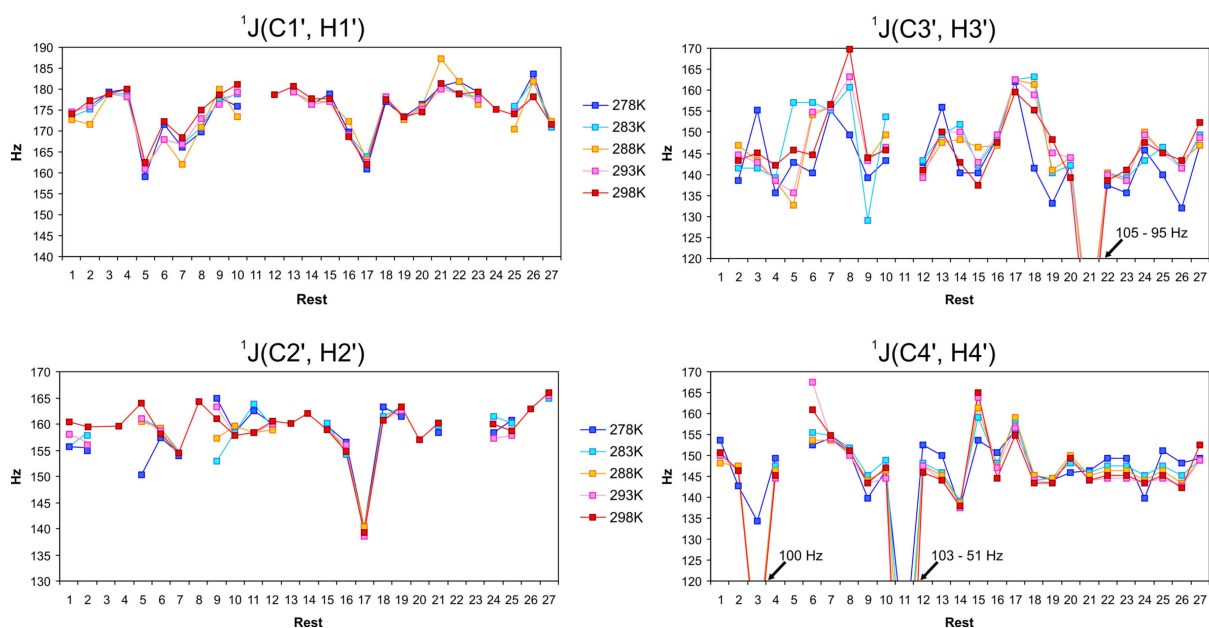


Abbildung 4-9: Temperaturabhängigkeit der  $^1J(\text{C,H})$ -Kopplungskonstanten an den Positionen C1', C2, C3' und C4', gemessen an der 27mer RNA für Temperaturen von 278 bis 298K.

#### 4.5 Zusammenfassung und Diskussion

In dieser Arbeit wurde die konformationelle Abhängigkeit der  $^1J(\text{C,H})$ -Kopplungen, eines einfach zu messenden NMR-Parameters, untersucht und dabei demonstriert, dass eine signifikante Abhängigkeit der beiden Kopplungen von der Konformation des Zuckers und der Nukleobase als auch der

2'OH-Gruppe besteht. Experimentelle und theoretische Ergebnisse sind in sehr guter Übereinstimmung und bestätigen damit die Genauigkeit sowohl der 14mer RNA Lösungsstruktur als auch der gewählten DFT-Methode.  $^1J(\text{C}1',\text{H}1')$ - und  $^1J(\text{C}2',\text{H}2')$ -Kopplungen sind verlässliche Sensoren für die Zucker- und Nukleobasen-Konformation und können deshalb zur Konformationsanalyse eingesetzt werden. Für die Mehrheit der Nukleotide eines RNA-Moleküls häufen sich die Konformationen in einem engen Bereich, der entweder der C3'-endo oder C2'-endo-Konformation mit der Nukleobase in *anti* oder *syn* entspricht [36]. Die qualitative Interpretation der  $^1J(\text{C},\text{H})$ -Kopplungen stellt daher eine Methode dar, die zwischen den vier Hauptkonformationen unterscheiden kann, wie es für die Strukturrechnung in den meisten Fällen ausreichend ist. Unsere Methode ist insbesondere für die Strukturbestimmung von großen RNA-Molekülen von Bedeutung, weil die  $^1J(\text{C},\text{H})$ -Kopplungen unproblematisch gemessen werden können, sogar ohne Isotopenmarkierung. Die Verwendbarkeit und die erfolgreiche Umsetzung unserer Methode wurden am Beispiel des 27mer RNA-Schalters demonstriert, für das eine eindeutige Konformationsanalyse der rigiden Strukturelemente und die Identifizierung flexibler Bereiche möglich ist. Bis jetzt war die konformationelle Charakterisierung der 2'OH-Gruppe, die die spezifischen Eigenschaften der RNA im Vergleich zur DNA ausmacht, nur in wenigen Fällen und eingeschränkt möglich. In dieser Arbeit erlaubte die deutliche Abhängigkeit der  $^1J(\text{C},\text{H})$ -Kopplungen von der 2'OH-Gruppe eine indirekte Bestimmung dieses schwer zu bestimmenden Strukturparameters, sogar bei schnellem Lösungsmittelaustausch und in Proben mit D<sub>2</sub>O als Lösungsmittel.

#### 4.6 Literatur

1. Gilbert W. **1986**. *Nature* 618
2. Egli M, Portmann S, Usman N. **1996**. *Biochemistry* 35: 8489-94
3. Auffinger P, Westhof E. **1997**. *J. Mol. Biol.* 274: 54-63
4. Hennig M, Fohrer J, Carlomagno T. **2005**. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 2028-9
5. Ying J, Bax A. **2006**. *J. Am. Chem. Soc.* 128: 8372-3
6. Fohrer J, Reinscheid U, Hennig M, Carlomagno T. **2006**. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 45: 7033-6
7. Nozinovic S, Fürtig B, Jonker HRA, Richter C, Schwalbe H. **2010**. *Nucleic Acids Res.* 38: 683-94
8. Thibaudeau C, Stenutz R, Hertz B, Klepach T, Zhao S, et al. **2004**. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 15668-85
9. Cloran F, Carmichael I, Serianni AS. **1999**. *J. Phys. Chem. A* 103: 3783-95
10. Davies DB, Rajani P, MacCoss M, Danyluk SS. **1985**. *Magn. Reson. Chem.* 23: 72-7
11. Munzarova ML, Sklenar V. **2003**. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 3649-58
12. Fischer JT, Reinscheid UM. **2006**. *Eur. J. Org. Chem.* 2006: 2074-80
13. Vokáčová Z, Bickelhaupt FM, Šponer J, Sychrovský Vr. **2009**. *J. Phys. Chem. A* 113: 8379-86
14. Kline PC, Serianni AS. **1992**. *J. Org. Chem.* 57: 1772-7
15. Podlasek CA, Stripe WA, Carmichael I, Shang M, Basu B, Serianni AS. **1996**. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 1413-25
16. Serianni AS, Wu J, Carmichael I. **1995**. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 8645-50
17. Duker JM, Serianni AS. **1993**. *Carbohydr. Res.* 249: 281-303
18. Ippel JH, Wijmenga SS, Jong Rd, Heus HA, Hilbers CW, et al. **1996**. *Magn. Reson. Chem.* 34: S156-S176

19. Vuister GW, Delaglio F, Bax A. **1993**. *J. Biomol. NMR* 3: 67-80
20. Cornilescu G, Bax A, Case DA. **2000**. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 2168-71
21. Schmidt JM, Howard MJ, Maestre-Martínez M, Pérez CS, Löhr F. **2009**. *Mag. Res. Chem.* 47: 16-30
22. Watanabe S, Ando I, Sakamoto Y. **1982**. *J. Mol. Struct.* 82: 237-43
23. Contreras RH, Peralta JE. **2000**. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spect.* 37: 321-425
24. Maiti NC, Zhu Y, Carmichael I, Serianni AS, Anderson VE. **2006**. *J. Org. Chem.* 71: 2878-80
25. Shaka AJ, Barker PB, Freeman RJ. **1985**. *J. Magn. Reson.* 64: 547-52
26. Nozinovic S, Gupta P, Fürtig B, Richter C, Tüllmann S, et al. **2011**. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 50: 5397-400
27. Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore PB, Steitz TA. **2000**. *Science* 289: 905-20
28. Weigand JE, Sanchez M, Gunnesch E-B, Zeiher S, Schroeder R, Suess B. **2008**. *RNA* 14: 89-97
29. Duchardt-Ferner E, Weigand J, Ohlenschläger O, Schmidtke S, Suess B, Wöhnert J. **2010**. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 49: 6216-9
30. Schmidtke SR, Duchardt-Ferner E, Weigand JE, Suess B, Wöhnert J. **2010**. *Biomol. NMR Assign.* 4: 115-8
31. Duchardt E, Richter C, Ohlenschläger O, Görlach M, Wöhnert J, Schwalbe H. **2004**. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 1962-70
32. Rinnenthal J, Richter C, Ferner J, Duchardt E, Schwalbe H. **2007**. *J. Biomol. NMR* 39: 17-29
33. Nilges M, Macias MJ, O'Donoghue SI, Oschkinat H. **1997**. *J. Mol. Biol.* 269: 408-22
34. Linge JP, S.I. O'Donoghue and M. Nilges. **2001**. *Methods Enzymol.* 339: 71-90
35. Bagno A, Rastrelli F, Saielli G. **2008**. *Magn. Reson. Chem.* 46: 518-24
36. Schneider B, Moravek Z, Berman HM. **2004**. *Nucleic Acids Res.* 32: 1666-77



---

## **5 Einfluss der Länge der P1-Helix auf Struktur und Bindung des *pbuE* Adenin-RNA-Schalters**

---

Im folgenden Kapitel wurden zusätzlich Daten aus der Doktorarbeit von Dr. Jonas Noeske und nicht veröffentlichte Ergebnisse aus der Diplomarbeit von Anke Reining verwendet.



## 5.1 Einleitung

Der *pbuE* Adenin-NA-Schalter gehört zu den 36 bisher bekannten Vertretern der Purin-bindenden RNA-Schalter (Abbildung 5-1) [1-3]. Das zentrale Strukturelement der konservierten, etwa 70 Nukleotid langen Aptamerdomäne dieser Purin-bindenden RNA-Schalter, besteht aus einer Dreiwegekreuzung [4]. Sie beinhaltet zwei Haarschleifenstrukturen (P2 und P3), die miteinander über die Schlaufen (L2, L3) in Kontakt treten können und dabei eine parallele Ausrichtung einnehmen. Die dritte Helixstruktur P1 wird aus den 5'- und 3'-Enden der Aptamerdomäne gebildet. Der 3'-terminale Bereich der Aptamerdomäne stellt die „Schaltsequenz“ dar, die in der vollen Länge des RNA-Schalters in zwei konkurrierenden Sekundärstrukturen involviert sein kann (Abbildung 1-21).

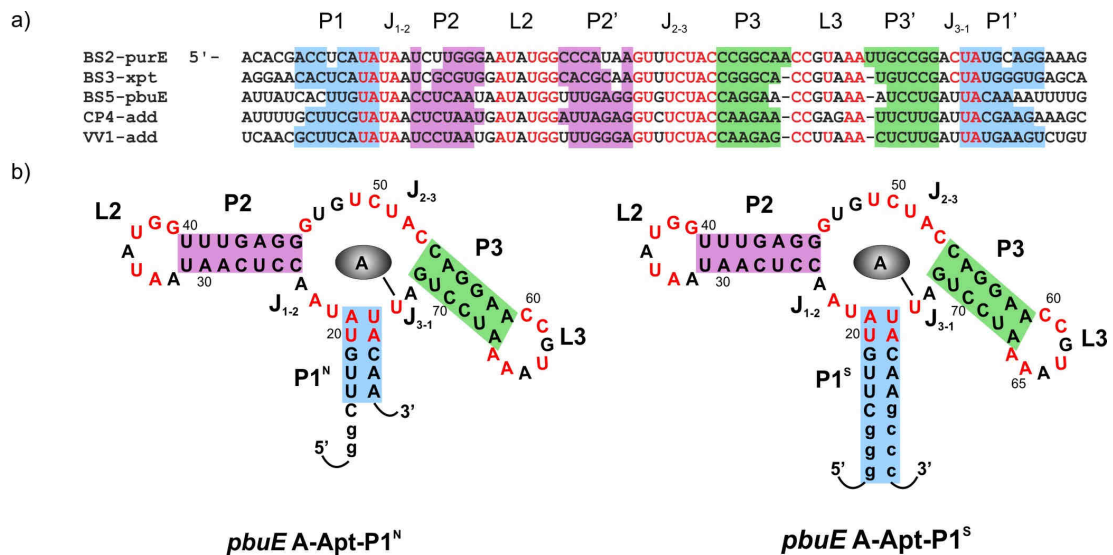


Abbildung 5-1: Guanin- und Adenin-RNA-Schalter. a) Sequenz der Aptamerdomäne von zwei Guanin- (*BS2-purE*, *BS3-xpt*) und drei Adenin-RNA-Schaltern (*BS5-pbuE*, *CP4-add*, *VV1-add*). Die Helices P1, P2, P3 sind farblich unterlegt. Rote Buchstaben stellen Nukleotide dar, die zu über 90% konserviert sind [1]. b) Sequenz und Sekundärstruktur der Aptamerdomäne des *pbuE* Adenin-RNA-Schalters mit der nativen (links, abgekürzt mit A-Apt-P1<sup>N</sup>) und der GC-stabilisierten P1-Helix (rechts, abgekürzt mit A-Apt-P1<sup>S</sup>).

Vergleiche zwischen verschiedenen Purin-RNA-Schaltern zeigen, dass insbesondere die Nukleotide innerhalb der Bindungstasche und den Schlaufen, als auch die Längen der P2- und P3-Helices hoch konserviert sind [1-2]. In zahlreichen biophysikalischen Untersuchungen wurde die Bedeutung der konservierten Nukleotide auf molekularer Ebene aufgeklärt [2-3, 5-12]. Konservierte Nukleotide der Bindungstaschen sorgen durch mehrere Wasserstoffbrücken und Basenstapelwechselwirkungen für die spezifische Erkennung und eine feste Bindung des Liganden (Kapitel 1, Abbildung 1-21, S. 41) [4-5]. Die hoch spezifische Unterscheidung zwischen den freien Purinnukleobasen Guanin und Adenin wird durch Watson-Crick-Basenpaarung des Nukleotids an der Position N74 (N=C/U) mit dem Liganden sichergestellt [2, 4-5]. Weiterhin wird von konservierten Nukleotiden eine große Zahl an tertiä-

ren, nichtkanonischen Wechselwirkungen sowohl zwischen den Schlaufen als auch in der Bindungstasche ausgebildet. Das Netzwerk aus Wasserstoffbrücken induziert eine Verdrillung der Bindungstasche, so dass sich eine komplexe Struktur formt, die den Liganden zu >99% vom Lösungsmittel abschirmt. Seit der Veröffentlichung der Kristallstruktur der Guanin- und Adenin-RNA-Schalter mit der erstaunlich kompakten Faltung sind die Fragen bezüglich der Struktur der freien Aptamer-domäne stärker in den Vordergrund getreten:

- 1.) *Zu welchem Ausmaß ist die freie Form geöffnet bzw. vororganisiert?*
- 2.) *In wie vielen Konformationen liegt die freie Form vor und welche Dynamik spielt dabei eine Rolle? Welche Strukturelemente sind für die erste Erkennung und das Andocken des Liganden von Bedeutung?*

Während Ligand-freie RNA-Schalter weiterhin für die Kristallographie schwer zugänglich bleiben, ermöglicht es die NMR-Spektroskopie, genau auf diese Fragen einzugehen. In der Diskussion, wie die molekulare Erkennung erfolgt, wurde mehrheitlich der *induced-fit* Mechanismus postuliert [9]. In NMR-spektroskopischen und chemischen Untersuchungen wurde diese Hypothese untermauert. So konnte gezeigt werden, dass die Helices P2 und P3 ausgebildet sind, während die Reste der Bindungstasche in der freien Form weitgehend flexibel sind [9, 13]. Die Ergebnisse bezüglich der P1-Helix variieren für die verschiedenen RNA-Schalter und Methoden. Im Kapitel 1 (Abbildung 1-22, S. 45,) wurden die Ergebnisse der einzelnen Studien zusammengestellt und die Gemeinsamkeiten und die Unterschiede abgeleitet. In Einzelmolekülkraftmessungen an der Aptamerdomäne des *pbuE* RNA-Schalters wurde gezeigt, dass in der freien Form die P1-Helix instabil ist und in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen der offenen und geschlossenen Form steht [14]. Dagegen weist der Guanin-RNA-Schalter in NMR-spektroskopischen Untersuchungen, als auch der *pbuE* Adenin-Schalter in smFRET-Messungen eine stabile P1-Helixstruktur auch in Abwesenheit des Liganden auf [15]. Die Frage, zu welchem Ausmaß die P1-Helix offen vorliegt und von welchen Faktoren dies abhängt, blieb bisher unbeantwortet. Die Beantwortung ist von besonderem Interesse, denn die P1-Helix stellt einen Teil der Schaltsequenz dar. In der Tat unterscheiden sich die RNA-Schalter insbesondere in der P1-Helixlänge und der genauen Stabilität der Helices. Trotz der Beteiligung der P1-Helix an der Schaltsequenz und ihrer unterschiedlichen Längen innerhalb der RNA-Schalter gibt es bisher keine Untersuchungen, die die Struktur der freien Aptamerdomäne und die Bindungsstärke im Zusammenhang mit der Länge und Stabilität der P1-Helix erforschen. Aus diesen Überlegungen heraus wurden in dieser Arbeit zwei Konstrukte mit einer nativen (A-Apt-P1<sup>N</sup>) und einer durch vier GC-Basenpaare stabilisierten (A-Apt-P1<sup>S</sup>) P1-Helix untersucht (Abbildung 5-1). In der Arbeit wurde die Struktur der freien Aptamerdomänen mit und ohne Mg<sup>2+</sup> NMR-spektroskopisch charakterisiert. Mit dem Vergleich der beiden Strukturen konnte ein unerwarteter Effekt der P1-Helixlänge auf die freie Struktur festgestellt werden. Diese Ergebnisse wurden zusammen mit den kinetischen und thermodynamischen





Tabelle 5-1: Auflistung der verwendeten RNA-Konstrukte

Name	Sequenz	Sekundärstruktur	Herstellung
A-Apt-P <sup>N</sup>	5'-ggCUUGUAUAAC CUCAAUAAUAUGGUU UGAGGGUGUCUACCA GGAACCGUAAAUCC UGAUUACAA-3'		enzymatisch
A-Apt-P <sup>S</sup>	5'-gggCUUGUAUAAC CUCAAUAAUAUGGUUU GAGGGUGUCUACCAGG AACCGUAAAUCCUGA UUACAAgccc-3'		enzymatisch <sup>1</sup>
Apt-P2	5'-CCUCAAUAAUUAU GGUUUGAGG-3'		chemisch <sup>2</sup>
Apt-P3	5'-CAGGAACCGUAA AAUCCUG-3'		chemisch <sup>2</sup>
Apt-P2-3	5'-CCUCAAUAAUAUG GUUUGAGGGUGUCUAC CAGGAACCGUAAAUC CUG-3'		chemisch <sup>2</sup>

<sup>1</sup>wurde von Jonas Noeske und Anke Reining hergestellt und NMR-spektroskopisch vermessen. Die daraus folgenden Daten, die hier verwendet und analysiert wurden, werden dementsprechend in den Abbildungen gekennzeichnet.

<sup>2</sup> bezogen von der Firma Dharmacon GmbH.

## 5.2.2 Chemisch synthetisierte RNA-Konstrukte

Die verwendeten RNA-Fragmente Apt-P2, Apt-P3 und Apt-P2-p3 sind chemisch hergestellte RNAs, die in 2'-ACE-geschützter Form von der Firma Dharmacon bezogen wurden. Die RNA-Fragmente wurden mit dem mitgeliefertem Puffer (TEMED-Acetat pH=3,8) entschützt und mittels HPLC aufgereinigt, und anschließend gefaltet. Anschließenden wurde die RNA in destilliertem Wasser bzw. NMR-Puffer bei 4 °C aufbewahrt.

### 5.2.3 DNA-Templat und -Synthese

Für die Herstellung der RNA wurde ein kurzes DNA-Templat verwendet. Das DNA-Templat enthält die Sequenzen des T7-Promoters und der Aptamerdomäne des *pbuE* Adenin-RNA-Schalters (mit GG am 5'-Ende).

Tabelle 5-2: Sequenzen der verwendeten RNA- und DNA-Konstrukte.

<b>RNA-Sequenz</b>	5'- <u>GGC</u> TTG TAT AAC <sup>1</sup> CTC AAT AAT ATG GTT T GA GGG TGT CTA CCA GGA ACC GTA AAT CCT GAT TAC AA-3'
<b>DNA-Konstrukt</b>	5'-Verlängerung(18nt) --T7-Promotor (17 nt)--GG-Aptamerdomäne(66 nt)-3'
<b>DNA-Sequenz</b>	5'- <sup>1</sup> AAC TTG TAA AAC GAA TTC <u>TAA</u> <sup>2</sup> TAC GAC TCA CTA TA <u>GGC</u> TTG TAT AAC <sup>1</sup> CTC AAT AAT AT <sup>3</sup> G GTT T GA GGG TGT CTA CCA G <sup>2</sup> GA ACC GTA AAT CCT GAT TAC AA <sup>3</sup> -3' <sup>1-3</sup> Unterteilung der DNA in drei Regionen für die PCR-1
<b>PCR-1</b>	1. Primer: 5'- AAC TTG TAA AAC GAA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TA <u>GGC</u> TTG TAT AAC-3' 2. Primer 5'- CTG GTA GAC ACC CTC AAA CCA TAT TAT TGA GGT TAT ACA AGC CTA TAG TGA GTA G-3' 3. Primer 5'-TTG TAA TCA GGA TTT TAC GGT TCC TGG TAG ACA CCC TCA AAC-3'
<b>PCR-2</b>	1. Primer: 5'-AAC TTG TAA AAC GA ATTC TAA TAC GAC TCA C-3' 2. Primer: 5'-TTG TAA TCA GGA TTT TAC GGT TCC TGG-3'

Das DNA-Templat wurde für die bessere Effizienz der PCR-Reaktion mit einer unbestimmten Sequenz (grau) am 5'-Ende auf eine Länge von 101 nt erweitert. Die DNA wurde in zwei PCR-Schritten hergestellt. Im ersten Schritt wurden drei lange Primer (PRC1, Tabelle 5-2) verwendet und eine analytische Menge der DNA hergestellt. Der so gewonnene Dopplstrang wurde im zweiten Schritt (PCR2, Tabelle 5-2) mit zwei kurzen Primern in einem großen Maßstab vervielfältigt. Für eine sequenzexakte Amplifikation der DNA wurde die *Pfx*-Polymerase verwendet [18]. Die PCR-Experimente wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt und mit einem 2%igen-Agarosegel analysiert.

### 5.2.4 DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung der DNA wurde mit dem *Qiagen PCR-Purification Kit* durchgeführt.

### 5.2.5 RNA-Synthese durch *in vitro* Transkription

Die Herstellung der RNA wird in einem *in vitro* Ansatz mit der T7-Polymerase und dem DNA-Templat durchgeführt. Die T7-Polymerase wird im Arbeitskreis von Elke Stirnal hergestellt und zur Verfügung gestellt. Die Bestandteile der Reaktionslösung sind in Tabelle 5-3 angeführt. Die Ausbeute der RNA-Synthese wird zunächst in einem analytischen Maßstab von 50 µl optimiert. Dabei werden die eingesetzten Konzentrationen an Magnesiumacetat, DNA-Templat und der nicht markierten Nukleotidtriphosphate (rNTPs) in den angegebenen Konzentrationsbereichen optimiert.

Tabelle 5-3: RNA-Synthese.

Definierte Parameter	Konzentration
Tris-Glutamat-Puffer (pH ~ 8,1)	200 mM
Spermidin	2 mM
Dithiothreitol	20 mM
T7-RNA-Polymerase	~ 0,07 mg/ml
Zu optimierende Parameter	Konzentrationsbereiche
Magnesiumacetat	5-30 mM
DNA-Templat	20-200 nM
rNTPs	10-40 mM

Die Ausbeute der RNA-Synthese wird mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und analytischer HPLC analysiert. Nach erfolgreicher Optimierung mit nicht markierten NTPs werden <sup>15</sup>N-markierte NTPs in einem weiteren analytischen Durchlauf eingesetzt und die Ausbeute überprüft. Danach wird die RNA-Synthese im großen Maßstab in 10 - 45 ml Ansätzen bei Bedingungen, die in den analytischen Ansätzen größtmögliche Ausbeuten erzielen, durchgeführt.

Vor der Aufreinigung der RNA wird der bei der *in vitro* Transkription gebildete Magnesiumphosphat-Niederschlag abzentrifugiert (8500 g, 4°C, 20 min). Der abzentrifugierte Transkriptionsansatz wird mit 70 Einheiten DNase (RNase frei, Roche Diagnostics, Mannheim) pro ml Transkriptionsansatz 1 h bei Raumtemperatur versetzt.

### 5.2.6 HPLC-Reinigung

Die gelieferten und synthetisierten RNA-Proben wurden über eine präparative RP-Ionenpaarchromatographie (Vydac-RP18, 10x250 mm, 300 Å, 5 µm) bei 60°C gereinigt. Für die Auftrennung der Reaktionsprodukte wird ein Acetonitril-Gradient verwendet, der durch folgende zwei Puffer erzeugt wird:

Puffer A: 50 mM Kaliumphosphat, pH 5,9; 2 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat

Puffer B: 50 mM Kaliumphosphat, pH 5,9; 2 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat, 60% Acetonitril (v/v)

In einer Flussrate von 5 ml/min wurde folgender Gradient verwendet:

Tabelle 5-4: Lösungsmittelgradient der HPLC-Aufreinigung

Zeit [min]	Lösung A [%]	Lösung B [%]
0	100	0
5	59	41
30	55	45
35	0	100
40	0	100

Die RNA-Fragmente laufen auf der HPLC-Säule bei einer Retentionszeit von ca. 12 min. Die gesammelten Fraktionen werden durch Gefriertrocknen vom Lösungsmittel befreit und anschließend im destillierten Wasser aufgenommen. Das Entfernen der Salze erfolgt in zwei Schritten. Zuerst wird eine Ethanolfällung durchgeführt.

Die RNA-Lösung wird mit einem Zehntel 3 M NaOAc-Lösung (pH 4,8-5,2) versetzt und mit doppeltem Volumen mit -20 °C kaltem Ethanol gemischt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens zwei Stunden bei -20 °C wird das Gemisch 1 h bei 4 °C zentrifugiert (8000 g). Das Sediment wird mit eisgekühltem, 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (8000 g, 30 min, 4 °C). Das erhaltene RNA-Pellet wird im Anschluss in möglichst wenig Wasser aufgenommen. Die Entsalzung der RNA-Lösung erfolgt mittels Zentrifugation (5000 g, 30 min, 4 °C) mit einem Centrion YM-10 (Millipore, Billerica, USA). Die aufkonzentrierte Probe wird sieben Mal verdünnt und erneut zentrifugiert, bis die Absorption gelöster Ionen bei 200 nm um maximal 1/3 höher ist als die RNA-Absorption bei 260 nm.

### **5.2.7 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)**

Die Länge der RNA Fragmente und die Reinheit der Probe wurden mit denaturierenden Polyacrylamidgelen untersucht. Bei dieser Methode werden RNA-Moleküle in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Eine Probe mit der RNA-Menge von ca. 0,02 OD<sub>260</sub> bis 22 µl wurde mit 20 µl Auftragspuffer (99% Formamid, 0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylencyanol FF) versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA und einer Spannung von 120 V durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 1X TBE (134 mM Tris, 45 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA) eingesetzt. Die Farbstoffbanden von Xylencyanol und Bromphenolblau zeigen den Verlauf der Elektrophorese an. Im Anschluss wurde das Gel mit einer Ethidiumbromidlösung angefärbt und die RNA im UV-Licht sichtbar gemacht. Die digitale Aufnahme der Gele wurde mit einer Kodak DC-40 Kamera mit UV-Filter durchgeführt .

### 5.2.8 Faltung der RNA/NMR-Puffer

Die wässrige RNA-Lösung wurde für 5 min auf 95°C erhitzt, anschließend mit einem Verhältnis von 1:10 mit eisgekühltem Wasser verdünnt und eine Stunde auf Eis gekühlt. Die Konformationsanalyse erfolgte mittels nativer PAGE. Die RNA wurde anschließend in den NMR-Puffer (25 mM Kaliumphosphat, 83% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 17% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH~6,2, 50 mM Kaliumchlorid) aufgenommen. Hierfür wurde die wässrige Lösung über Konzentratoren umgepuffert und anschließend aufkonzentriert.

### 5.2.9 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Der Faltungszustand der RNA wurde mit Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen untersucht. Die Auftrennung erfolgte unter Erhaltung der Sekundärstruktur. Die untersuchten Oligonukleotide wurden zum einen abhängig von der Größe und zum anderen abhängig von der Faltung aufgetrennt.

Die Proben (0,02 OD<sub>260</sub> bis 22 µl) wurden mit 3,5 µl Auftragspuffer (99% Glycerin, 0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylencyanol FF) versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Das 15%ige Gel befand sich im 1x Nativ-Puffer (50 mM Tris-Acetat, 100 mM Natriumacetat, pH 8,0). Die angelegte Spannung U und Strom I sollten eine Leistung P ( $P=I*U$ ) von 3 Watt nicht übersteigen. Das gelaufene Gel wurde mit einer Ethidiumbromidlösung angefärbt und im UV-Licht sichtbar gemacht.

## 5.3 Ergebnisse

### 5.3.1 NMR-Probe

Für die NMR-spektroskopische Untersuchung wurde eine vollständig <sup>15</sup>N-markierte RNA synthetisiert. Nach der Transkription wurde die RNA, wie oben beschrieben, aufgereinigt und in 250 µl NMR-Puffer (10% D<sub>2</sub>O, 90% H<sub>2</sub>O) mit einer 0,5 mM Konzentration aufgenommen. Auf dem PAGE-Gel konnte nur eine Bande in der erwarteten Höhe detektiert werden.

### 5.3.2 Teilstrukturen der Aptamerdomäne: Apt-P2, Apt-P3, Apt-P2-3

Die Ausbildung von Sekundärstrukturen und bestimmter nicht-kanonischer Basenpaarungen kann mittels NMR-Spektroskopie anhand der Signale der Iminoprotonen, die nur in stabilen Wasserstoffbrücken detektierbar sind, verfolgt werden. Die Iminoprotonenresonanzen wurden anhand von 2D <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-NOESY-Experimenten zugeordnet.

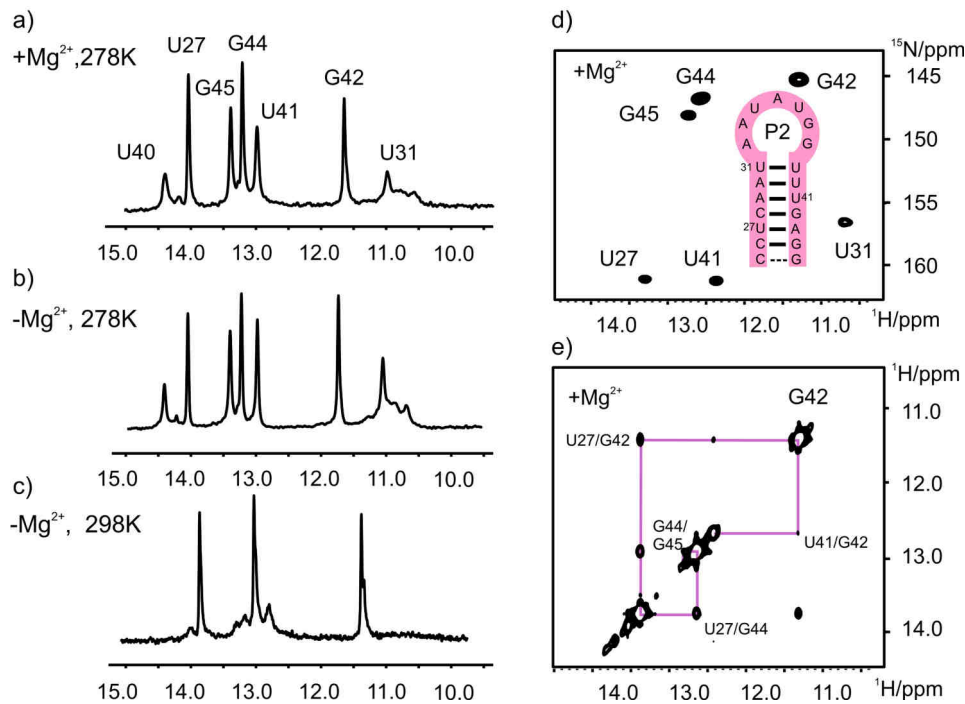


Abbildung 5-3: Apt-P2-Konstrukt ( $\sim 1$  mM). a)  $^1\text{H}$ -Spektrum der Iminoprotonen bei 5°C mit  $\text{Mg}^{2+}$  (7 mM), b) 5°C ohne  $\text{Mg}^{2+}$ , c) 25°C ohne  $\text{Mg}^{2+}$ . c)  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum bei 5°C mit  $\text{Mg}^{2+}$  (7 mM) und die Sekundärstruktur der P3-Helix mit der Nummerierung wie sie in der Aptamerdomäne geführt wird. d)  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum (800 MHz, Mischzeit 100 ms, 10°C) mit  $\text{Mg}^{2+}$  (7 mM). Räumliche Konnektivität der Iminoprotonen ist mit Linien dargestellt.

Das  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum zeigt sechs Iminosignale, die anhand des NOESY-Spektrums eindeutig der vorhergesagten Haarschleifenstruktur der P2-Helix von G45 bis U39 zugeordnet werden können (Abbildung 5-3). Das schlaufenschließende Basenpaar U31-U39 ist nur mit dem Iminoproton des U31 mit der charakteristischen Tieffeldverschiebung sichtbar. Im 1D-Spektrum können rechts vom U31-Signal weitere schwache und verbreiterte Signale beobachtet werden, die auf die höhere Flexibilität dieses Basenpaars hindeuten. Ganz links im 1D-Spektrum erscheint dagegen ein scharfes aber schwaches Signal, das, wie sich bei anderen Konstrukten zeigt, mit hoher Wahrscheinlichkeit dem Rest U40 zugeordnet werden kann. Bei höherer Temperatur verbleiben nur die Signale der zentralen, vom Austausch geschützten Reste U27, G44 und G42. Die Zugabe von  $\text{Mg}^{2+}$  führt zu keinem Aufkommen neuer Signale oder Veränderung der relativen Signalintensitäten.

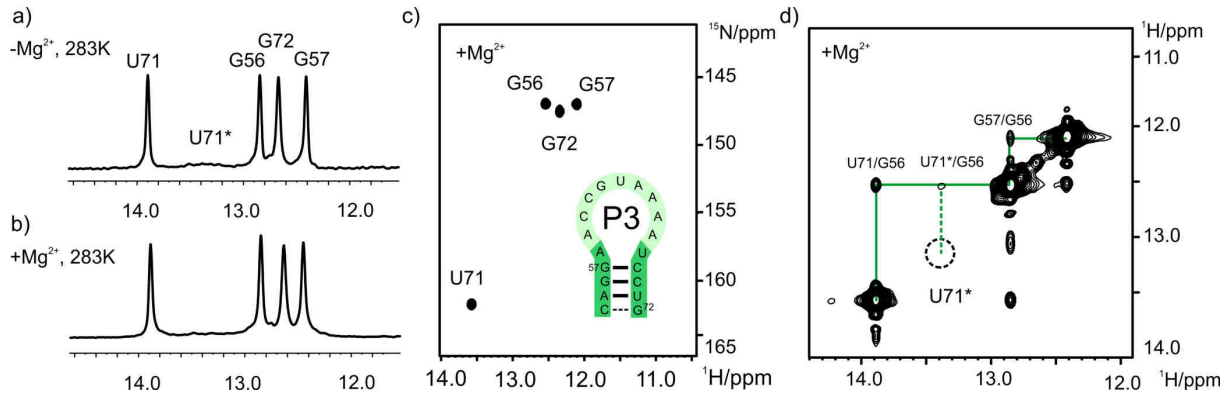


Abbildung 5-4: Apt-P3-Konstrukt ( $\sim 1\text{ mM}$ ).  $^1\text{H}$ -Spektrum der Iminoprotonen bei  $10^\circ\text{C}$  ohne  $\text{Mg}^{2+}$  (a), mit  $\text{Mg}^{2+}$  ( $7\text{mM}$ ) (b). c)  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum bei  $10^\circ\text{C}$  mit  $\text{Mg}^{2+}$  ( $7\text{mM}$ ) und die Sekundärstruktur der P3-Helix mit der Nummerierung, wie sie in der Aptamerdomäne geführt wird. d)  $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum bei  $10^\circ\text{C}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  ( $7\text{mM}$ ),  $800\text{ MHz}$ , Mischzeit  $100\text{ ms}$ . Räumliche Konnektivität der Iminoprotonen ist mit Linien dargestellt. Das G56 zeigt ein NOE-Kreuzpeak an der Stelle, wo im NOESY-Spektrum nur ein sehr breites Signal detektierbar ist (siehe Text).

Das  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der Apt-P3-Helix zeigt vier Iminosignale, die anhand des NOESY-Spektrums der vorhergesagten Schlaufenstruktur zugeordnet werden können (Abbildung 5-4). Das G72-Signal gehört zu dem endständigen Basenpaar und tauscht mit dem Lösungsmittel so schnell aus, dass es im NOESY-Spektrum nur schwach detektiert werden kann. Das G56 Iminoproton zeigt ein zweites, schwaches NOE-Signal zu einem nicht deutlich sichtbaren Diagonalpeak. Nur im 1D-Spektrum lässt sich an dieser Stelle ein sehr breites Signal vermuten. Es wird hier deshalb als eine zweite Konformation von U71 mit einem Stern gekennzeichnet.

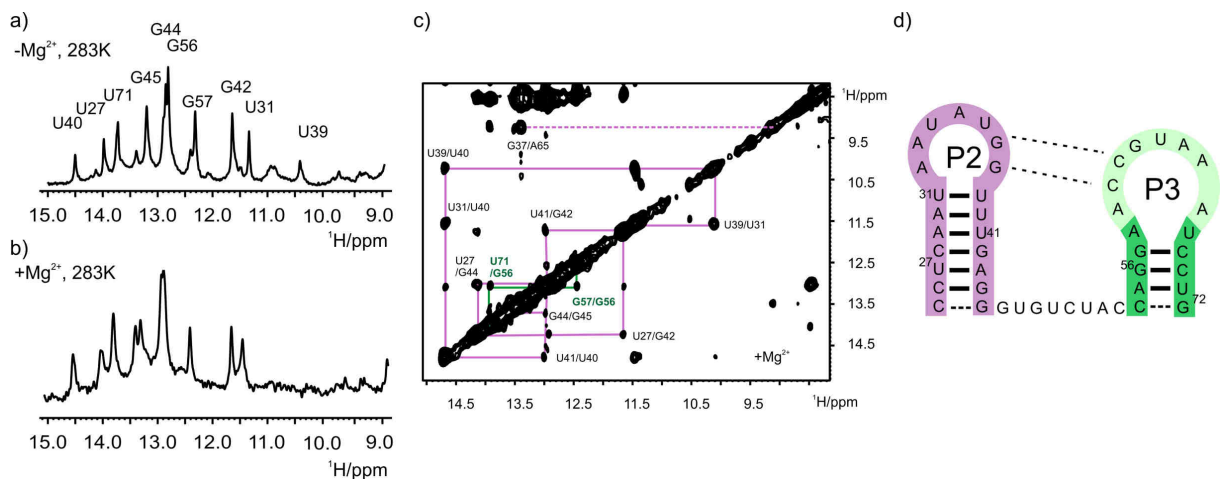


Abbildung 5-5: Apt-P2-P3-Konstrukt ( $\sim 0,3\text{ mM}$ ):  $^1\text{H}$ -Spektrum der Iminoprotonen bei  $10^\circ\text{C}$  mit  $\text{Mg}^{2+}$  ( $10\text{ mM}$ ) (a),  $10^\circ\text{C}$ , ohne  $\text{Mg}^{2+}$  (b). c)  $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum ( $800\text{ MHz}$ , Mischzeit  $100\text{ ms}$ ) bei  $5^\circ\text{C}$  mit  $\text{Mg}^{2+}$  ( $10\text{ mM}$ ). Räumliche Konnektivität der Iminoprotonen ist mit Linien dargestellt. Schlaufenkontakt zwischen A65 und G37 ist mit gestrichelter Linie hervorgehoben. d) Sekundärstruktur des Apt-P2-P3-Konstrukts mit der Nummerierung, wie sie in der Aptamerdomäne geführt wird.





Das A-Apt-P1<sup>S</sup>-Konstrukt im Komplex mit Adenin liefert ein <sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum mit einem Signalmuster, das für eine homogene und stabile Struktur charakteristisch ist. Die von Noeske et al. abgeleitete Zuordnung zeigt, dass in der Ligand-gebundenen Form sowohl die Haarschleifenstrukturen P2 und P3 als auch der Schlaufenkontakt (U34, G37, G38) ausgebildet sind. Es ist zu betonen, dass die Iminprotonen der Reste U34, G37 und G38 eine in allen RNA-Schaltern ähnliche und sehr charakteristische chemische Verschiebung aufweisen und daher als sichere Indikatoren des Schlaufenkontakts dienen [5, 9, 12, 15]. Die P1-Helix ist beginnend mit U75 bis G15 mit fünf Basenpaaren sichtbar. Die Beobachtbarkeit der Iminosignale von G46, U47, U49, U51 und U74 verdeutlicht, dass ein vom Lösungsmittel abgeschirmtes Netzwerk aus Wasserstoffbrücken entstanden ist und sich eine stabile Bindungstasche um das Adenin ausgebildet hat. Sowohl die Anzahl als auch die Konnektivität der Iminprotonen entspricht der Vorhersage, die basierend auf der Kristallstruktur der verwandten Guanin/Adenin-RNA-Schalter, gemacht werden kann.

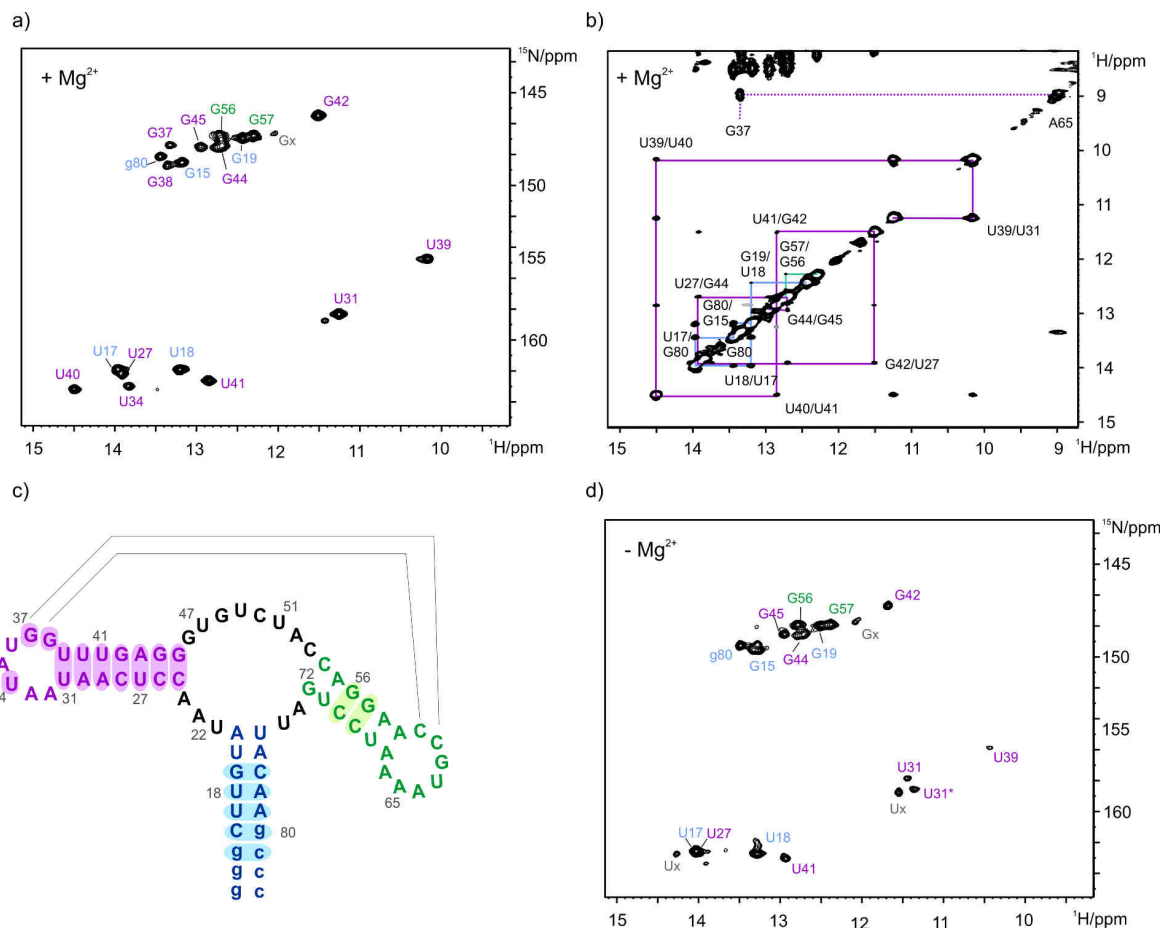


Abbildung 5-7: A-Apt-P1<sup>S</sup>-Konstrukt (0,5 mM). a) <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum mit Mg<sup>2+</sup> (5 mM), ohne Adenin. b) <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-NOESY Spektrum mit Mg<sup>2+</sup> (5 mM), 800 MHz, 283K, Mischzeit 100 ms. c) Sekundärstruktur der freien Aptamerdomäne. Basenpaare mit detektierbaren und zugeordneten Iminprotonen in (a) und (b) sind mit einem farblichen Hintergrund hervorgehoben. d) <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum ohne Mg<sup>2+</sup> (nicht vollständig zugeordnet). Die Probe wurde von Jonas Noeske hergestellt und vermessen.

Noeske et al. zeigten, dass durch Zugabe von  $Mg^{2+}$  der Schlaufenkontakt stabilisiert wird und eine Änderung der chemischen Verschiebung der Iminosignale von U71 und U22 zum Vorschein kommen. Diese Änderungen wurden zurückgeführt auf die Präsenz von  $Mg^{2+}$ -Bindestellen ( $K_D = 1,5$  mM, gemessen am G37) [12].

In der  $Mg^{2+}$ -haltigen Probe ohne Adenin sind im  $^1H,^{15}N$ -HSQC-Spektrum dagegen deutlich weniger Signale mit größerer Linienbreite zu beobachten (Abbildung 5-7). Dies bestätigt, in Übereinstimmung mit dem postulierten *induced-fit* Mechanismus, dass ohne Ligand eine dynamische, weniger strukturierte Form vorliegt [12]. Die Linienverbreiterung deutet darauf hin, dass ein schneller Austausch zwischen unterschiedlichen Konformationen vorliegt. Die genaue Zuordnung der  $^1H,^{15}N$ -HSQC- und  $^1H,^1H$ -NOESY-Spektren zeigt, dass sämtliche Iminosignale der Bindungstasche nicht mehr beobachtet werden können (Abbildung 5-7). Die daraus resultierende Destabilisierung des Moleküls in der Dreiwegekreuzung setzt sich in die Regionen der P1- und P3-Helix fort. Die P3-Helix kann nur noch mit zwei von fünf möglichen Basenpaaren (G56, G58) detektiert werden. Sie ist somit deutlich instabiler als im isolierten P3-Konstrukt (Abbildung 5-4). In der P1-Helix fehlen im Vergleich zum Komplex zwei Basenpaare, die an die Bindungstasche angrenzen. Die P2-Helix dagegen ist vollständig ausgebildet und durch den weiterhin beständigen Schlaufenkontakt (U34, G37, G38) zur P3-Helix stabilisiert. Die chemischen Verschiebungen stimmen mit den Ergebnissen des isolierten P2-Konstrukts überein.

Wird der Probe das  $Mg^{2+}$  entzogen, dann geht mit der Destabilisierung eine Umstrukturierung einher. Allen voran wird der Schlaufenkontakt unterbrochen. Die Iminosignale von G37, G38 und U34 können in der  $Mg^{2+}$ -freien Probe nicht detektiert werden. Das Basenpaar U31-U39 ist nur noch mit schwachen Signalen sichtbar. Wohingegen das Iminoproton von U40 vollständig verschwunden ist. Dies verdeutlicht eine signifikante Destabilisierung der P2-Helix. Durch neu aufgekommene Signale (Ux und U31\*) lässt sich erkennen, dass alternative Basenpaarungen ausgebildet werden. In Mutationsstudien von Noeske et al. 2007 wurde gezeigt, dass alternative Basenpaarungen durch eine stabilisierende Mutation der P2-Helix (A30G, U40C) verhindert werden. Außerdem wird durch die Mutation eine stabile Schlaufenwechselwirkung hergestellt [12].

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Aptamerdomäne mit einer stabilisierten P1-Helix in der freien Form als eine sehr dynamische und offene Struktur mit voneinander entkoppelten Sekundärstrukturelementen (P1, P2, P3) und einer unstrukturierten Bindungstasche vorliegt. Die P3-Helix ist weniger stabil als im isolierten P3-Konstrukt (vgl. Abbildung 5-4). Erst durch die Zugabe von  $Mg^{2+}$  kann die tertiäre Wechselwirkung zwischen den beiden Helices P2 und P3 dauerhaft hergestellt werden. Wohlgeachtet ist die Aptamerdomäne trotz struktureller Unterschiede sowohl mit als auch ohne  $Mg^{2+}$  bindungskompetent. In Folge der Bindung von Adenin werden die P1- und P3-Helices durch weitere Basenpaarungen gefestigt. Außerdem können weitere tertiäre und nicht-kanonische Wasserstoffbrücken in der Bindungstasche geknüpft werden und führen zu einer kompakten, stabilen Struktur. Die Konnektivität der Iminosignale entspricht der Vorhersage, wie sie aus der Kristallstruktur verwandter RNA-Schalter abgeleitet werden kann.

### 5.3.4 Aptamerdomänen mit der nativen P1-Helix (A-Apt-P1<sup>N</sup>)

Wenn zu der Aptamerdomäne mit der nativen Sequenz der P1-Helix übergegangen wird, dann lassen sich vor allem in der ligandfreien Form große Unterschiede feststellen. Die Abbildung 5-8 zeigt <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC- und <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-NOESY-Spektren mit und ohne Mg<sup>2+</sup>.

Die <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC-Spektren der freien Aptamerdomäne zeigen breite und unterschiedlich intensive Signale, die sich teilweise überlagern oder als Doppelsignale erscheinen (Abbildung 5-8). Dies ist anders als in Spektren, die bisher von freien RNA-Schaltern aufgenommen wurden, und als ein Hinweis auf eine höhere Heterogenität und Flexibilität des Moleküls zu verstehen. Gut zu erkennen sind die Iminosignale der P2-Helix. Die Stabilität der P2-Helix ist vergleichbar wie im Apt-P2-P3-Konstrukt (Abbildung 5-5), da in beiden Fällen die Reste U40 und U31/U39 starke Iminoprotonensignale geben, so dass von einer stabilen Basenpaarung ausgegangen werden kann. Der Schlaufenkontakt kann in diesem Fall zusätzlich an den Iminosignalen von U34, G37 und G38 mit den charakteristische chemischen Verschiebungen im <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum und dem NOE-Kreuzpeak im NOESY-Spektrum verfolgt werden [9, 12]. Im Unterschied zum Apt-P2-P3- als auch dem Apt-P2-Konstrukt zeigt hier die P2-Helix eine zweite Konformation. Die Reste U27, U41 und G44 weisen Doppelpeaks auf und können über eine eigene NOE-Konnektivität zugeordnet werden (gestrichelte Linie, Abbildung 5-8). Die P3-Helix kann im NOESY-Spektrum mit vier Basenpaaren identifiziert werden und ist somit stabiler als in den Konstrukten A-Apt-P1<sup>S</sup> und Apt-P2-P3. Auch hier lässt sich eine zweite Konformation im unteren Bereich für die Reste U71 und G72 beobachten. Im <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC bleiben somit nur noch sehr schwache Signale im Bereich von 9 - 12 ppm, die nicht zugeordnet werden können (grau). Aufgrund ihrer chemischen Verschiebung können sie als nicht-kanonischen Basenpaarungen (GU, UU) zugeordnet werden. Möglicherweise stammen sie aus alternativen Basenpaarungen der P2-Helix, ähnlich wie es im A-Apt-P1<sup>S</sup>-Konstrukt beobachtet wurde. Mit Sicherheit dagegen lässt sich sagen, dass keine Signale aus der Bindungstasche oder der P1-Helix sichtbar sind. Die Spektren ohne Mg<sup>2+</sup> zeigen ein insgesamt ähnliches Signalmuster. Anders als im A-Apt-P1<sup>S</sup>-Konstrukt sind hier die Iminoprotonen der Schlaufeninteraktion (U34, G37, G38) weiterhin sichtbar, aber deutlich schwächer und teilweise verschoben. Im NOESY-Spektrum ist zwar keine Konnektivität zwischen U34 und G37 zu sehen, aber ein noch deutlich sichtbares Signal zwischen G37 und A65, was auf einen noch bestehenden Schlaufenkontakt hindeutet. Die Schwächung des U40-Signals sowohl im <sup>15</sup>N-HSQC als auch NOESY-Spektrum verdeutlicht eine Schwächung der P2-Helix. Außerdem kommt ein zweites U40-Signal auf (U40\*), das keine Kreuzsignale zu dem Basenpaar U31-U39 aufweist. Es kann über NOE-Signale im Bereich von 2-9 ppm eindeutig als U40 identifiziert werden. Die Signale der nicht-kanonischen Basenpaare (GU, UU) werden zum Teil intensiver.

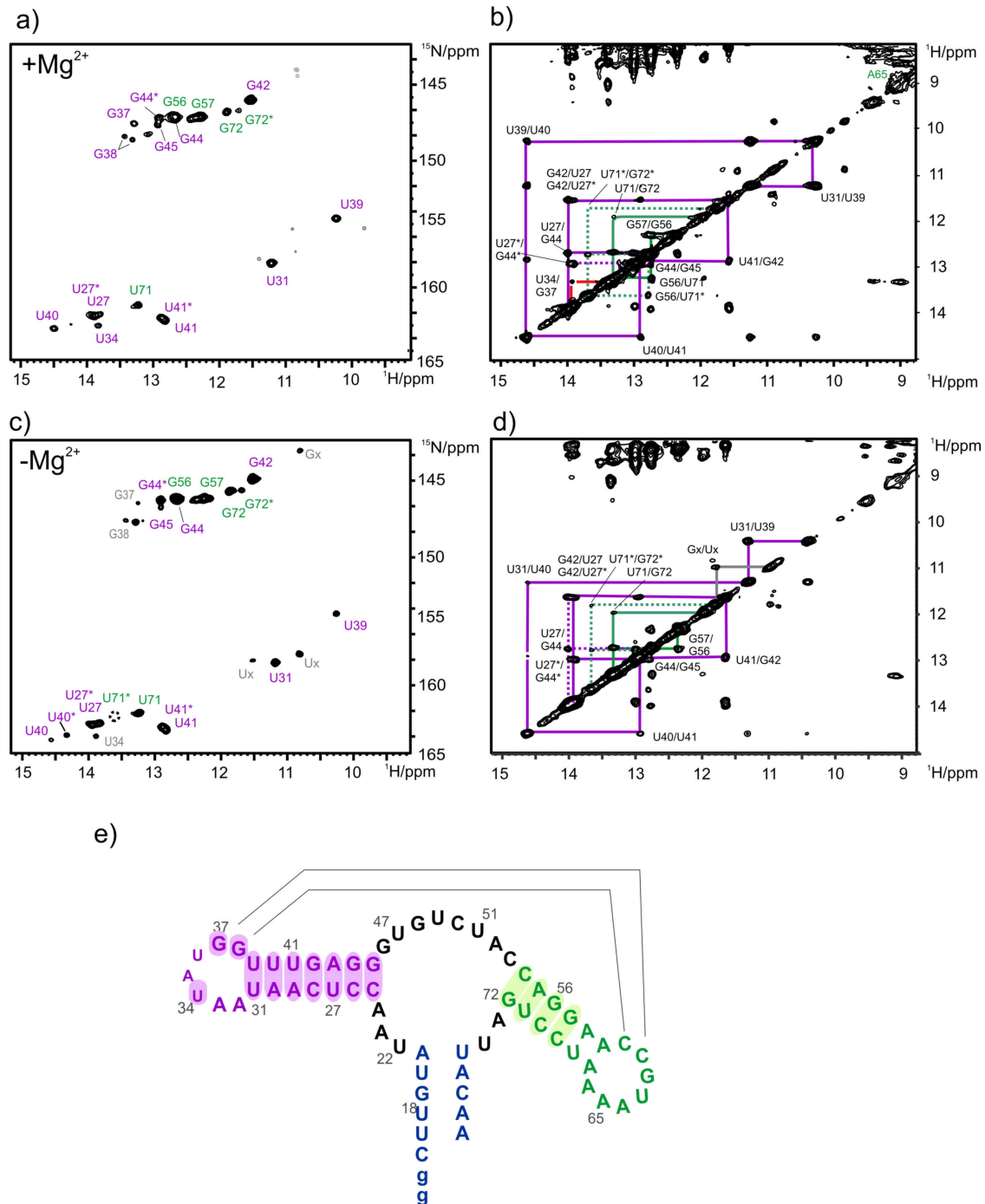


Abbildung 5-8: A-Apt-P1<sup>N</sup>-Konstrukt (0,5 mM). a) <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum mit Mg<sup>2+</sup> (5 mM), ohne Adenin. Nicht zugeordnete Peaks sind grau dargestellt. b) <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-NOESY Spektrum mit Mg<sup>2+</sup> (5 mM), 900 MHz, 283K, Mischzeit 200 ms. c) <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum ohne Mg<sup>2+</sup>, ohne Adenin, 10°C. d) <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-NOESY-Spektrum ohne Mg<sup>2+</sup>, 800 MHz, 283K, Mischzeit 100 ms. e) Sekundärstruktur der freien Aptamerdomäne. Basenpaare mit detektierbaren und zugeordneten Iminoprotonen in (a) und (b) sind mit einem farblichen Hintergrund hervorgehoben.

Die Zugabe von Adenin leitet eine große Umstrukturierung und Stabilisierung der Aptamerdomäne ein. Die vorhandenen Signale im <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum werden intensiver, homogener und geben

mit neu entstandenen Iminosignalen ein fast deckungsgleiches Spektrum wie die stabile A-Apt-P1<sup>S</sup>-Aptamerdomäne (Abbildung 5-9). Die Strukturierung der Bindungstasche wird anhand der Signale G46, U47, U49, U51 und U74 sichtbar. Weiterhin können vier Basenpaare der P1-Helix (U75, U20, G19, U18) eindeutig im NOESY-Spektrum identifiziert werden. Die Zuordnung von U17 wurde anhand der ähnlicher chemischen Verschiebung wie im A-Apt-P1<sup>S</sup> vorgenommen. Anders als beim A-Apt-P1<sup>S</sup>-Konstrukt liegt die Aptamerdomäne nicht in einer homogenen Form vor, da im <sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum noch Signale aus der freien Form sichtbar sind (U71', G72', G42', Abbildung 5-9 a)). Dies deutet daraufhin, dass das Gleichgewicht nicht vollständig auf der Seite der gebundenen Form vorliegt, oder dass die gebundene Form eine zweite Konformation hat.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die native Aptamerdomäne, wie erwartet, eine weniger stabile Struktur ausbildet. Dies wird vor allem durch das Fehlen der P1-Helix in der ligandfreien Form deutlich. Die Dreiwegkreuzung wird demnach erst nach Zugabe von Adenin vollständig geformt. Überraschenderweise sind in der nativen Aptamerdomäne die P2- und P3-Helix als auch der Schlaufenkontakt sowohl mit und als auch ohne Mg<sup>2+</sup> stärker ausgebildet als in dem A-Apt-P1<sup>S</sup>-Konstrukt. Insbesondere die P3-Helix zeigt mit vier sichtbaren Basenpaaren in der nativen Aptamerdomäne eine höhere Stabilität als in den A-Apt-P1<sup>S</sup>- und P3-Konstrukten.

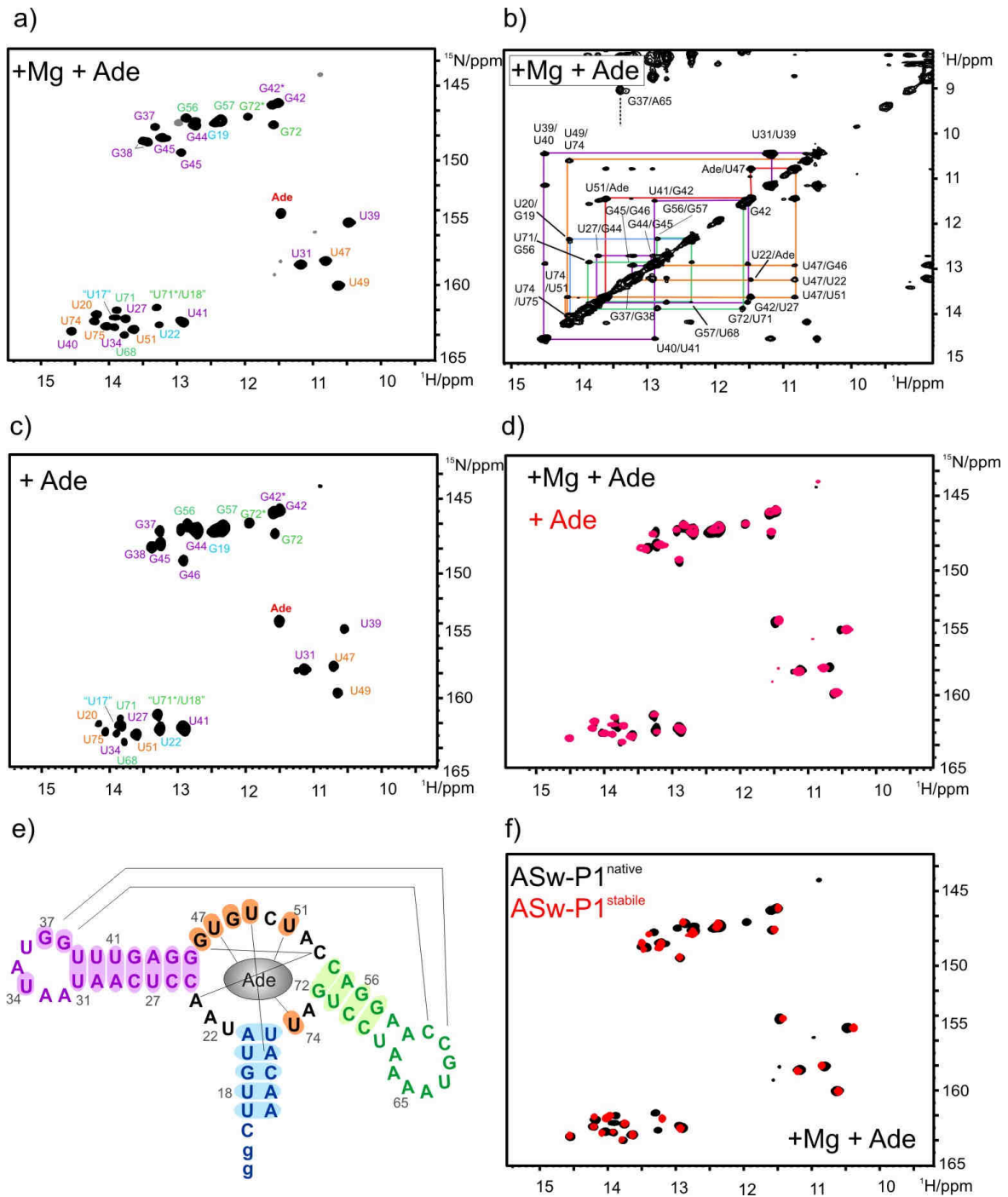


Abbildung 5-9: A-Apt-P1<sup>N</sup>-Konstrukt (~0,5 mM). a)  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum mit  $\text{Mg}^{2+}$  (5 mM) und Adenin (1,1 eq). Nicht zugeordnete Peaks sind grau dargestellt. Zuordnung von „U17“ siehe Text. b)  $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY Spektrum mit  $\text{Mg}^{2+}$  (5 mM), 900 MHz, 283K, Mischzeit 200 ms. c)  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum mit Adenin (1,1 eq), 10°C. d) Überlagerung der  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren mit ohne  $\text{Mg}^{2+}$ . e) Sekundärstruktur der Aptamerdomäne. Basenpaare mit detektierbaren und zugeordneten Iminprotonen in (a) und (b) sind mit einem farbigen Hintergrund hervorgehoben. f) Überlagerung der  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren für native und stabile ASw-P1 Konstrukte mit  $\text{Mg}^{2+}$ .

### 5.3.5 Untersuchung der thermischen Stabilität

Die Entfaltung der A-Apt-Konstrukte in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  und Adenin wurde mittels Circular-dichroismus-(CD)-Spektroskopie untersucht. Die CD-Schmelzkurven werden im Folgenden als die Auftragung der normierten Intensitäten und als erste Ableitung nach der Temperatur dargestellt (Abbildung 5-10). In früheren Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass der Schmelzvorgang einer RNA-Schalter-Aptamerdomäne zwei Übergänge haben kann [15]. Neben dem globalen Entfaltungsprozess, der bei höherer Temperatur ( $> 50^{\circ}C$ ) stattfindet, wurde ein zweiter Übergang bei niedrigerer Temperatur beobachtet ( $< 50^{\circ}C$ ). Dieser konnte durch einen Vergleich des Wildtyps und einer Mutante des Guanin RNA-Schalters eindeutig der interhelikalen Tertiärstrukturinteraktion der beiden Haarschleifen P2 und P3 zugeordnet werden [15]. Ein weiteres Merkmal des Entfaltungsprozesses geht aus der Steigung der Schmelzkurve hervor. Je kooperativer dieser ist, desto steiler fällt die CD-Kurve am Schmelzpunkt aus.

Die CD-Schmelzkurve des A-Apt-P1<sup>S</sup>-Konstrukts zeigt einen relativ flachen Verlauf mit einem globalen Schmelzpunkt bei  $55^{\circ}C$ , der sich durch Zugabe von Adenin nicht verschiebt. Das gleiche Verhalten kann bei dem A-Apt-P1<sup>S</sup>-Konstrukt beobachtet werden, jedoch ist hier ein Schmelzpunkt von  $60^{\circ}C$  und eine höhere Kooperativität des Entfaltungsübergangs festzustellen. Der in NMR-Untersuchungen gezeigte, typischerweise deutlich ausgeprägte Übergang der Tertiärstrukturwechselwirkung lässt sich nicht erkennen. Nur beim genauen Betrachten der ersten Ableitung können für beide Komplexe zwei sehr schwache Übergänge bei niedrigen Temperaturen erfasst werden. Dazugehörige Schmelzpunkte und Kooperativitätsgrade sind allerdings deutlich niedriger als beim Guanin-RNA-Schalter [15]. Es ist anzunehmen, dass die Tertiärstrukturwechselwirkung ohne  $Mg^{2+}$  bei  $10^{\circ}C$  zwar vorhanden aber noch nicht stabil ist. Erst im Zusammenwirken mit  $Mg^{2+}$  zeigen beide Konstrukte Schmelzkurven mit zwei deutlich unterscheidbaren Übergängen sowohl mit als auch ohne Adenin. Die  $Mg^{2+}$ -haltige Probe der nativen Aptamerdomäne besitzt zwei Übergänge bei  $44^{\circ}C$  und  $64^{\circ}C$ , wobei der zweite Übergang deutlich kooperativer ausfällt. Durch Zugabe von Adenin wird der globale Schmelzübergang auf eine Temperatur von  $62^{\circ}C$  abgesenkt, während beim ersten Übergang vor allem der Kooperativitätsgrad deutlich steigt und sich die Temperatur leicht erhöht. Das A-Apt-P1<sup>S</sup>-Konstrukt zeigt nach Zugabe von  $Mg^{2+}$  zwei Übergänge bei den Temperaturen von  $44^{\circ}C$  und  $66^{\circ}C$ . Beide steigen um  $5^{\circ}C$ , wenn Adenin zugegeben wird. Auch hier lässt sich die Steigerung des Kooperativitätsgrades des ersten Übergangs beobachten.



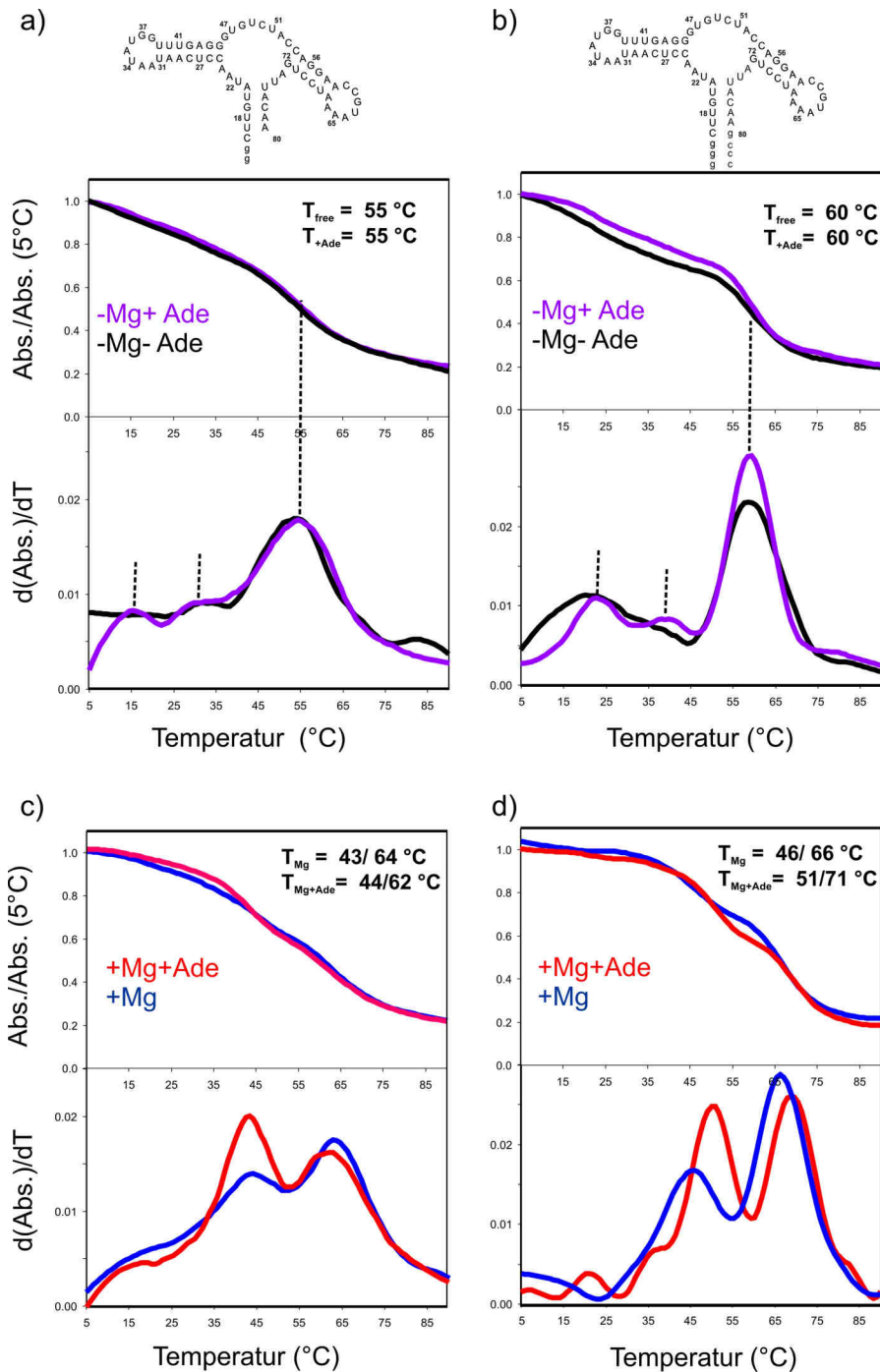


Abbildung 5-10: Temperaturabhängige CD-Messungen zur Untersuchung der Entfaltungsübergänge von den Aptamerdomänen mit der nativen und stabilen P1-Helix in Abhängigkeit von  $\text{Mg}^{2+}$  und Adenin. Die Auftraggungen zeigen die Temperaturabhängige Absorption relativ zum Startpunkt bei 5°C und die erste Ableitung nach der Temperatur ( $d(\text{Abs.})/dT$ ). a) A-Apt-P1<sup>N</sup> ohne (schwarz) und mit (violett) Adenin. b) A-Apt-P1<sup>S</sup> ohne (schwarz) und mit (violett) Adenin. c) A-Apt-P1<sup>N</sup> mit  $\text{Mg}^{2+}$  (rot), mit  $\text{Mg}^{2+}$  und Adenin (blau). d) A-Apt-P1<sup>S</sup> mit  $\text{Mg}^{2+}$  (rot), mit  $\text{Mg}^{2+}$  und Adenin (blau). Die Probe A-Apt-P1<sup>S</sup> wurde von Anke Reining hergestellt.

Die isolierten Helices P2 und P3 zeigen deutlich unterschiedliche Schmelzpunkte von 31°C und 53°C und werden durch  $\text{Mg}^{2+}$  auf 35°C und 60°C jeweils stabilisiert. Überraschend dabei ist der niedrige

Schmelzpunkt der P2-Helix, gleichwohl sie eine höhere Kooperativität des Entfaltungsvorgangs aufweist. Die UNAFOLD-Simulationen ergeben für beide Helices P2 und P3 ähnliche Schmelztemperaturen von jeweils 70°C und 67,6°C. Die Diskrepanz zwischen theoretischen und empirischen Ergebnissen kann nicht erklärt werden, da die NMR-Daten sowohl die theoretisch vorhergesagte Sekundärstruktur bestätigen als auch für eine stabile Basenpaarung innerhalb P2-Helix bei Temperaturen bis 25 °C sprechen. Das Apt-P2-P3-Konstrukt zeigt bereits ohne  $Mg^{2+}$  zwei Übergänge bei 31°C und 58°C. Durch Zugabe von  $Mg^{2+}$  werden sie zu höheren Temperaturen von 52°C und 64°C verschoben. Die Schmelzkurve bestätigt die Befunde aus den NMR-Daten, welche bereits ohne  $Mg^{2+}$  auf eine stabile Schlaufeninteraktion hindeuten. Es kann daher angenommen werden, dass der erste Übergang die Entfaltung der Tertiärstrukturwechselwirkung übermittelt, während die Öffnung der beiden Helices P2 und P3 durch die gegenseitige Stabilisierung zu einem gemeinsamen Schmelzpunkt zusammenfallen.

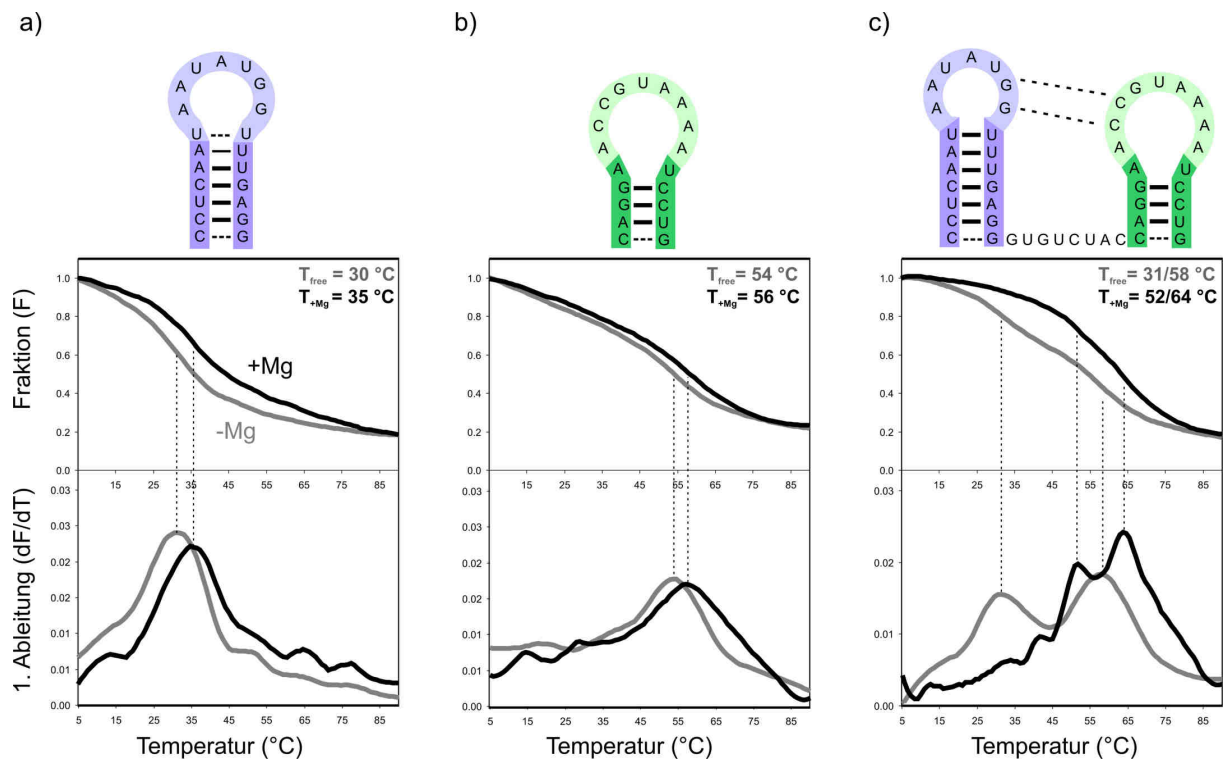


Abbildung 5-11: Temperaturabhängige CD-Messungen zur Untersuchung der Entfaltungsübergänge von den isolierten A-Apt-Konstrukten in Abhängigkeit von  $Mg^{2+}$ . a) A-Apt-P2-Helix mit (schwarz) und ohne (grau)  $Mg^{2+}$ . b) A-Apt-P3-Helix mit (schwarz) und ohne (grau)  $Mg^{2+}$ . c) A-Apt-P2-P3-Konstrukt mit (schwarz) und ohne (grau)  $Mg^{2+}$ .

#### 5.4 Interpretation der Ergebnisse

In der Abbildung 5-12 sind die NMR-Ergebnisse zu den Konstrukten A-Apt-P1<sup>N</sup> und A-Apt-P1<sup>S</sup> zusammengefasst. Die Auftragung zeigt die Intensitäten der zugeordneten Iminosignale im jeweiligen

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum unter verschiedenen Bedingungen. Iminosignale wurden in strukturelle Regionen gruppiert.

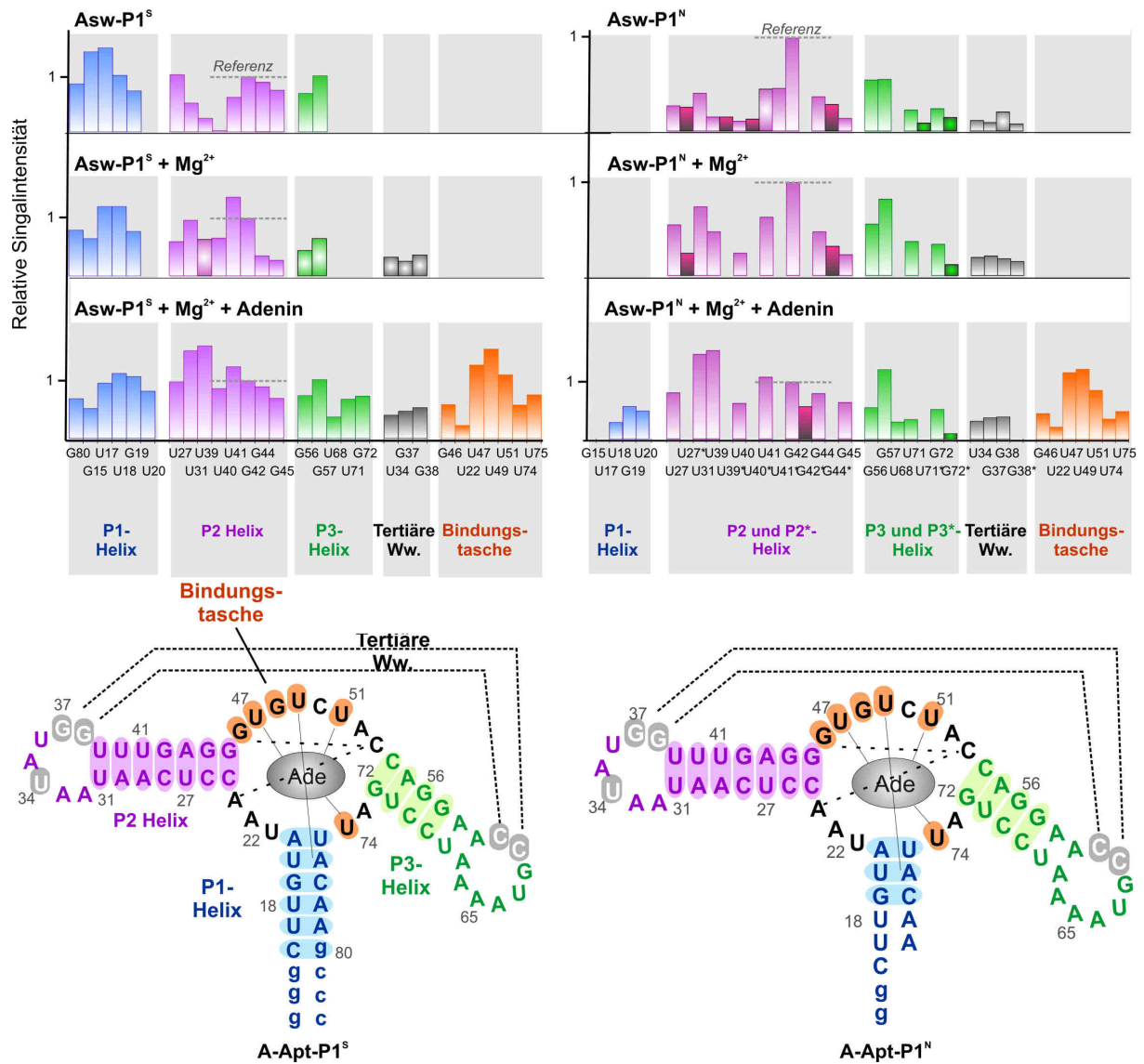


Abbildung 5-12: NMR-Ergebnisse für die Konstrukte A-Apt-P1<sup>S</sup> und A-Apt-P1<sup>N</sup>. Signalintensitäten der Iminoprotonen in den  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren bei 283 K gruppiert zu den wichtigen Strukturelementen (Helices P1, P2, P3, tertiäre Wechselwirkung (Ww.) zwischen P2 und P3, Bindungstasche). Signalintensitäten wurden in jedem Spektrum auf das Signal G42 normiert. Abweichungen können wegen Signalüberlappung auftreten. Oben: nur RNA (~ 0,5 mM). Mitte: RNA (~0,5 mM) und Mg<sup>2+</sup> (5 mM). Unten: RNA (~0,5 mM), Mg<sup>2+</sup> (5 mM) und Adenin (1,1 eq). Links: Aptamerdomäne mit stabilisierter P1-Helix (Konstrukt A-Apt-P1<sup>S</sup>). Rechts: Aptamerdomäne mit nativer P1-Helix (Konstrukt A-Apt-P1<sup>N</sup>). Signale der zweiten Konformation sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet und einer dunklen Färbung hervorgehoben.

Die Analyse der Iminoprotonen liefert Erkenntnisse über die vorliegenden Elemente der Sekundär- und Tertiärstrukturen. Die Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Untersuchung des A-Apt-P2-P3-Konstrukts und der Aptamerdomänen mit der nativen und stabilen P1-Helix sind in der Abbildung

5-13 als Strukturmodelle zusammengefasst. Die Ligand-gebundene Kristallstruktur dient als Ausgangspunkt für die Modellierung.

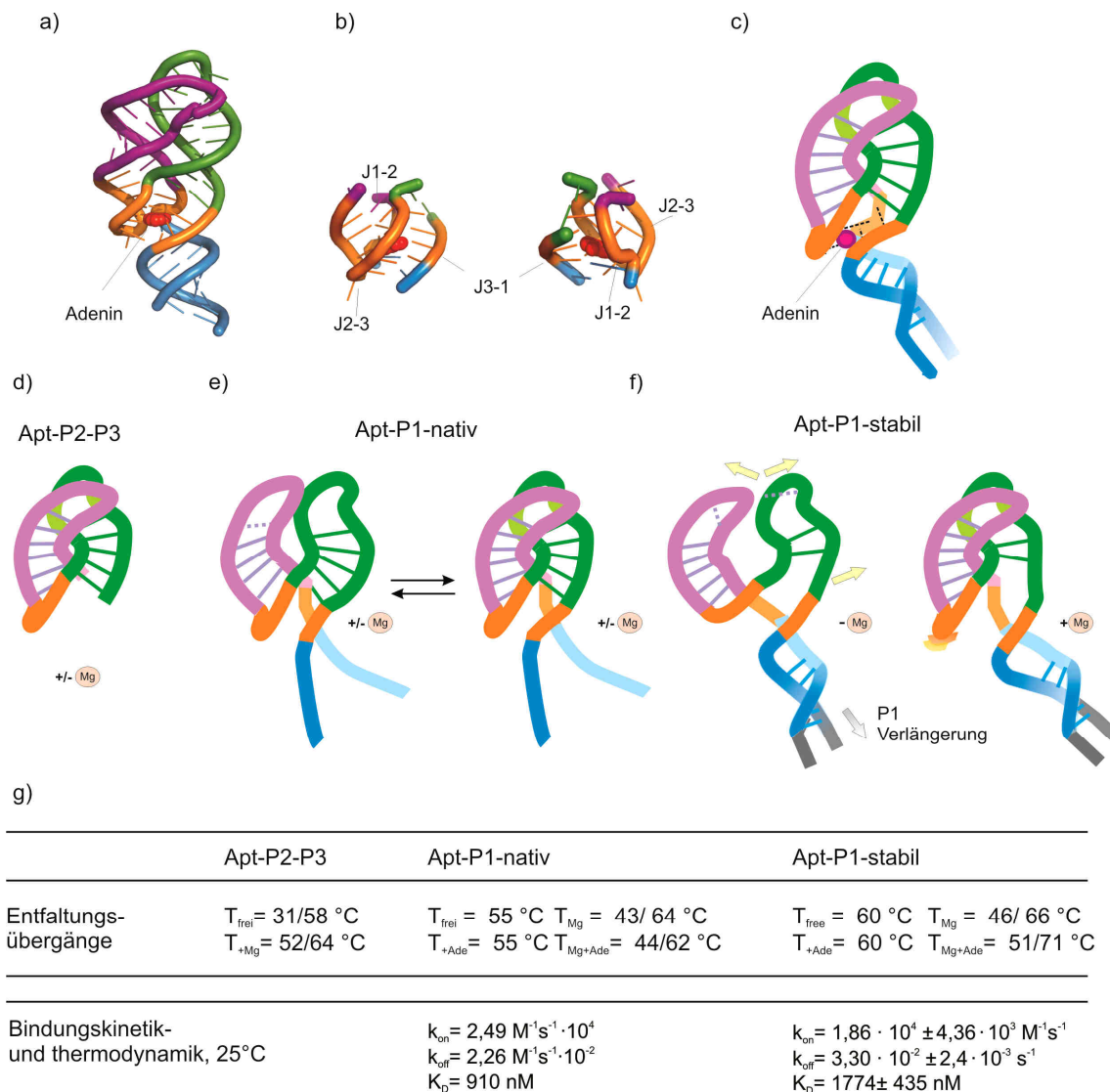


Abbildung 5-13: Strukturmodelle anhand der Kristallstruktur und NMR-Ergebnisse. a) Kristallstruktur des ligandgebundenen Adenin-RNA Schalters (Aptamerdomäne). b) Bindungstasche. c-f) Modellierung der verschiedenen Konstrukte anhand der NMR-Daten. c) Ligand-gebundene Aptamerdomäne. d) Apt-P2-3-Konstrukt. e) Native Aptamerdomäne A-Apt-P1<sup>N</sup> im langsamen Austausch zwischen der offenen und geschlossenen Form, die beide mit und ohne Mg<sup>2+</sup> present sind. f) Stabile Aptamerdomäne A-Apt-P1<sup>S</sup> mit und ohne Mg<sup>2+</sup>. g) Temperaturen der Entfaltungsübergänge. Kinetische und Thermodynamische Untersuchung der Ligandbindung aus Wickiser et al., 2005, Anke Reining (Diplomarbeit, 2007) wurden an einer Mg<sup>2+</sup>-haltigen Probe gemessen [7].

Das Apt-P2-P3-Konstrukt besteht aus zwei stabilen Haarschleifenstrukturen, die sich über den Schlaufenkontakt gegenseitig stabilisieren und parallel anliegen. Bereits beim Guanin-Riboswitch wurde gezeigt, dass im Apt-P2-P3-Konstrukt der Schlaufenkontakt stabil ist [9]. Die Verbindungssequenz J<sub>2-3</sub> zwischen den beiden Helices ist dagegen über die Iminprotonen nicht detektierbar. Dies ändert sich

auch nicht in der vollen Länge der Aptamerdomäne mit der nativen P1-Helix. Die entsprechende Aptamerdomäne formt mit und ohne  $Mg^{2+}$  den Schlaufenkontakt. Nach der Zuordnung der Iminosignale können jeweils zwei Konformationen für die Helices P2 und P3 identifiziert werden. Die P1-Helix kann nicht detektiert werden. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Einzelkraftmessungen, die an der nativen Aptamerdomäne vorgenommen wurden [14]. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie können in der freien Form zwei Konformationen mit und ohne Schlaufenkontakt identifiziert werden. Im Gegensatz zu der ersten Hauptkonformation sind in der zweiten Konformation Signale des Basenpaars U31-U39 deutlich geschwächt, welches als das Öffnen des Schlaufenkontakts gedeutet werden kann. Der Rest U40 erscheint mit einem zweiten Signal, dass keine Kreuzsignale zu U31-U39 aufweist. Die geschlossene Aptamerdomäne mit der tertiären Wechselwirkung stellt die stabilere Hauptkonformation dar. Die erhöhte Heterogenität der nativen Aptamerdomäne A-Apt-P1<sup>N</sup> im Vergleich zu dem Apt-P2-P3-Konstrukt verdeutlicht, dass die Anwesenheit der Nukleotide innerhalb der Bindungstasche und/oder die P1-Helix einen Einfluss auf die globale Struktur haben, obgleich sie keine detektierbaren Basenpaare formen. Eine Verlängerung der P1-Helix im A-Apt-P1<sup>S</sup>-Konstrukt durch vier GC-Basenpaare führt zur Ausbildung der P1-Helix, die durch fünf Basenpaare detektierbar ist. Gleichzeitig wird beobachtet, dass die P3-Helix und der Schlaufenkontakt destabilisiert sind. Hierbei bilden sich alternative, nicht-kanonische Basenpaare innerhalb der P2-Helix und des Schlaufenkontakts aus. Welche Nukleotide hier involviert sind, konnte nicht spezifiziert werden. Erst durch die Zugabe von  $Mg^{2+}$  kann der native Schlaufenkontakt hergestellt und alternative Basenpaarungen verdrängt werden. Allerdings bleiben in der P3-Helix weiterhin nur zwei Basenpaare erkennbar. Eine Erklärung für die Entwindung der P3-Helix in dieser Form kann aus der Betrachtung der ligandgebundenen Kristallstruktur und den MD-Simulationen von Sharma et al. abgeleitet werden [6, 19-21]. Aus der Kristallstruktur wird ersichtlich, dass die Bindung des Liganden und die daraus entstehenden Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Regionen der Bindungstasche eine Verdrillung der  $J_{1-2}$ -Scharniere induzieren (Abbildung 5-13). Erst durch diese Umorientierung der  $J_{1-2}$ -Scharniere werden die Flanken der P1-Helix räumlich angenähert und können einen Doppelstrang ausbilden. In MD-Simulationen mit den Adenin- und Guanin-RNA-Schaltern wurde gezeigt, dass bereits in den ersten 15 ns nach Entzug des Liganden sowohl eine Destabilisierung der Helices P1 und P3 als auch der Bindungstasche stattfindet [20]. Die hier gezeigten NMR-Daten bestätigen, dass sich die Entwindung fortsetzt, so dass im Endzustand die P1- und P3-Helix nur partial ausgebildet sind. Ganz anders verhält es sich bei der nativen Aptamerdomäne, die in der freien Form zwar keine P1-Helix aber den Schlaufenkontakt und eine vollständig ausgebildete P3-Helix aufweist. In den NMR-Spektren lässt sich weiterhin eine zweite Konformation für die Helices P2 und P3 zuordnen. Das Vorhandensein zweier Signalsätze weist auf einen langsamen Austausch zwischen zwei Konformationen hin, die zwischen der offenen und geschlossenen Form (bezüglich des Schlaufenkontakts) wechseln. Nach Zugabe von  $Mg^{2+}$  wird das Gleichgewicht zu der stabilen Konformation verschoben, weil die abstoßenden Kräfte zwischen den Phosphatrückgraten der Helices P2 und P3 in der geschlossenen Form kompensiert werden können.

Aus dem Vergleich der beiden Aptamerdomänen mit unterschiedlich langer P1-Helix lässt sich zum ersten Mal schlussfolgern, dass die P3-Helix und der Schlaufenkontakt mit der P1-Helix in der freien Form strukturell konkurrieren. Es scheint demnach eine intrinsische Eigenschaft der Purin-RNA-Schalter bzw. der so konstruierten Dreivegkreuzung zu sein, dass in der freien Form eine Kraft der Entwindung besteht, die die P1- und P3-Helix destabilisiert. Auf diese Weise kann der Zugangsweg für den Liganden in der freien Form offen gehalten werden. Die neue Erkenntnis über das konkurrierende Verhalten zwischen der P1-Helix einerseits und der P3-Helix sowie dem Schlaufenkontakt andererseits wirft vor allem die Frage auf:

*Welchen Einfluss hat die Länge der P1-Helix, die solche strukturellen Veränderungen in der freien Form induziert, auf die Bindungsstärke und -kinetik?*

Bereits 2005 haben Wickiser et al. die native Aptamerdomäne auf die Bindungsstärke und -kinetik mit Fluoreszenzmessungen hin untersucht [7]. Zwei Jahre später wurde in unserer Gruppe das stabilisierte Konstrukt ebenfalls mit Fluoreszenzmessungen charakterisiert (Anke Reining, Diplomarbeit 2007). Diese Untersuchungen zeigen, dass die Bindungsstärke durch die Stabilisierung der P1-Helix verringert wird. Der  $K_D$ -Wert bei 25°C wird durch die Verlängerung der P1-Helix- von 764 nM auf 1774 nM erhöht (Abbildung 5-13). Ein genauer Blick auf die kinetischen Daten lässt erkennen, dass die Destabilisierung des Komplexes sowohl durch eine verringerte Assoziationsgeschwindigkeit und als auch durch eine beschleunigte Dissoziation verursacht wird. Die vermutete Beschleunigung der Komplexbildung infolge der möglicherweise besseren Preorganisation der Bindungstasche durch die Ausbildung der stabileren P1-Helix wird im A-Apt-P1<sup>S</sup>-Konstrukt nicht beobachtet. Im Gegenteil, kinetische Daten aus Fluoreszenzmessungen und strukturelle Daten aus den NMR-Untersuchungen zeigen, dass die Entwindung der P3-Helix und die Destabilisierung des Schlaufenkontakts durch die Verlängerung der P1-Helix einen negativen Einfluss auf die Bindungsgeschwindigkeit und -stärke ausüben. Offensichtlich sorgen in der nativen Aptamerdomäne ohne P1-Helix der Schlaufenkontakt und das daraus resultierende parallele Anliegen der Helices P2 und P3 für die Preorganisation der Bindungstasche, die ein schnelleres Binden des Liganden begünstigt. So kann weiter postuliert werden, dass die RNA-Schalter während der Transkription bereits den Liganden binden können bevor die 3'-Flanke der P1-Helix vollständig synthetisiert ist. Diese Eigenschaft ist für die kinetisch kontrollierten RNA-Schalter von Vorteil, weil während der Transkription nur ein kurzes Zeitfenster für die Bindung des Liganden zur Verfügung steht. Lemay et al. haben gezeigt, dass Adenin nicht gebunden werden kann und der RNA-Schalter sich bereits im inaktiven Status befindet, sobald die Terminatorschleife mit vier Basenpaaren transkribiert worden ist [8]. Bisher bekannte RNA-Schalter zeigen überwiegend sequenzielle Unterschiede innerhalb der Helices P1, P2 und P3 und in der Länge der P1-Helix. Möglicherweise wird auf diese Weise das Gleichgewicht zwischen der thermodynamischen Stabilität und

der „regulativen Reaktionsgeschwindigkeit“ (Assoziationsgeschwindigkeit) fein justiert, so dass die individuellen RNA-Schalter den jeweils verschiedenen Anforderungen gerecht werden können. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, dass die Eigenschaften der Aptamerdomäne durch die Stabilität und Länge der P1-Helix verändert werden können.

## 5.5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Länge der P1-Helix auf die Struktur der freien Aptamerdomäne untersucht. Die Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Einzelmolekülkraftmessungen [14] und zeigen, dass die Faltung der RNA von der Transkription abhängig ist und durch den Liganden induziert wird. Zunächst bilden sich die Helices P2 und P3, die anschließend durch die tertiäre Wechselwirkung zwischen den Schlaufen parallel angelegt werden. Die Ausbildung der P1-Helix und einer definierten Bindungstasche wird erst durch die Bindung des Liganden ausgelöst. Neu in dieser Arbeit ist vor allem die Entdeckung des strukturell konkurrierenden Verhaltens zwischen den einzelnen Strukturelementen der freien Aptamerdomäne. Durch den Vergleich der zwei Konstrukte mit unterschiedlich langer P1-Helix konnte gezeigt werden, dass die Verlängerung der P1-Helix zu einer homogenen Konformation mit erhöhter thermischer Stabilität führt. Allerdings werden durch die Ausbildung der P1-Helix der Schlaufenkontakt und die P3-Helix destabilisiert. Die strukturellen Änderungen haben außerdem zur Folge, dass die Bindungsstärke des Liganden reduziert wird.

Zusammengefasst lassen sich die Ergebnisse auf folgende biologische Relevanz beziehen:

Die intrinsische Kraft der Entwindung sorgt dafür, dass die Bindungstasche offen und für den Liganden zugänglich bleibt. Die Aptamerdomäne fällt nicht in das Minimum der Komplex-ähnlichen Struktur mit einer nicht zugänglichen Bindungstasche.

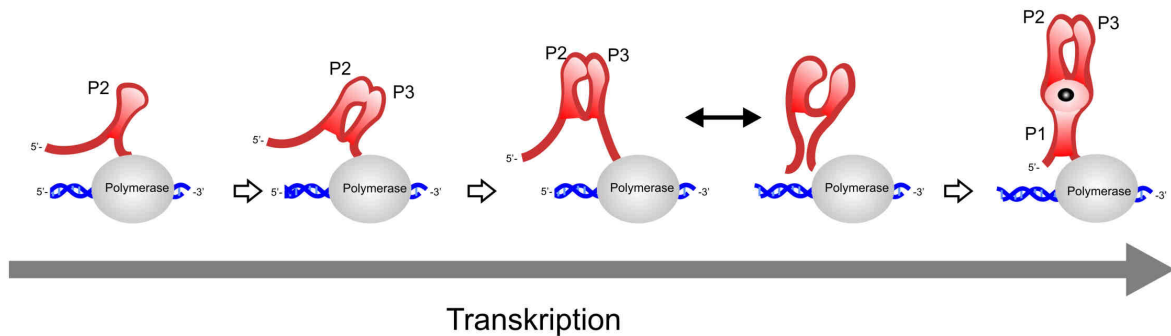
Durch die Stabilität und Länge der P1-Helix kann die Affinität der Ligandbindung ( $K_D$ ) fein justiert werden.

Der Einblick in die beschriebenen Prozesse auf atomarerer Ebene verdeutlicht die Stärke und Vorteile der NMR-Spektroskopie als Methode für die Untersuchung der RNA-Schalter.

Für die weitere Vertiefung dieser Arbeit ist folgende Vorgehensweise sinnvoll (Abbildung 5-14). Um die Faltung der Aptamerdomäne und Bindung des Liganden in Abhängigkeit von dem Transkription zu untersuchen, können RNA-Konstrukte mit verkürzten 3'-Ende als Adäquat für den zeitlichen Verlauf synthetisiert werden. Die Charakterisierung der Sekundärstruktur erfolgt mittels NMR-Spektroskopie. Mit *real-time* NMR-Spektroskopie kann der zeitliche Verlauf der Bindung und Faltung auf atomarer Ebene eingesehen werden. Mittels Fluoreszenz-Messungen, wie in der Literatur beschrieben [7], können kinetische und thermodynamische Daten aufgenommen werden. Die Gesamt-

heit der Ergebnisse kann einen systematischen Einblick in den Zusammenhang zwischen Struktur, struktureller Dynamik und Stabilität, einerseits, und Bindungsstärke- und kinetik, andererseits geben.

A



B

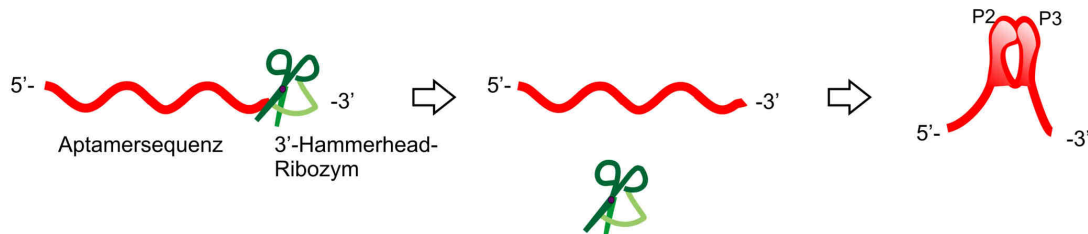


Abbildung 5-14: A. Faltung der Aptamerdomäne im Verlauf der Transkription. B. Herstellung der RNA mit definiertem 3'-Ende durch die Einführung von 3'-Hammerheadribozyms.

## 5.6 Literatur

1. Mandal M, Boese B, Barrick JE, Winkler WC, Breaker RR. **2003**. *Cell* 113: 577-86
2. Mandal M, Breaker RR. **2004**. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 29-35
3. Lemay JF, Lafontaine DA. **2007**. *RNA* 13: 339-50
4. Serganov A, Yuan Y-R, Pikovskaya O, Polonskaia A, Malinina L, et al. **2004**. *Chem. Biol.* 11: 1729-41
5. Noeske J, Richter C, Grundl MA, Nasiri HR, Schwalbe H, Wöhnert J. **2005**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 1372-7
6. Serganov A, Yuan Y, Pikovskaya O, Polonskaia A, Malinina L, et al. **2004**. *Chem. Biol.* 11: 1729 - 41
7. Wickiser JK, Cheah MT, Breaker RR, Crothers DM. **2005**. *Biochemistry* 44: 13404-14
8. Lemay J-F, Penedo JC, Tremblay R, Lilley DMJ, Lafontaine Daniel A. **2006**. *Chem. Biol.* 13: 857-68
9. Noeske J, Buck J, Fürtig B, Nasiri HR, Schwalbe H, Wöhnert J. **2006**. *Nucleic Acids Res.* 35: 572-83
10. Batey RT, Gilbert SD, Montange RK. **2004**. *Nature* 432: 411-5
11. Gilbert SD, Love CE, Edwards AL, Batey RT. **2007**. *Biochemistry* 46: 13297-309
12. Noeske J, Schwalbe H, Wöhnert J. **2007**. *Nucleic Acids Res.* 35: 5262-73
13. Buck J, Fürtig B, Noeske J, Wöhnert J, Schwalbe H. **2007**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 15699-704
14. Greenleaf WJ, Frieda KL, Foster DAN, Woodside MT, Block SM. **2008**. *Science* 319: 630-3
15. Buck J, Noeske J, Wöhnert J, Schwalbe H. **2010**. *Nucleic Acids Res.* 38: 4143-53
16. Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, et al. **1997**. *Nature* 390: 249-56
17. Zuker M. **2003**. *Nucleic Acids Res.* 31: 3406-15



18. [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com).
19. Villa A, Widjajakusuma E, Stock G. **2008**. *J. Am. Chem. Soc.* 112: 134-42
20. Sharma M, Bulusu G, Mitra A. **2009**. *RNA* 15: 1673-92
21. Villa A, Wöhnert J, Stock G. **2009**. *Nucleic Acids Res.* 37: 4774-86



## 6 Anhang

### 6.1 Anhang I: $\Gamma$ -HCP-Pulssequenzen und *Mathematica*-Skripte

#### 6.1.1 A - 2D- $\Gamma$ -HC(P): CH-Gruppe, Referenzexperiment

```

;ghcp_ref3D_new10
;OWNER=nmr
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"
"d0=3u"
"d4=(1s/(4*cnst2))"
"d22=12.5m"

"d12=20u"
"d13=4u"
"d24=d4/2"
"in30=in0"
"d30=d22"

"DELTA1=d4-p8/2"
"DELTA2=d22-p16-d16"
"DELTA3=d22-d13-p16-d16-p22"
"DELTA4=d22-p16-d16-d13-d0-p2-p22"
"DELTA5=d24-p19-d16"
"DELTA6=d4-larger(p2,p8)/2-p16-d16"
"DELTA7=d13+p16+d16+4u"
;"TAU=d0*2+p4"
"TAU1=d26/4"
"TAU2=d26/4-p19-d16"

;aqseq 321

1 ze
d11 pl12:f2 pl16:f3
2 d11 do:f2 do:f3
3 d12
d1 pl1:f1 pl2:f2 pl3:f3
50u UNBLKGRAD
(p1 ph1)
DELTA1 pl3:f3
(center (p2 ph1) (p8:sp13 ph1):f2 )
DELTA1 UNBLKGRAD
(p1 ph2)
d13

p16:gp1
d16 pl2:f2
d13
(p3 ph3):f2
DELTA2
p16:gp2
d16
(p4 ph1):f2
d13
(p22 ph1):f3
DELTA3
p16:gp2
d16
(p3 ph6):f2
d13
p16:gp3
d16
(p3 ph1):f2
4u
(p21 ph1):f3
TAU1
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
TAU2
p19:gp4
d16 pl10:f2
(center (p6 ph11):f2 (p22 ph1):f3)
p19:gp4
d16 pl2:f2
TAU2
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
TAU1
(p21 ph7):f3
4u
(p3 ph8):f2
d13
p16:gp5
d16
/* Phosphor t1-Zeit fuer 3D:
(p21 ph1):f3
d0
(center (p2 ph1):f1 (p4 ph1):f2)
d0
(p22 ph1):f3
TAU

```

```

(p21 ph10):f3
4u
p16:gp6
d16
*/
(p3 ph9):f2
d30
(p4 ph1):f2
d13
(p22 ph1):f3
p16:gp7*EA
d16
DELTA4
(p2 ph1):f1
;d5
d0
(align (p1 ph1) (p3 ph4):f2 ) ;x-Pulse, 2HxCz
p19:gp8
d16
DELTA5
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
DELTA5
p19:gp8
d16
(center (p1 ph2) (p3 ph5):f2 )
p16:gp9
d16
DELTA6 p10:f2
(center (p2 ph1) (p8:sp13 ph1):f2 )
DELTA6
p16:gp9
d16
(p1 ph1)
DELTA7
(p2 ph1)
d13
p16:gp10
d16 p12:f2 p16:f3
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2 cpd3:f3
d11 do:f2 do:f3 mc #0 to 2

/* fuer 3D:
; F1PH(rd10 & rd30 & ip10 & ip11, id0)
;F2EA(igrad EA & ip5*2, id10 & dd30 & ip9*2 &
ip31*2)
*/

F1EA(igrad EA & ip5*2, id0 & dd30 & ip9*2 &
ip31*2)
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 0 0 0 0 0 0
2 2 2 2 2 2 2
ph4=0 0 2 2
ph5=3 3 1 1
ph6=1 1 1 1 1 1 1 1
1 1 1 1 1 1 1 1
3 3 3 3 3 3 3 3
3 3 3 3 3 3 3 3
ph7=0 2
ph8=0
ph9=1 1 1 1 3 3 3 3

ph10=0
ph11=0
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2
2 0 0 2 0 2 2 0
2 0 0 2 0 2 2 0
0 2 2 0 2 0 0 2

;p10 : 120db
;p1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p2 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p3 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p10 : f2 channel - power level for TOCSY (default)
;p12: f2 channel - power level for CPD/BB
decoupling
;p16: f3 channel - power level for CPD/BB
decoupling
;sp3: f2 channel - shaped pulse 180 degree (on
resonance)
;sp13: f2 channel - adiabatic shaped pulse 180
degree (on resonance)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p6 : f2 channel - 180 degree low power pulse
[25.5us]
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
[1 ms]
;p19: homospoil/gradient pulse
[500 us]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p28: f1 channel - trim pulse [1 ms]
;p30: f3 channel - 180 degree shaped pulse for
inversion
;d0 : incremented delay (F1 in 3D)
[3 us]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J(HC))
; for H4': [1.6 ms]
;d5 : Ref=0us, Cross=1/(8J(HC))=0.8ms
;d10: incremented delay (F2 in 3D)
[3 us]
;d11: delay for disk I/O [30 ms]
;d13: short delay [4 us]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d22: 1/(4J(CP)) : C4'-P [12.5 ms]
; C5'-P [25 ms]
; and constant time delay T(C) = 1/(J(CC)) with
J(CC)=40 Hz
;d24: 1/(8J)HC for all multiplicities
;d26 :delay for DQ ZQ relaxation time [5 to 15 ms]
;d30: decremented delay (F2 in 3D) = d22
;in0: 1/(2 * SW(P)) = DW(P)
;nd0: 2
;in10: 1/(2 * SW(C)) = DW(C)
;nd10: 2
;in30: = in10
;NS: 16 * n
;DS: >= 32
;td1: number of experiments in F1
;td2: number of experiments in F2 td2 max = 2
* d30 / in30
;FnMODE: States-TPPI (or TPPI) in F1
;FnMODE: echo-antiecho in F2

```

```

;cpd2: decoupling according to sequence defined
by cpdprg2
;cpd3: decoupling according to sequence defined
by cpdprg3
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling
sequence
;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for decoupling
sequence

;for z-only gradients:
;gpz1: -40%
;gpz2: 25%
;gpz3: -50%
;gpz4: -5%
;gpz5: -45%
;gpz6: 2%

;gpz7: 80%
;gpz8: 11%
;gpz9: -5%
;gpz10: 20.1%

;use gradient files:
;gname1: SINE.100
;gname2: SINE.100
;gname3: SINE.100
;gname4: SINE.100
;gname5: SINE.100
;gname6: SINE.50
;gname7: SINE.100
;gname8: SINE.50
;gname9: SINE.50
;gname10: SINE.100

```

### 6.1.2 B - 2D-Γ-HC(P): CH-Gruppe, Kreuzexperiment

```

;ghcp_cross3D_new10
;OWNER=nmr
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"

"d0=3u"
"d4=(1s/(4*cnst2))"
"d22=12.5m"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=4u"
"d24=d4/2"
"d5=d4/2"

"in30=in0"

"d30=d22"

"DELTA1=d4-p8/2"
"DELTA2=d22-p16-d16"
"DELTA3=d22-d13-p16-d16-p22"
"DELTA4=d22-p16-d16-d13-d0-p2-p22-d5"
"DELTA5=d24-p19-d16"
"DELTA6=d4-larger(p2,p8)/2-p16-d16"
"DELTA7=d13+p16+d16+4u"
"TAU1=d26/4"
"TAU2=d26/4-p19-d16"

;aqseq 321

1 ze
  d11 pl12:f2 pl16:f3
2 d11 do:f2 do:f3
3 d12
  d1 pl1:f1 pl2:f2 pl3:f3
  50u UNBLKGRAD
  (p1 ph1)
  DELTA1 pl3:f3
  (center (p2 ph1) (p8:sp13 ph1):f2 )
  DELTA1 UNBLKGRAD
  (p1 ph2)
  d13
  p16:gp1
  d16 pl2:f2
  d13
  (p3 ph3):f2

;d6
;(p2 ph1):f1
DELTA2
p16:gp2
d16
(p4 ph1):f2
d13
(p22 ph1):f3
DELTA3
p16:gp2
d16
(p3 ph6):f2
d13
p16:gp3
d16
(p3 ph1):f2
4u
(p21 ph1):f3
TAU1
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
TAU2
p19:gp4
d16 pl10:f2
(center (p6 ph11):f2 (p22 ph1):f3)
p19:gp4
d16 pl2:f2
TAU2
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )

```

```

TAU1
(p21 ph7):f3
4u
(p3 ph8):f2
d13
p16:gp5
d16
ph1=0
ph2=1
ph3=0 0 0 0 0 0 0
  2 2 2 2 2 2 2
ph4=0 0 2 2
ph5=3 3 1 1
ph6=1 1 1 1 1 1 1
  1 1 1 1 1 1 1
  3 3 3 3 3 3 3
  3 3 3 3 3 3 3
ph7=1 3
ph8=1
ph9=0 0 0 0 2 2 2 2
ph10=0
ph11=0
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2
  2 0 0 2 0 2 2 0
  2 0 0 2 0 2 2 0
  0 2 2 0 2 0 0 2

/* Phosphor t1-Zeit fuer 3D:
(p21 ph1):f3
d0
(center (p2 ph1):f1 (p4 ph1):f2)
d0
(p22 ph1):f3
TAU
(p21 ph10):f3
4u
p16:gp6
d16
*/
(p3 ph9):f2
d30
(p4 ph1):f2
d13
(p22 ph1):f3
p16:gp7*EA
d16
DELTA4
(p2 ph1):f1
d5
d0
(ralign (p1 ph1) (p3 ph4):f2 )
p19:gp8
d16
DELTA5
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
DELTA5
p19:gp8
d16
(center (p1 ph2) (p3 ph5):f2 )
p16:gp9
d16
DELTA6 p10:f2
(center (p2 ph1) (p8:sp13 ph1):f2 )
DELTA6
p16:gp9
d16
(p1 ph1)
DELTA7
(p2 ph1)
d13
p16:gp10
d16 pl12:f2 pl16:f3
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2 cpd3:f3
d11 do:f2 do:f3 mc #0 to 2

;pl0 : 120db
;p1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p2 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p3 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p10 : f2 channel - power level for TOCSY (default)
;p12: f2 channel - power level for CPD/BB
decoupling
;p16: f3 channel - power level for CPD/BB
decoupling
;sp3: f2 channel - shaped pulse 180 degree (on
resonance)
;sp13: f2 channel - adiabatic shaped pulse 180
degree (on resonance)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p6 : f2 channel - 180 degree low power pulse
[25.5us]
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
[1 ms]
;p19: homospoil/gradient pulse
[500 us]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p28: f1 channel - trim pulse [1 ms]
;p30: f3 channel - 180 degree shaped pulse for
inversion
;d0 : incremented delay (F1 in 3D)
[3 us]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J(HC))
; for H4': [1.6 ms]
;d5 : Ref=0us, Cross=1/(8J(HC))=0.8ms
;d10: incremented delay (F2 in 3D)
[3 us]
;d11: delay for disk I/O [30 ms]
;d13: short delay [4 us]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d22: 1/(4J(CP)) : C4'-P [12.5 ms]
; CS'-P [25 ms]
; and constant time delay T(C) = 1/(J(CC)) with
J(CC)=40 Hz
;d24: 1/(8J)HC for all multiplicities
;d26 :delay for DQ ZQ relaxation time [5 to 15 ms]
;d30: decremented delay (F2 in 3D) = d22

```

```

;in0: 1/(2 * SW(P)) = DW(P)
;nd0: 2
;in10: 1/(2 * SW(C)) = DW(C)
;nd10: 2
;in30: = in10
;NS: 16 * n
;DS: >= 32
;td1: number of experiments in F1
;td2: number of experiments in F2   td2 max = 2
* d30 / in30
;FnMODE: States-TPPI (or TPPI) in F1
;FnMODE: echo-antiecho in F2
;cpd2: decoupling according to sequence defined
by cpdprg2
;cpd3: decoupling according to sequence defined
by cpdprg3
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling
sequence
;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for decoupling
sequence

;for z-only gradients:
;gpz1: -40%
;gpz2: 25%
;gpz3: -50%
;gpz4: -5%
;gpz5: -45%
;gpz6: 2%
;gpz7: 80%
;gpz8: 11%
;gpz9: -5%
;gpz10: 20.1%
;use gradient files:
;gpname1: SINE.100
;gpname2: SINE.100
;gpname3: SINE.100
;gpname4: SINE.100
;gpname5: SINE.100
;gpname6: SINE.50
;gpname7: SINE.100
;gpname8: SINE.50
;gpname9: SINE.50
;gpname10: SINE.100

```

### 6.1.3 C - 2D-Γ-H(C)P: C4'H4'-Gruppe, Referenzexperiment

```

;ghcp_ref3D_final
;$CLASS=HighRes
;$DIM=3D
;$STYLE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

;$OWNER=nmr
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"

"d0=3u"
"d4=(1s/(4*cnst2))"
"d22=12.5m"
"d10=3u"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=4u"
"d24=d4"

"in0=inf1/2"
"in10=inf2/2"
"in30=in10"
"d30=d22"

"DELTA1=d4-p8/2"
;"DELTA2=d22-p16-d16-d6-p2" ; nur zum testen
"DELTA2=d22-p16-d16"
"DELTA3=d22-d13-p16-d16-p22"
"DELTA4=d22-p16-d16-d13-d10-p2-p22"
"DELTA5=d24-p19-d16"

"DELTA6=d4-larger(p2,p8)/2-p19-d16"
"DELTA7=d13+p16+d16+4u"
"TAU=d0*2+p4" ; fuer phosphor t1
"TAU1=d26/4"
"TAU2=d26/4-p19-d16"

aqseq 321
1 ze
d11 pl12:f2 pl16:f3
2 d11 do:f2 do:f3
3 d12
d1 pl1:f1 pl2:f2 pl3:f3
50u UNBLKGRAD
(p1 ph1)

DELTA1 pl3:f3
(center (p2 ph1) (p8:sp13 ph1):f2 )
DELTA1 UNBLKGRAD
(p1 ph2)
d13

p16:gp1
d16 pl2:f2
d13
(p3 ph3):f2
;d6
;(p2 ph1):f1
DELTA2
p16:gp2
d16
(p4 ph1):f2
d13
(p22 ph1):f3
DELTA3

```

```

p16:gp2
d16
;4HzCxPz
(p3 ph6):f2
d13
p16:gp3
d16
(p3 ph1):f2
4u
(p21 ph1):f3
TAU1
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
TAU2
p19:gp4
d16 pl10:f2
(center (p6 ph11):f2 (p22 ph1):f3)
p19:gp4
d16 pl2:f2
TAU2
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
TAU1
(p21 ph7):f3
4u
(p3 ph8):f2
d13
p16:gp5
d16
(p21 ph1):f3
d0
(center (p2 ph1):f1 (p4 ph1):f2)
d0
(p22 ph1):f3
TAU
(p21 ph10):f3
4u
p16:gp6
d16
(p3 ph9):f2
d30
(p4 ph1):f2
d13
(p22 ph1):f3
p16:gp7*EA
d16
DELTA4
(p2 ph1):f1
;d5
d10
(ralign (p1 ph1) (p3 ph4):f2 )
p19:gp8
d16
DELTA5
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
DELTA5
p19:gp8
d16
(center (p1 ph2) (p3 ph5):f2 )
p19:gp9
d16
DELTA6 pl0:f2
(center (p2 ph1) (p8:sp13 ph1):f2 )
DELTA6
p19:gp9
d16
(p1 ph1)
DELTA7
(p2 ph1)
d13
p16:gp10
d16 pl12:f2 pl16:f3
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2 cpd3:f3
d11 do:f2 do:f3 mc #0 to 2
F1PH(rd10 & rd30 & ip10 & ip11, id0)
F2EA(igrad EA & ip5*2, id10 & dd30 & ip9*2 &
ip31*2)
exit
ph1=0
ph2=1
ph3=0
ph4=0 0 2 2
ph5=3 3 1 1
ph6=1
ph7=0 2
ph8=0
ph9=1 1 1 1 3 3 3 3
ph10=0 0 0 0 0 0 0 0
2 2 2 2 2 2 2 2
ph11=0
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2
2 0 0 2 0 2 2 0
;p10 : 120db
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p10 : f2 channel - power level for TOCSY (default)
;p12: f2 channel - power level for CPD/BB
decoupling
;p16: f3 channel - power level for CPD/BB
decoupling
;sp3: f2 channel - shaped pulse 180 degree (on
resonance)
;sp13: f2 channel - adiabatic shaped pulse 180
degree (on resonance)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p6 : f2 channel - 180 degree low power pulse
[25.5us]
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
[1 ms]
;p19: homospoil/gradient pulse
[500 us]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p28: f1 channel - trim pulse [1 ms]

```



```

;p30: f3 channel - 180 degree shaped pulse for
inversion
;d0 : incremented delay (F1 in 3D)
      [3 us]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J(HC))
;   for H4':           [1.6 ms]
;d5 : Ref=0us, Cross=1/(8J(HC))=0.8ms
;d10: incremented delay (F2 in 3D)
      [3 us]
;d11: delay for disk I/O           [30 ms]
;d13: short delay                  [4 us]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d22: 1/(4J(CP)) : C4'-P          [12.5 ms]
;   C5'-P                        [25 ms]
;   and constant time delay T(C) = 1/(J(CC)) with
J(CC)=40 Hz
;d24: 1/(8J)HC for all multiplicities
;d26 :delay for DQ ZQ relaxation time [5 to 15 ms]
;d30: decremented delay (F2 in 3D) = d22
;in0: 1/(2 * SW(P)) = DW(P)
;nd0: 2
;in10: 1/(2 * SW(C)) = DW(C)
;nd10: 2
;in30 = in10
;NS: 16 * n
;DS: >= 32
;td1: number of experiments in F1
;td2: number of experiments in F2   td2 max = 2
* d30 / in30
;FnMODE: States-TPPI (or TPPI) in F1
;FnMODE: echo-antiecho in F2

;cpd2: decoupling according to sequence defined
by cpdprg2
;cpd3: decoupling according to sequence defined
by cpdprg3
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling
sequence
;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for decoupling
sequence

;for z-only gradients:
;gpz1: -40%
;gpz2: 25%
;gpz3: -50%
;gpz4: -5%
;gpz5: -45%
;gpz6: 2%
;gpz7: 80%
;gpz8: 11%
;gpz9: -5%
;gpz10: 20.1%

;use gradient files:
;gpname1: SINE.100
;gpname2: SINE.100
;gpname3: SINE.100
;gpname4: SINE.100
;gpname5: SINE.100
;gpname6: SINE.50
;gpname7: SINE.100
;gpname8: SINE.50
;gpname9: SINE.50
;gpname10: SINE.100

```

### 6.1.4 D - 2D-Γ-H(C)P: C4'H4'-Gruppe, Kreuzexperiment

```

;ghcp_cross3D_final2

;$OWNER=nmr
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"

"d0=3u"
"d4=(1s/(4*cnst2))"
"d22=12.5m"
"d10=3u"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=4u"
"d24=d4"

"in0=inf1/2"
"in10=inf2/2"

"in30=in10"

"d30=d22"

"DELTA1=d4-p8/2"
;"DELTA2=d22-p16-d16-d6-p2" ; nur zum testen
"DELTA2=d22-p16-d16"
"DELTA3=d22-d13-p16-d16-p22"
"DELTA4=d22-p16-d16-d13-d10-p2-p22-d5"
"DELTA5=d24-p19-d16"
"DELTA6=d4-larger(p2,p8)/2-p19-d16"
"DELTA7=d13+p16+d16+4u"

"TAU=d0*2+p4"
"TAU1=d26/4"
"TAU2=d26/4-p19-d16"

aqseq 321

1 ze
  d11 pl12:f2 pl16:f3
2 d11 do:f2 do:f3
3 d12
  d1 pl1:f1 pl2:f2 pl3:f3
  50u UNBLKGRAD
  (p1 ph1)
  DELTA1 pl3:f3
  (center (p2 ph1) (p8:sp13 ph1):f2 )
  DELTA1 UNBLKGRAD

```

```

(p1 ph2)
d13

p16:gp1
d16 pl2:f2
d13
(p3 ph3):f2
DELTA2
p16:gp2
d16
(p4 ph1):f2
d13
(p22 ph1):f3
DELTA3
p16:gp2
d16
(p3 ph6):f2
d13

p16:gp3
d16
(p3 ph1):f2
4u
(p21 ph1):f3

TAU1
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
TAU2
p19:gp4
d16 pl10:f2
(center (p6 ph11):f2 (p22 ph1):f3)
p19:gp4
d16 pl2:f2
TAU2
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
TAU1
(p21 ph7):f3

4u
(p3 ph8):f2

d13
p16:gp5

d16

(p21 ph1):f3

d0
(center (p2 ph1):f1 (p4 ph1):f2)
d0
(p22 ph1):f3
TAU
(p21 ph10):f3

4u
p16:gp6
d16
(p3 ph9):f2

d30

(p4 ph1):f2
d13
(p22 ph1):f3
p16:gp7*EA

d16
DELTA4
(p2 ph1):f1
d5

d10
(ralign (p1 ph1) (p3 ph4):f2 )
p19:gp8
d16
DELTA5
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
DELTA5
p19:gp8
d16
(center (p1 ph2) (p3 ph5):f2 )
p19:gp9
d16
DELTA6 pl0:f2
(center (p2 ph1) (p8:sp13 ph1):f2 )
DELTA6
p19:gp9
d16
(p1 ph1)
DELTA7
(p2 ph1)
d13
p16:gp10
d16 pl12:f2 pl16:f3
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2 cpd3:f3
d11 do:f2 do:f3 mc #0 to 2
F1PH(rd10 & rd30 & ip10 & ip11, id0)
F2EA(igrad EA & ip5*2, id10 & dd30 & ip9*2 &
ip31*2)
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0
ph4=0 0 2 2
ph5=3 3 1 1
ph6=1
ph7=1 3
ph8=1
ph9=0 0 0 0 2 2 2 2

;y for ref, x for cross
ph10=0 0 0 0 0 0 0 0
2 2 2 2 2 2 2 2
ph11=0
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2
2 0 0 2 0 2 2 0

;p0 : 120db
;p1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p2 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p3 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p10 : f2 channel - power level for TOCSY (default)
;p12: f2 channel - power level for CPD/BB
decoupling
;p16: f3 channel - power level for CPD/BB
decoupling
;sp3: f2 channel - shaped pulse 180 degree (on
resonance)
;sp13: f2 channel - adiabatic shaped pulse 180
degree (on resonance)

```

```

;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p6 : f2 channel - 180 degree low power pulse
[25.5us]
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
      [1 ms]
;p19: homospoil/gradient pulse
      [500 us]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p28: f1 channel - trim pulse           [1 ms]
;p30: f3 channel - 180 degree shaped pulse for
inversion
;d0 : incremented delay (F1 in 3D)
      [3 us]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J(HC))
;   for H4':           [1.6 ms]
;d5 : Ref=0us, Cross=1/(8J(HC))=0.8ms
;d10: incremented delay (F2 in 3D)
      [3 us]
;d11: delay for disk I/O                [30 ms]
;d13: short delay                       [4 us]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d22: 1/(4J(CP)) : C4'-P                [12.5 ms]
;      C5'-P                            [25 ms]
;   and constant time delay T(C) = 1/(J(CC)) with
J(CC)=40 Hz
;d24: 1/(8J)HC for all multiplicities
;d26 :delay for DQ ZQ relaxation time [5 to 15 ms]
;d30: decremented delay (F2 in 3D) = d22
;in0: 1/(2 * SW(P)) = DW(P)
;nd0: 2
;in10: 1/(2 * SW(C)) = DW(C)
;nd10: 2
;in30: = in10
;NS: 16 * n

;DS: >= 32
;td1: number of experiments in F1
;td2: number of experiments in F2      td2 max = 2
* d30 / in30
;FnMODE: States-TPPI (or TPPI) in F1
;FnMODE: echo-antiecho in F2
;cpd2: decoupling according to sequence defined
by cpdprg2
;cpd3: decoupling according to sequence defined
by cpdprg3
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling
sequence
;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for decoupling
sequence

;for z-only gradients:
;gpz1: -40%
;gpz2: 25%
;gpz3: -50%
;gpz4: -5%
;gpz5: -45%
;gpz6: 2%
;gpz7: 80%
;gpz8: 11%
;gpz9: -5%
;gpz10: 20.1%

;use gradient files:
;gpname1: SINE.100
;gpname2: SINE.100
;gpname3: SINE.100
;gpname4: SINE.100
;gpname5: SINE.100
;gpname6: SINE.50
;gpname7: SINE.100
;gpname8: SINE.50
;gpname9: SINE.50
;gpname10: SINE.100

```

### 6.1.5 E - 3D- $\Gamma$ -HC(P): CH<sub>2</sub>-Gruppe, Referenzexperiment

```

;ghcp_CH2_3D_ref.2 aus ghcp_CH2_3D_ref.1

;$CLASS=HighRes
;$DIM=3D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"

"d0=3u"
"d10=3u"

"d4=(1s/(4*cnst2))"
"d5=d4/2"
"d22=12.5m"

"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=4u"
"d24=d4/2"
"in0=inf1/2"
"in10=inf2/2"
"in30=in10"

"d30=d22"

"DELTA1=d4-p19-d16-4u"
"DELTA8=d4-p19-d16-4u+d0*2-p4"

```

"DELTA2=d22-p16-d16-d5-p2"	d16
"DELTA3=d22-d13-p16-d16-p22"	(p3 ph1):f2
"DELTA4=d22-p16-d16-d13-d10-p2-p22-d5"	
"DELTA5=d24-p19-d16"	4u
"DELTA6=d4-larger(p2,p8)/2-p19-d16"	(p21 ph1):f3
"DELTA7=d13+p16+d16+4u"	
"TAU1=d26/4"	TAU1
"TAU2=d26/4-p19-d16"	(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
	TAU2
aqseq 321	p19:gp4
	d16 pl10:f2
	(center (p6 ph11):f2 (p22 ph1):f3)
1 ze	p19:gp4
d11 pl12:f2 pl16:f3	d16 pl2:f2
2 d11 do:f2 do:f3	TAU2
3 d12	(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
d1 pl1:f1 pl2:f2 pl3:f3	TAU1
50u UNBLKGRAD	(p21 ph7):f3
(p1 ph3)	
	4u
	(p3 ph8):f2
4u	
p19:gp11	d13
d16	p16:gp5
DELTA1 pl2:f2	
d0	d16
(p4 ph1):f2	(p3 ph9):f2
d0	
(p2 ph1)	d30
4u	(p4 ph1):f2
p19:gp11	d13
d16	(p22 ph1):f3
DELTA8 pl3:f3 pl2:f2	p16:gp7*EA
(p1 ph2)	d16
d13	DELTA4
p16:gp1	
d16 pl2:f2	
d13	(p2 ph1):f1
(p3 ph1):f2	d5
	d10
d5	
	(ralign (p1 ph1) (p3 ph4):f2 )
	p19:gp8
(p2 ph1):f1	d16
	DELTA5
DELTA2	(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
	DELTA5
	p19:gp8
	d16
p16:gp2	(center (p1 ph2) (p3 ph5):f2 )
d16	p19:gp9
(p4 ph1):f2	d16
d13	DELTA6 pl0:f2
(p22 ph1):f3	(center (p2 ph1) (p8:sp13 ph1):f2 )
DELTA3	DELTA6
p16:gp2	p19:gp9
d16	d16
	(p1 ph1)
	DELTA7
(p3 ph6):f2	(p2 ph1)
d13	d13
	p16:gp10
(p1 ph1)	d16 pl12:f2 pl16:f3
	4u BLKGRAD
d13	go=2 ph31 cpd2:f2 cpd3:f3
p16:gp3	d11 do:f2 do:f3 mc #0 to 2

```

F1PH(rd10 & rd30 & ip3, id0)
F2EA(igrad EA & ip5*2, id10 & dd30 & ip9*2 &
ip31*2)
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 0 0 0 0 0 0
  2 2 2 2 2 2 2
ph4=0 0 2 2
ph5=3 3 1 1
ph6=0 0 0 0 0 0 0
  0 0 0 0 0 0 0
  2 2 2 2 2 2 2
  2 2 2 2 2 2 2
ph7=0 2
ph8=0
ph9=0 0 0 0 2 2 2 2

ph10=0
ph11=0
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2
  2 0 0 2 0 2 2 0
  2 0 0 2 0 2 2 0
  0 2 2 0 2 0 0 2

;p10 : 120db
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p10 : f2 channel - power level for TOCSY (default)
;p12: f2 channel - power level for CPD/BB
decoupling
;p16: f3 channel - power level for CPD/BB
decoupling
;sp3: f2 channel - shaped pulse 180 degree (on
resonance)
;sp13: f2 channel - adiabatic shaped pulse 180
degree (on resonance)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p6 : f2 channel - 180 degree low power pulse
[25.5us]
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
      [1 ms]
;p19: homospoil/gradient pulse
      [500 us]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p28: f1 channel - trim pulse          [1 ms]
;p30: f3 channel - 180 degree shaped pulse for
inversion
;d0 : incremented delay (F1 in 3D)
      [3 us]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J(HC))
;   for H4':          [1.6 ms]
;d5 : Ref=0us, Cross=1/(8J(HC))=0.8ms

;d10: incremented delay (F2 in 3D)
      [3 us]
;d11: delay for disk I/O          [30 ms]
;d13: short delay                  [4 us]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d22: 1/(4J(CP)) : C4'-P          [12.5 ms]
;   C5'-P          [25 ms]
;   and constant time delay T(C) = 1/(J(CC)) with
J(CC)=40 Hz
;d24: 1/(8J)HC for all multiplicities
;d26 :delay for DQ ZQ relaxation time [5 to 15 ms]
;d30: decremented delay (F2 in 3D) = d22
;in0: 1/(2 * SW(P)) = DW(P)
;nd0: 2
;in10: 1/(2 * SW(C)) = DW(C)
;nd10: 2
;in30: = in10
;NS: 16 * n
;DS: >= 32
;td1: number of experiments in F1
;td2: number of experiments in F2   td2 max = 2
* d30 / in30
;FnMODE: States-TPPI (or TPPI) in F1
;FnMODE: echo-antiecho in F2
;cpd2: decoupling according to sequence defined
by cpdprg2
;cpd3: decoupling according to sequence defined
by cpdprg3
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling
sequence
;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for decoupling
sequence

;for z-only gradients:
;gpz1: -40%
;gpz2: 25%
;gpz3: -50%
;gpz4: -5%
;gpz5: -45%
;gpz6: 2%
;gpz7: 80%
;gpz8: 11%
;gpz9: -5%
;gpz10: 20.1%
;gpz11: 8%

;use gradient files:
;gpname1: SINE.100
;gpname2: SINE.100
;gpname3: SINE.100
;gpname4: SINE.100
;gpname5: SINE.100
;gpname6: SINE.50
;gpname7: SINE.100
;gpname8: SINE.50
;gpname9: SINE.50
;gpname10: SINE.100
;gpname11: SINE.50

;Processing

;SR(F1): 1/4 SWH(F1)

```

6.1.6 F - 3D- $\Gamma$ -HC(P): CH<sub>2</sub>-Gruppe, Kreuzexperiment

```

;ghcp_CH2_3D_cross.2 aus ghcp_CH2_3D_ref.2

; $CLASS=HighRes
; $DIM=3D
; $TYPE=
; $SUBTYPE=
; $COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"

"d0=3u"
"d10=3u"

"d4=(1s/(4*cnst2))"
"d5=d4/2"
"d22=12.5m"

"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=4u"
"d24=d4/2"

"in0=inf1/2"
"in10=inf2/2"
"in30=in10"

"d30=d22"

"DELTA1=d4-p19-d16-4u"
"DELTA8=d4-p19-d16-4u+d0*2-p4"
"DELTA2=d22-p16-d16"
"DELTA3=d22-d13-p16-d16-p22"
"DELTA4=d22-p16-d16-d13-d10-p2-p22-d5"
"DELTA5=d24-p19-d16"
"DELTA6=d4-larger(p2,p8)/2-p16-d16"
"DELTA7=d13+p16+d16+4u"

"TAU1=d26/4"
"TAU2=d26/4-p19-d16"

aqseq 321

```

```

1 ze
d11 pl12:f2 pl16:f3
2 d11 do:f2 do:f3
3 d12
d1 pl1:f1 pl2:f2 pl3:f3
50u UNBLKGRAD
(p1 ph3)
4u
p19:gp11
d16
DELTA1 pl2:f2
d0
(p4 ph1):f2
d0
(p2 ph1)
4u
p19:gp11
d16
DELTA8 pl3:f3 pl2:f2
(p1 ph2)
d13

p16:gp1
d16 pl2:f2
d13
(p3 ph1):f2

DELTA2

p16:gp2
d16
(p4 ph1):f2
d13
(p22 ph1):f3
DELTA3
p16:gp2
d16
(p3 ph6):f2
d13

p16:gp3
d16

```

```

(p3 ph1):f2
4u
(p21 ph1):f3
TAU1
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
TAU2
p19:gp4
d16 pl10:f2
(center (p6 ph11):f2 (p22 ph1):f3)
p19:gp4
d16 pl2:f2
TAU2
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
TAU1
(p21 ph7):f3
4u
(p3 ph8):f2

d13
(p1 ph1)
d13
p16:gp5
d16
(p3 ph9):f2
d30
(p4 ph1):f2
d13
(p22 ph1):f3
p16:gp7*EA
d16
DELTA4
(p2 ph1):f1
d5
d10
(ralign (p1 ph1) (p3 ph4):f2 )
p19:gp8
d16
DELTA5
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
DELTA5
p19:gp8
d16
(center (p1 ph2) (p3 ph5):f2 )
p16:gp9
d16
DELTA6 pl0:f2
(center (p2 ph1) (p8:sp13 ph1):f2 )
DELTA6
p16:gp9
d16
(p1 ph1)
DELTA7

(p2 ph1)
d13
p16:gp10
d16 pl12:f2 pl16:f3
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2 cpd3:f3
d11 do:f2 do:f3 mc #0 to 2
  F1PH(rd10 & rd30 & ip3, id0)
  F2EA(igrad EA & ip5*2, id10 & dd30 & ip9*2 &
ip31*2)
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 0 0 0 0 0 0
  2 2 2 2 2 2 2
ph4=0 0 2 2
ph5=3 3 1 1
ph6=1 1 1 1 1 1 1; c13 1. x for ref, y for cross
  1 1 1 1 1 1 1
  3 3 3 3 3 3 3
  3 3 3 3 3 3 3
ph7=1 3
ph8=1
ph9=0 0 0 0 2 2 2 2

ph10=0
ph11=0
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2
  2 0 0 2 0 2 0
  2 0 0 2 0 2 0
  0 2 2 0 2 0 0 2

;p10 : 120db
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p10 : f2 channel - power level for TOCSY (default)
;p12: f2 channel - power level for CPD/BB
decoupling
;p16: f3 channel - power level for CPD/BB
decoupling
;sp3: f2 channel - shaped pulse 180 degree (on
resonance)
;sp13: f2 channel - adiabatic shaped pulse 180
degree (on resonance)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p6 : f2 channel - 180 degree low power pulse
[25.5us]
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse

```

```

;p16: homospoil/gradient pulse
      [1 ms]
;p19: homospoil/gradient pulse
      [500 us]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p28: f1 channel - trim pulse          [1 ms]
;p30: f3 channel - 180 degree shaped pulse for
inversion
;d0 : incremented delay (F1 in 3D)
      [3 us]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J(HC))
;   for H4':          [1.6 ms]
;d5 : Ref=0us, Cross=1/(8J(HC))=0.8ms
;d10: incremented delay (F2 in 3D)
      [3 us]
;d11: delay for disk I/O                [30 ms]
;d13: short delay                        [4 us]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d22: 1/(4J(CP)) : C4'-P                [12.5 ms]
;   C5'-P                               [25 ms]
;   and constant time delay T(C) = 1/(J(CC)) with
J(CC)=40 Hz
;d24: 1/(8J)HC for all multiplicities
;d26 :delay for DQ ZQ relaxation time [5 to 15 ms]
;d30: decremented delay (F2 in 3D) = d22
;in0: 1/(2 * SW(P)) = DW(P)
;nd0: 2
;in10: 1/(2 * SW(C)) = DW(C)
;nd10: 2
;in30: = in10
;NS: 16 * n
;DS: >= 32
;td1: number of experiments in F1
;td2: number of experiments in F2   td2 max = 2
* d30 / in30
;FnMODE: States-TPPI (or TPPI) in F1
;FnMODE: echo-antiecho in F2
;cpd2: decoupling according to sequence defined
by cpdprg2
;cpd3: decoupling according to sequence defined
by cpdprg3
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling
sequence
;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for decoupling
sequence

;for z-only gradients:
;gpz1: -40%
;gpz2: 25%
;gpz3: -50%
;gpz4: -5%
;gpz5: -45%
;gpz6: 2%
;gpz7: 80%
;gpz8: 11%
;gpz9: -5%
;gpz10: 20.1%
;gpz11: 8%

;use gradient files:
;gpname1: SINE.100
;gpname2: SINE.100
;gpname3: SINE.100
;gpname4: SINE.100
;gpname5: SINE.100
;gpname6: SINE.50
;gpname7: SINE.100
;gpname8: SINE.50
;gpname9: SINE.50
;gpname10: SINE.100
;gpname11: SINE.50

;Processing

;SR(F1): 1/4 SWH(F1)

```



### 6.1.7 G (Mathematica: Geometrie C3'-H3'-P5')

Rotationsmatrizen um die Koordinatenachsen

```
i=RotationMatrix[ c,{1,0,0}]
{{1,0,0},{0,Cos[c],-Sin[c]},{0,Sin[c],Cos[c]}}
k=RotationMatrix[h,{0,1,0}]
{{Cos[h],0,Sin[h]},{0,1,0},{-Sin[h],0,Cos[h]}}
j=RotationMatrix[d,{0,0,1}]
{{Cos[d],-Sin[d],0},{Sin[d],Cos[d],0},{0,0,1}}
Bestimmung der Bindungs-Vektoren
Transformation aus dem neuen in das alte CSA-
Tensor-Koordinatensystem
t=P-O4
q=P-O3'
r-O3'-C3'
s-C3'-H3'
m-Transformationsmatrix in das 31P-
Molekülkoordinatensystem
h=-57Degree;
c=60Degree;
m=i.k//N
{{0.544639,0.,-0.838671},{-0.72631,0.5,-
0.471671},{0.419335,0.866025,0.27232}}
t=m.{0,1,0}.{0,0.5,0.866025}
c=108Degree;
w=i.{0,1,0} //N
{0.,-0.309017,0.951057}
q=m.w
{-0.797623,-0.603095,-0.00862532}
c=48Degree;
u=i.{0,1,0} //N
{0.,0.669131,0.743145}
r=m.u//N
{-0.623254,-0.0159547,0.781857}
c=-26Degree;
x=i.{0,1,0} //N
{0.,0.898794,-0.438371}
s=m.x//N
{0.367649,0.656164,0.659001}
Beschreibung des C3'-H3'-Vektors durch Rotation
um die beiden Torsionswinkel Epsilon und Zeta
mit Phasenkorrektur --> w
a - Epsilon
a' - Epsilon+122
o=RotationMatrix[(a+122Degree),r];
b - Zeta
b' - Zeta-115
p=RotationMatrix[(b-115Degree),q];
e=o.s;
w=p.e;
```

Winkel zwischen C3-H3' und den Tensor-  
Komponenten y und x

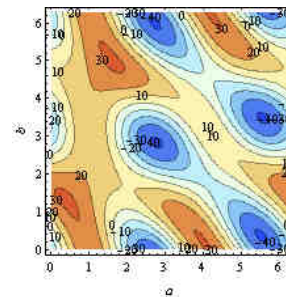
```
y=w.{0.0327545,-0.999127,0.025973};
x=w.{0.999403,0.03275,0.006955};
u - Alle Konstanten zusammengefasst aus der For-
mel
u=-2/15 * gp*tc*hq*u0*gH*gC/8Pi (Rch)^3
u=-2/15*10.84*10^7*14.09*4.1*10^(-
9)*1.05457162853*10^(-34)*4*Pi*10^(-
7)*26.75*10^7*6.73*10^7/(4*Pi*(1.09^3*10^(-
30)))
```

Gamma-Raten in Abhängigkeit von Epsilon (a) und  
Zeta (b)

```
g=-122405*10^(-6)*((-198)*((3*x^2)-1)+((-
138)*((3*y^2)-1)));
```

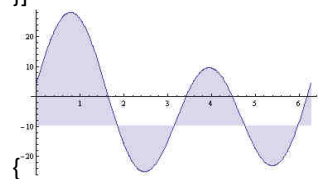
Contour-

```
Plot[g,{a,0Degree,360Degree},{b,0Degree,360Degr
ee},ContourLabels->Automatic,FrameLabel->Auto
matic, ColorFunction->"LightTemperatureMap"]
```



Berechnung von Zeta (b) aus G-Rate (l) und Epsilon  
(a)

```
a=-160Degree;
l=-9.6;
g//N;
Reduce[g l,b]//N
C[1]∈ Integers&&(b -1.52499+6.28319 C[1]||b -
0.306246+6.28319 C[1]||b 1.84515 +6.28319
C[1]||b 3.1454 +6.28319 C[1])
Table[Plot[g,{b,0Degree,360Degree},Filling->f],{f,l}
]
```



### 6.1.8 H (Mathematica: Geometrie C4'-H4'-P5'; + Rechnung: $\alpha/\beta$ aus H4'- $\Gamma$ -Raten)

Rotationsmatritzen um die Koordinaten-Achsen

```
i=RotationMatrix[ c,{1,0,0}]
{{1,0,0},{0,Cos[c],-Sin[c]},{0,Sin[c],Cos[c]}}
k=RotationMatrix[h,{0,1,0}]
{{Cos[h],0,Sin[h]},{0,1,0},{-Sin[h],0,Cos[h]}}
j=RotationMatrix[d,{0,0,1}]
{{Cos[d],-Sin[d],0},{Sin[d],Cos[d],0},{0,0,1}}
```

Bestimmung der Bindungs-Vektoren Transformation aus dem neuen in das alte CSA-Tensor-Koordinatensystem

```
t-P-O4
q-P-O5'
r-O5'-C5'
s-C5'-C4'
z-C4'-H4'
```

m-Transformationsmatrix in das 31P-Koordinatensystem

```
h=55.77Degree;
c=60Degree;
m=i.k//N
{{0.562516,0.,0.826786},{0.716018,0.5,-0.487153},{-0.413393,0.866025,0.281258}}
t=m.{0,1,0}.{0.,0.5,0.866025}
c=108Degree;
w=i.{0,1,0} //N
{0.,-0.309017,0.951057}
q=m.w
{0.78632,-0.617819,-0.000124143}
c=49Degree;
u=i.{0,1,0} //N
{0.,0.656059,0.75471}
r=m.u//N
{0.623983,-0.0396299,0.780432}
c=-21Degree;
x=i.{0,1,0} //N
{0.,0.93358,-0.358368}
s=m.x//N
{-0.296294,0.64137,0.70771}
c=-94Degree;
u=i.{0,1,0} //N
{0.,-0.0697565,-0.997564}
z=m.u//N
```

```
{-0.824772,0.451089,-0.340984}
```

Beschreibung des C4'-H4'-Vektors durch Rotation um die drei Torsionswinkel Alpha (b), Beta (a) und Gamma (g)

```
d - Gamma
d - Gamma + 122Degree
d=.
f=RotationMatrix[(d+122Degree),s];
a - Beta
a=.
o=RotationMatrix[a,r];
b-Alpha
b-alpha+115
b=.
p=RotationMatrix[(b+115Degree),q];
e=f.z;
v=o.e;
w=p.v;
Winkel zwischen C4'-H4' und den Tensor-Komponenten y und x ausgedruckt als cos (winkel)
y=cos (winkel)=w.{0,1,0}/|w|*|1|
y=w.{0.0327545,-0.999127,0.025973};
x=w.{0.999403,0.03275,0.006955};
l-Gamma-Raten in Abhängigkeit von Beta (a) und Alpha (b) und Gamma (g)
g=-67113.1*10^(-6)*((-198.7)*((3*x^2)-1))+((-138.4)*((3*y^2)-1));
```

Berechnung von Alpha (b) aus Beta (a), Gamma (d) und G-Rate (l)

```
b= Alpha
b=.;
a= Beta
a=200Degree;
d=Gamma
d=60Degree;
g;
l=17;
g//N;
Reduce[g l,b]//N
C[1]∈ Integers&&(b -1.33168+6.28319 C[1]|| b -1.1225+6.28319 C[1]|| b 1.54487 +6.28319 C[1]|| b 1.98437 +6.28319 C[1])
```

### 6.1.9 I (*Mathematica*: Geometrie C4'-H4'-P3'\_{i+1})

Rotationsmatritzen um die Koordinaten-Achsen

```
i=RotationMatrix[c,{1,0,0}]
{{1,0,0},{0,Cos[c],-Sin[c]},{0,Sin[c],Cos[c]}}
k=RotationMatrix[h,{0,1,0}]
{{Cos[h],0,Sin[h]},{0,1,0},{-Sin[h],0,Cos[h]}}
j=RotationMatrix[d,{0,0,1}]
{{Cos[d],-Sin[d],0},{Sin[d],Cos[d],0},{0,0,1}}
```

Bestimmung der Bindungs-Vektoren

Transformation aus dem neuen in das alte CSA-Tensor-Koordinatensystem

```
t-P-O4
q-P-O3'
r-O3'-C3'
s-C3'-C4'
z-C4'-H4'
m-Transformationsmatrix ins 31P-Koordinatensystem
h=-55.77Degree;
c=60Degree;
m=i.k//N
{{0.562516,0,-0.826786},{-0.716018,0.5,-0.487153},{0.413393,0.866025,0.281258}}
t=m.{0,1,0}
{0.,0.5,0.866025}
c=108Degree;
w=i.{0,1,0} //N
{0.,-0.309017,0.951057}
q=m.w
{-0.78632,-0.617819,-0.000124143}
c=49Degree;
u=i.{0,1,0} //N
{0.,0.656059,0.75471}
r=m.u//N
{-0.623983,-0.0396299,0.780432}
c=-21Degree;
x=i.{0,1,0} //N
{0.,0.93358,-0.358368}
s=m.x//N
{0.296294,0.64137,0.70771}
c=-94Degree;
u=i.{0,1,0} //N
{0.,-0.0697565,-0.997564}
z=m.u//N
{0.824772,0.451089,-0.340984}
```

Beschreibung des C4'-H4'-Vektors durch Rotation um die drei Torsi-

onswinkel Delta (d), Epsilon (a) und Zeta (g)

```
d - Delta
d - Delta + 120Degree
d=84Degree;
f=RotationMatrix[(d-120Degree),s];
a -Epsilon
o=RotationMatrix[a,r];

b-Zeta
b-Zeta-115
p=RotationMatrix[(b-115Degree),q];
e=f.z
{0.999991,-0.00172377,-0.00397563}
v=o.e;
w=p.v;
Winkel zwischen C4'-H4' und den Tensor-Komponenten y und x ausgedruckt als cos (winkel)
y=cos (winkel)=w.{0,1,0}/|w|*|1|
x=w.{0.999403,0.03275,0.006955};
u - Alle Konstanten zusammengefasst aus der Formel
u=-2/15 * gp*tc*hq*u0*gH*gC/8Pi (Rch)^3
u=(-2/15)*10.84*10^7*14.09*2.27*10^(-9)*1.05457162853*10^(-34)*4*Pi*10^(-7)*26.75*10^7*6.73*10^7/(4*Pi*(1.09^3*10^(-30)))
-67770.4
g -Gamma-Raten in Abhängigkeit von Beta (a) und Alpha (b) und Gamma (g)
g=-122404.7605300396`*10^(-6)*((-198.7)*((3*x^2)-1)+((-138.4)*((3*y^2)-1)));
Berechnung von Zeta (b) aus Dekta (d), Epsilon (a) und der Gamma-Rate (l)
d - Delta
d=80Degree;
a=Epsilon
a=-150Degree;
b=Zeta
b=.
l=19;
g//N;
Reduce[g l,b]//N
C[1]∈ Integers&&(b (-1.31203-0.174867™)+6.28319 C[1]||b (-1.31203+0.174867™)+6.28319 C[1]||b (1.96306 -0.120904™)+6.28319 C[1]||b (1.96306 +0.120904™)+6.28319 C[1])
```

6.1.10 J (*Mathematica*: Geometrie C5'-H5'(proR)-P5'<sub>i</sub> +Rechnung:  $\alpha/\beta$  aus H5'- $\Gamma$ -Raten)

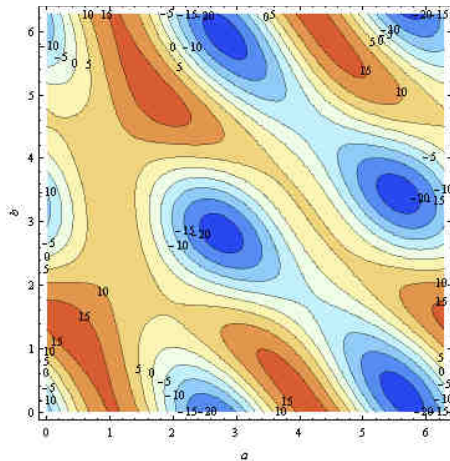
P-CSA und Orientierung wurde aus Sklenar, 2008  
übernommen.

x=86,3; y=26,0; z=-112.4  
x-z = 198,7  
y-z= 138,4  
CSA für RNA-Class 20(A-RNA) nach Berman, 2004  
# x y z (von links  
nach rechts)  
1 0,999403 0,03275 0,006084  
2 0,032545-0,999127 0,025973  
3 0,006955-0,025748-0,999662

x = {0.999403,0.03275,0.006955}  
y = {0.0327545,-0.999127,0.025973}  
Rotationsmatrizen um die Koordinaten-Achsen  
i=RotationMatrix[c,{1,0,0}]  
{1,0,0},{0,Cos[c],-Sin[c]},{0,Sin[c],Cos[c]}  
k=RotationMatrix[h,{0,1,0}]  
{Cos[h],0,Sin[h]},{0,1,0},{-Sin[h],0,Cos[h]}  
j=RotationMatrix[d,{0,0,1}]  
{Cos[d],-Sin[d],0},{Sin[d],Cos[d],0},{0,0,1}  
Bestimmung der Bindungs-Vektoren  
Transformation aus dem neuen in das alte CSA-  
Tensor-Koordinatensystem  
t-P-O4  
q-P-O3'  
r-O5'-C5'  
s-C5'-H5'  
m-Transformationsmatrix neu-->alt  
h=55.77Degree;  
c=60Degree;  
m=i.k//N  
{0.562516,0.,0.826786},{0.716018,0.5,-  
0.487153},{-0.413393,0.866025,0.281258}

t=m.{0,1,0}  
{0.,0.5,0.866025}  
c=108Degree;  
w=i.{0,1,0} //N  
{0.,-0.309017,0.951057}  
q=m.w  
{0.78632,-0.617819,-0.000124143}  
c=49Degree;  
u=i.{0,1,0} //N  
{0.,0.656059,0.75471}  
r=m.u//N  
{0.623983,-0.0396299,0.780432}  
c=-26Degree;

x=i.{0,1,0} //N  
{0.,0.898794,-0.438371}  
s=m.x//N  
{-0.362439,0.662951,0.655083}  
w  
{0.,-0.309017,0.951057}  
Beschreibung des C5'-H5''-Vektors durch Rotation  
um die beiden Torsionswinkel Alpha (b) und Beta  
(a)  
a - Beta  
H5'-proR-a=Beta+120  
H5''-proS -a=Beta-120  
a=.  
o=RotationMatrix[(a+120Degree),r]//N;  
b-Alpha  
b-alpha+115  
b=.  
p=RotationMatrix[(b+115Degree),q]//N;  
e=o.s//N;  
w=p.e//N;  
w=p.e;  
Winkel zwischen C5'-H5'' und den Tensor-  
Komponenten y und x  
y=w.{0.0327545,-0.999127,0.025973};  
x=w.{0.999403,0.03275,0.006955};  
  
u - Alle Konstanten zusammengefasst aus der For-  
mel  
u=-2/15 \* gp\*tc\*hq\*u0\*gH\*gC/8Pi (Rch)^3  
u=(-2/15)\*10.84\*10^7\*14.09\*2.27\*10^(-  
9)\*1.05457162853\*10^(-34)\*4\*Pi\*10^(-  
7)\*26.75\*10^7\*6.73\*10^7/(4\*Pi\*(1.09^3\*10^(-  
30)))  
  
-67770.4  
Gamma-Raten in Abhängigkeit von Beta (a) und  
Alpha (b)  
g=-67113.1\*10^(-6)\*((-198.7)\*((3\*x^2)-1))+((-  
138.4)\*((3\*y^2)-1));  
Contour-  
Plot[g,{a,0Degree,360Degree},{b,0Degree,360Degr  
ee},ContourLabels→Automatic,FrameLabel→Auto  
matic, ColorFunction→"LightTemperatureMap"]



Berechnung von Alpha (b) aus Beta (a) und G-Rate (l)

```
a=Beta
a=180Degree;
b=Alpha
b=.
l=5.4;
g//N;
Reduce[g l,b]//N
C[1]∈Integers&&(b -2.84299+6.28319 C[1]||b -
1.38586+6.28319 C[1]||b 0.169811 +6.28319
C[1]||b 1.9231 +6.28319 C[1])
```

### 6.1.11 K (Mathematica: Geometrie C5'-H5'(proS)-P5'; +Rechnung: $\alpha/\beta$ aus H5'- $\Gamma$ -Raten)

P-CSA und Orientierung wurde aus Sklenar, 2008 übernommen.

x=86,3; y=26.0; z=-112.4

x-z = 198,7

y-z= 138,4

CSA für RNA-Class 20(A-RNA) nach Berman, 2004

# x y z (von links nach rechts)

1 0,999403 0,03275 0,006084

2 0,032545-0,999127 0,025973

3 0,006955-0,025748-0,999662

x = {0.999403,0.03275,0.006955}

y ={0.0327545,-0.999127,0.025973}

i=RotationMatrix[c,{1,0,0}]

{{1,0,0},{0,Cos[c],-Sin[c]},{0,Sin[c],Cos[c]}}

k=RotationMatrix[h,{0,1,0}]

{{Cos[h],0,Sin[h]},{0,1,0},{-Sin[h],0,Cos[h]}}

j=RotationMatrix[d,{0,0,1}]

{{Cos[d],-Sin[d],0},{Sin[d],Cos[d],0},{0,0,1}}

Bestimmung der Bindungs-Vektoren

Transformation aus dem neuen in das alte CSA-

Tensor-Koordinatensystem

t-P-O4

q-P-O5'

r-O5'-C5'

s-C5'-H5'

m-Transformationsmatrix neu-->alt

h=55.77Degree;

c=60Degree;

m=i.k//N

```
{0.562516,0.,0.826786},{0.716018,0.5,-
0.487153},{-0.413393,0.866025,0.281258}}
```

t=m.{0,1,0}

```
{0.,0.5,0.866025}
```

c=108Degree;

w=i.{0,1,0} //N

```
{0.,-0.309017,0.951057}
```

q=m.w

```
{0.78632,-0.617819,-0.000124143}
```

c=49Degree;

u=i.{0,1,0} //N

```
{0.,0.656059,0.75471}
```

r=m.u//N

```
{0.623983,-0.0396299,0.780432}
```

c=-26Degree;

x=i.{0,1,0} //N

```
{0.,0.898794,-0.438371}
```

s=m.x//N

```
{-0.362439,0.662951,0.655083}
```

Beschreibung des C5'-H5''-Vektors durch Rotation

um die beiden Torsionswinkel Alpha (b) und Beta

(a)

a - Beta

H5'-proR-a=Beta+120

H5''-proS -a=Beta-120

a=.

o=RotationMatrix[(a-120Degree),r]//N;

b=Alpha

b-alpha+115

b=.

p=RotationMatrix[(b+115Degree),q]//N;

e=o.s//N;

```
w=p.e//N;
w=p.e;
Winkel zwischen C5'-H5'' und den Tensor-
Komponenten y und x ausgedrückt als cos (winkel)
y=cos (winkel)=w.{0,1,0}/|w|*|1|
y=w.{0.0327545,-0.999127,0.025973};
x=w.{0.999403,0.03275,0.006955};
u - Alle Konstanten zusammengefasst aus der For-
mel
u=-2/15 * gp*tc*hq*u0*gH*gC/8Pi (Rch)^3
u=-((2/15)*10.84*10^7*14.09*2.27*10^(-
9)*1.05457162853*10^(-34)*4*Pi*10^(-
7)*26.75*10^7*6.73*10^7/(4*Pi*(1.09^3*10^(-
30))))
-67770.4
Gamma-Raten in Abhängigkeit von Beta (a) und
Alpha (b)
```

```
g=-67113.1*10^(-6)*((-198.7)*((3*x^2)-1))+((-
138.4)*((3*y^2)-1));
Berechnung von Alpha (b) aus Beta (a) und G-Rate
(l)
b=Alpha
b=.;
a=Beta
a=180Degree;
l=5.3;
g//N;
Reduce[g l,b]//N
C[1]∈ Integers&&(b -3.50612+6.28319 C[1]|| b -
1.94384+6.28319 C[1]|| b -0.196746+6.28319
C[1]|| b 1.3271 +6.28319 C[1])
```

### 6.1.12 L (*Mathematica*: Rechnung: $\epsilon/\zeta$ aus H3'- $\Gamma$ -Raten)

```
Needs["Units`"]
PhaseCorr1=122Degree;
PhaseCorr2=-115Degree;
O3C3Vector= {-0.6232536928488293`,-
0.015954738313340523`,0.7818569438686658`}
(*StartRotationsMatrix r*);
PO3Vector= {-0.7976231086694529`,-
0.6030945037435899`,-0.008625315689944556`}
(*StartRotationsMatrix q*);
CHStartVector={0.3676489786484824`,0.65616408
5630347`,0.6590014576824685`};
σ11=-86.3;
σ22=-26;
σ33=112.4;
γH=42.576 106 Hertz/Tesla;
γP=10.84 107 Hertz/Tesla;
γP;
Spektrometerfrequenz=600 106 Hertz;
B0=Spektrometerfrequenz/γH;
τc=4.1 10-9;
(*konstante=-(2/15)10.84 107 Subscript[B, 0]
Subscript[τ, c] 4π 10-7 26.75 107 (6.73
107)/(4π (1.093 10-30))*
konstante=-(2/15)10.84 107 14.09 4.1 10-9
1.05457162853 10-34 4π 10-7 26.75 107 (6.73
107)/(4π (1.093 10-30)) 10-6;
TorsionsRotMatrix[ε_,ζ_]:= RotationMatrix[{ζ
Degree+PhaseCorr2},PO3Vector].RotationMatrix[{ε
Degree+PhaseCorr1},O3C3Vector];
```

```
cosinusThe-
taX[ε_,ζ_]:= {1,0,0}.TorsionsRotMatrix[ε,ζ].CHStart
Vector;
cosinusThetaY[ε_,ζ_]:= {0,-
1,0}.TorsionsRotMatrix[ε,ζ].CHStartVector;
Γ[ε_,ζ_]:=konstante ((σ11-σ33)(3 cosinusThe-
taX[ε,ζ]2-1)+(σ22-σ33)(3cosinusThetaY[ε,ζ]2-1));
(*für ε aus Γ und ζ*)
(*-----*)
Values1Γ2ζ=Import["C3H3_raten_Zeta.dat"];
Values1Γ2ε=Import["C3H3_raten_Epsilon.dat"];
Off[General::stop];
Off[Solve::ifun];
hilfsliste=Values1Γ2ζ;
hilfsliste2={};
For[i=1,i≤Length[hilfsliste],i++,
c=NSolve[
Γ[hilfsliste[[i,2]],b]
hilfsliste[[i,1]],
b
];
hilfsliste2=Append[
hilfsliste2,
Table[
c[[i,2]],
{i,1,Length[c]}]
];
ergebnis1=hilfsliste2;
```

```

Export["result_degree_epsilon.dat",ergebnis1]
(*-----*)
(*für ε aus Γ und ζ*)
(*-----*)
Off[General::stop];
Off[Solve::ifun];
hilfsliste=Values1Γ2ε;
hilfsliste2={};
For[i=1,i≤Length[hilfsliste],i++,
  c=Solve[
    Γ[b,hilfsliste[[i,2]]
  hilfsliste[[i,1]],b
  ];
  hilfsliste2=Append[
    hilfsliste2,
    Table[
      c[[i,1,2]],
      {i,1,Length[c]}
    ]
  ];
ergebnis=hilfsliste2;
Export["result_degree_zeta.dat",ergebnis](*-----
-----*)
result_degree_epsilon.dat
result_degree_zeta.dat

```

```

(*Rückrechnung der Γ-Raten in Abhängigkeit von ε
und ζ:
Hierzu muss die pdbEpsiZeta.dat vorhanden sein
(linke Spalte: ε und rechte Spalte: ζ)!)
pdbEpsiZeta=Import["pdbEpsiZeta.dat"];
hilfsliste3={};
For[i=0,i≤Length[pdbEpsiZeta],i++,
  If[i 0,
    hilfsliste3=Append[hilfsliste3,
      {"epsilon",
        "zeta","Gamma"}
    ],
    hilfsliste3=Append[hilfsliste3,
      {pdbEpsiZeta[[i,1]],
        pdbEpsiZeta[[i,2]],Γ[pdbEpsiZeta[[i,1]],pdbEpsiZeta
        [[i,2]]}
    ]
  ];
solution=hilfsliste3;
hilfsliste3=.;
Export["pdbEpsiZeta_GammaResults.dat",solution]
pdbEpsiZeta_GammaResults.dat

```

### 6.1.13 M (Mathematica: Rechnung: $\varepsilon/\zeta$ aus H4'- $\Gamma$ -Raten)

```

Needs["Units`"]
PhaseCorr1=0Degree;
PhaseCorr2=-115Degree;
O3C3Vector= {-0.6232536928488293`,-
0.015954738313340523`,0.7818569438686658`}
(*StartRotationsMatrix r*);
PO3Vector= {-0.7976231086694529`,-
0.6030945037435899`,-0.008625315689944556`}
(*StartRotationsMatrix q*);
CHStartVector={0.9999906114395083`,-
0.001723773388760813`,-
0.003975630533869012`};
(*C4'H4'-Vektor für den Delta = 84 Degree
{0.9999906114395083`,-0.001723773388760813`,-
0.003975630533869012`}
delta=153
{0.41270622402431484`,0.7814983053831265`,-
0.4679038056426695`}*)
σ11=-86.3;
σ22=-26;
σ33=112.4;

```

```

γH=42.576 106 Hertz/Tesla;
γP=10.84 107 Hertz/Tesla;
γP;
Spektrometerfrequenz=600 106 Hertz;
B0=Spektrometerfrequenz/γH;
τc=4.1 10-9;
(*konstante=-(2/15)10.84 107 Subscript[B, 0]
Subscript[τ, c] 4π 10-7 26.75 107 (6.73
107)/(4π (1.093 10-30));*)
konstante=-(2/15)10.84 107 14.09 4.1 10-9
1.05457162853 10-34 4π 10-7 26.75 107 (6.73
107)/(4π (1.093 10-30)) 10-6;
TorsionsRotMatrix[ε_,ζ_]:=RotationMatrix[(ζ
Degree+PhaseCorr2),PO3Vector].RotationMatrix[(ε
Degree+PhaseCorr1),O3C3Vector];
cosinusThe-
taX[ε_,ζ_]:=1,0,0).TorsionsRotMatrix[ε,ζ].CHStart
Vector;
cosinusThetaY[ε_,ζ_]:=0,-
1,0).TorsionsRotMatrix[ε,ζ].CHStartVector;

```





```

γH=42.576 106 Hertz/Tesla;
γP=10.84 107 Hertz/Tesla;
γP;
Spektrometerfrequenz=600 106 Hertz;
B0=Spektrometerfrequenz/γH;
τc=4.1 10-9;
(*konstante=-(2/15)10.84 107 Subscript[B, 0]
Subscript[τ, c] 4π 10-7 26.75 107 (6.73
107)/(4π (1.093 10-30));*)
konstante=-(2/15)10.84 107 14.09 4.1 10-9
1.05457162853 10-34 4π 10-7 26.75 107 (6.73
107)/(4π (1.093 10-30)) 10-6;
TorsionsRotMatrix3[ε_,ζ_]:= RotationMatrix[{ζ
De-
gree+Phase3Corr2},PO3Vector].RotationMatrix[{ε
Degree+Phase3Corr1},O3C3Vector];
cosinusThe-
taX3[ε_,ζ_]:= {1,0,0}.TorsionsRotMatrix3[ε,ζ].CH3St
artVector;
cosinusThetaY3[ε_,ζ_]:= {0,-
1,0}.TorsionsRotMatrix3[ε,ζ].CH3StartVector;
Γ[ε_,ζ_]:=konstante ((σ11-σ33)(3 cosinusThe-
taX3[ε,ζ]2-1)+(σ22-σ33)(3cosinusThetaY3[ε,ζ]2-1));

```

```

Needs["Units`"]
Phase4Corr1=0Degree;
Phase4Corr2=-115Degree;
O3C3Vector= {-0.6232536928488293`,-
0.015954738313340523`,0.7818569438686658`}
(*StartRotationsMatrix r*);
PO3Vector= {-0.7976231086694529`,-
0.6030945037435899`,-0.008625315689944556`}
(*StartRotationsMatrix q*);
CH4StartVector={0.5695085521133353`,0.6884012
261001076`,-0.4491812117326819`};
(*C4'H4'-Vektor für den Delta = 84 Degree
{0.9999906114395083`,-0.001723773388760813`,-
0.003975630533869012`}
delta=153
{0.41270622402431484`,0.7814983053831265`,-
0.4679038056426695`, delta=142 (A17) -
{0.5695085521133353`,0.6884012261001076`,-
0.4491812117326819`}}*)
σ11=-86.3;
σ22=-26;
σ33=112.4;
γH=42.576 106 Hertz/Tesla;
γP=10.84 107 Hertz/Tesla;
γP;

```

```

Spektrometerfrequenz=600 106 Hertz;
B0=Spektrometerfrequenz/γH;
τc=4.1 10-9;
(*konstante=-(2/15)10.84 107 Subscript[B, 0]
Subscript[τ, c] 4π 10-7 26.75 107 (6.73
107)/(4π (1.093 10-30));*)
konstante=-(2/15)10.84 107 14.09 4.1 10-9
1.05457162853 10-34 4π 10-7 26.75 107 (6.73
107)/(4π (1.093 10-30)) 10-6;
TorsionsRotMatrix4[ε_,ζ_]:= RotationMatrix[{ζ
De-
gree+Phase4Corr2},PO3Vector].RotationMatrix[{ε
Degree+Phase4Corr1},O3C3Vector];
cosinusThe-
taX4[ε_,ζ_]:= {1,0,0}.TorsionsRotMatrix4[ε,ζ].CH4St
artVector;
cosinusThetaY4[ε_,ζ_]:= {0,-
1,0}.TorsionsRotMatrix4[ε,ζ].CH4StartVector;
A[ε_,ζ_]:=konstante ((σ11-σ33)(3 cosinusThe-
taX4[ε,ζ]2-1)+(σ22-σ33)(3cosinusThetaY4[ε,ζ]2-1));
Γ[20,30]
17.2642

```

```

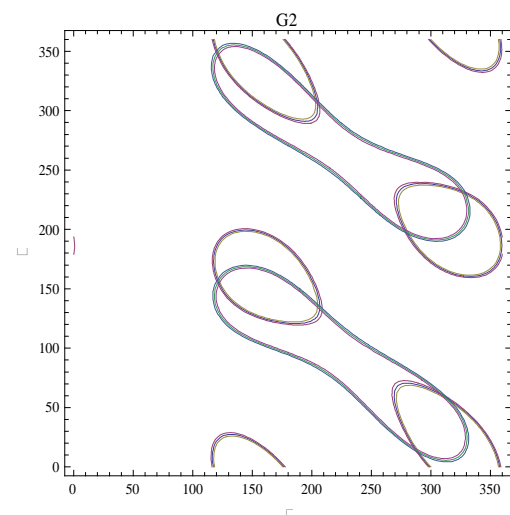
A[20,30]
15.0293

```

```

ContourPlot[{Γ [ε,ζ] -21,Γ [ε,ζ] -20,Γ [ε,ζ] -
22,A [ε,ζ] -25,A [ε,ζ] -24,A [ε,ζ] -
26},{ε,0,360},{ζ,0,360},FrameLabel→{ε,ζ}, Con-
tourLabels→Automatic, PlotLabel→G2]

```



## 6.1.15 Anhang I-O: Defintion der RNA-Konformationsklassen

Tabelle I-1: Charakterisierung der Konformationsklassen. Torsionswinkel zwei aufeinander folgender Nukleotide sind mit i und i+1 gekennzeichnet.

<b>Nicht-A-RNA-Typ</b>		<b>Konformation</b>													
		Torsionswinkel [°]													
<b>Klasse</b>	<b><math>\alpha_i</math></b>	<b><math>\beta_i</math></b>	<b><math>\gamma_i</math></b>	<b><math>\chi_i</math></b>	<b><math>\delta_i</math></b>	<b><math>\epsilon_i</math></b>	<b><math>\zeta_i</math></b>	<b><math>\alpha_{i+1}</math></b>	<b><math>\beta_{i+1}</math></b>	<b><math>\gamma_{i+1}</math></b>	<b><math>\delta_{i+1}</math></b>	<b><math>\epsilon_{i+1}</math></b>	<b><math>\zeta_{i+1}</math></b>	<b><math>\chi_{i+1}</math></b>	
1	295	168	53	208	82	208	53	165	149	50	148	263	139	218	
2	295	171	53	203	81	194	292	161	162	53	84	228	276	203	
3	295	178	53	206	86	226	206	296	154	49	81	226	276	-212	
4	-301	190	-54	232	148	270	84	66	190	177	85	227	280	-201	
5	-301	178	54	256	149	222	152	292	164	46	83	218	290	188	
6	301	178	54	256	149	222	152	292	164	46	146	252	-106	226	
7	275	96	156	257	149	195	150	292	147	46	84	220	286	185	
8	-301	181	51	232	148	270	83	68	175	58	149	243	-266	227	
9	-301	181	294	56	148	237	83	68	175	58	149	269	312	240	
10	295	186	53	198	81	237	65	66	119	177	82	237	281	212	
11	-295	167	53	212	84	221	137	293	167	46	82	216	268	-210	
12	95	170	53	214	81	222	160	287	166	46	83	224	294	190	
13	-95	170	53	214	81	222	160	287	166	46	147	258	-190	243	
14	-295	171	53	207	85	256	253	66	168	54	84	220	-250	198	
15	295	181	53	198	81	225	211	60	201	49	81	207	202	196	
16	295	181	53	198	81	225	211	60	201	49	142	259	-184	238	
17	-301	192	54	243	148	256	245	63	171	54	87	239	278	211	
18	295	178	53	202	85	256	261	59	182	305	136	234	-165	-209	
<b>A-RNA-Typ</b>		<b>Konformation</b>													
		Torsionswinkel [°]													
<b>Klasse</b>	<b><math>\alpha_i</math></b>	<b><math>\beta_i</math></b>	<b><math>\gamma_i</math></b>	<b><math>\chi_i</math></b>	<b><math>\delta_i</math></b>	<b><math>\epsilon_i</math></b>	<b><math>\zeta_i</math></b>	<b><math>\alpha_{i+1}</math></b>	<b><math>\beta_{i+1}</math></b>	<b><math>\gamma_{i+1}</math></b>	<b><math>\delta_{i+1}</math></b>	<b><math>\epsilon_{i+1}</math></b>	<b><math>\zeta_{i+1}</math></b>	<b><math>\chi_{i+1}</math></b>	
19	295	175	53	203	81	194	292	156	194	180	83	175	185	298	
20	295	174	54	198	81	211	291	296	175	54	84	212	273	202	
21	295	175	54	200	85	220	267	300	175	53	93	218	245	213	
22	74	185	59	225	150	265	295	290	196	55	110	235	204	212	
23	295	190	60	240	148	255	285	290	200	60	110	236	205	194	
24	155	196	177	184	83	223	288	300	173	50	83	211	284	201	
25	56	181	292	191	92	206	297	286	179	55	81	213	289	198	
26	169	168	54	195	83	219	291	296	171	55	87	218	277	208	
27	67	163	52	189	84	217	290	294	178	53	89	219	269	204	
28	297	225	286	208	90	206	299	288	183	57	83	218	252	201	
29	69	176	185	190	83	224	289	183	176	56	92	212	284	205	
30	289	153	182	197	81	223	285	176	175	54	90	217	260	213	
31	289	175	51	210	80	218	282	278	113	175	104	221	229	202	
32	301	167	50	224	84	212	280	297	221	295	138	240	236	233	

Tabelle I-2: Theoretische Werte für  $\Gamma_{(C3',H3'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$ ,  $\Gamma_{(C4',H4'),P_i}^{DD,CSA}$ ,  $\Gamma_{(C4',H4'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$ ,  $\Gamma_{(C5',H5',proR),P_i}^{DD,CSA}$  und  $\Gamma_{(C5',H5',proS),P_i}^{DD,CSA}$  gerechnet für das erste Nukleotid in 32 RNA-Konformationsklassen.

RNA Klasse	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\chi$	$\delta$	$\epsilon$	$\zeta$	$\Gamma_{(C5',H5',proR),P_i}^{DD,CSA}$	$\Gamma_{(C5',H5',proS),P_i}^{DD,CSA}$	$\Gamma_{(C4',H4'),P_i}^{DD,CSA}$	$\Gamma_{(C3',H3'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$	$\Gamma_{(C4',H4'),P_{i+1}}^{DD,CSA}$
1	295	168	53	208	82	208	53	-8,95	13,9	-12,5	14	3,5
2	295	171	53	203	81	194	292	-9,96	14	-12,6	-11	-19,9
3	295	178	53	206	86	226	206	-11,9	13,7	-12,8	5	1,5
4	-301	190	-54	232	148	270	84	14	-11	-10,55	-8,5	10
5	-301	178	54	256	149	222	152	13	-13,4	-10	-3,6	9,5
6	301	178	54	256	149	222	152	-14	13,9	-11	-3,6	9,5
7	275	96	156	257	149	195	150	16,6	-8,7	10	-15	9,2
8	-301	181	51	232	148	270	83	13	-13	-9	-8,8	9,6
9	-301	181	294	56	148	237	83	13	-13	-16,6	-4,4	-0,8
10	295	186	53	198	81	237	65	-13	12,7	-12,9	0,4	-17,7
11	-295	167	53	212	84	221	137	11,5	-11,9	-11,2	-6,9	-8,55
12	95	170	53	214	81	222	160	4	0	-15	-1,6	0,4
13	-95	170	53	214	81	222	160	4,95	2,18	-12	-1,6	0,4
14	-295	171	53	207	85	256	253	12	-11	-11	-6	-19
15	295	181	53	198	81	225	211	-12	13,4	-12,9	4,9	1,22
17	-301	192	54	243	148	256	245	14,7	-10,5	-10,3	-6,9	-7,4
18	295	178	53	202	85	256	261	-11	13	-12,8	6,3	-18
19	295	175	53	203	81	194	292	-11	13,9	-12,75	-11	-19
20	295	174	54	198	81	211	291	-10,9	13,9	-12,75	-9	-17,6
21	295	175	54	200	85	220	267	-10,9	13,9	-12,75	-5,4	-18
22	74	185	59	225	150	265	295	11,56	-4,8	-15,2	9,5	5,26
23	295	190	60	240	148	255	285	-13,6	12	-10,6	2,8	2,9
24	155	196	177	184	83	223	288	-13,7	-7,4	-15,5	-6,2	-7,9
25	56	181	292	191	92	206	297	13	-14	-18,4	-10,5	-17,3
26	169	168	54	195	83	219	291	-20	-5,45	13,8	-7,16	-15,9
27	67	163	52	189	84	217	290	10,8	-11,3	-11,2	-7,7	-16,75
28	297	225	286	208	90	206	299	-6,5	2,5	5,9	-10,64	-16,9
29	69	176	185	190	83	224	289	12,6	-9,5	9	-5,9	-15
30	289	153	182	197	81	223	285	0,7	9,6	-2,5	-6,4	-16,5
31	289	175	51	210	80	218	282	-8,1	12	-13,9	-7,3	-17,4
32	301	167	50	224	84	212	280	-11	14	-11,7	-7,6	-18,8

## 6.2 Anhang II: Pulssequenzen(HNN-COSY) / NOE-Intensitäten

HNN-COSY mit COSY-Rücktransfer

```
;na_hnncosygpplhwg
;avance-version (07/04/04)
;2D H-1/N-15 correlation via double inept transfer
;for direct observation of hydrogen bonds in
nucleic acid
; base pairs by internucleotide 2J(N,N) couplings
;
```

```
; F1(H) -> F3(N1) -> F3(N2,t1) -> F3(N1) ->
F1(H,t2)
;
;phase sensitive
;with decoupling during acquisition
;(use parameterset NA_HNNCOSYGPPLHWG)
;A , J , Dingley & S , Grzesiek, J , Am , Chem , Soc ,
120,
```

```

; 8293 - 8297 (1998)
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
prosol relations=<triple_na>
#include <Avance ,incl>
#include <Grad ,incl>
#include <Delay ,incl>
"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"d11=30m"
"d13=4u"
"d0=3u"
"inf0=inf1/2"
"DELTA=d0*2+p4"
"DELTA1=d23-p22/2-d16-p16"
"DELTA2=d26-p16-d16-p11-12u"

1 ze
d11 pl16:f3
2 d11 do:f3
3 d1 pl1:f1 pl3:f3
d12 fq=cnst21(bf ppm):f3
; imino 153 ppm
(p1 ph1)
d26 pl3:f3
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 )
d26 UNBLKGRAD
(p1 ph2)
d13
p16:gp1
d16 fq=cnst22(bf ppm):f3
;middle 183ppm
(p21 ph3):f3
DELTA1
p16:gp5
d16
(p22 ph4):f3 ; 1st 15NN-Cosy p22 mit
gradient
DELTA1
p16:gp5
d16
(p21 ph6):f3
d0
(center (p2 ph1):f1 (p4 ph1):f2) ; 13C-
Entkopplung
d0
(p22 ph1):f3
DELTA
(p21 ph2):f3
DELTA1
p16:gp5
d16
(p22 ph1):f3 ; 2nd 15NN-Cosy p22
mit gradient
DELTA1
p16:gp5
d16
(p21 ph5):f3
d13
d12 fq=cnst21(bf ppm):f3 ;imino
p16:gp2
d16 pl0:f1
(p11:sp1 ph7:r):f1
4u

4u pl1:f1
(p1 ph1)
4u
p16:gp3
d16
DELTA2 pl0:f1
(p11:sp1 ph7:r):f1
4u
4u pl1:f1
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3 ) ;
4u pl0:f1
(p11:sp1 ph7:r):f1
4u
p16:gp3
d16
DELTA2 pl16:f3
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd3:f3
d11 do:f3 mc #0 to 2
F1PH(ip3 & ip4 & ip6, id0)
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0
ph5=0 0 2 2
ph6=1 1 1 1 3 3 3 3
ph7=2
ph31=0 2 2 0

;p0 : 120dB
;p1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p3 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p16: f3 channel - power level for CPD/BB
decoupling
;sp1: f1 channel - shaped pulse 90 degree
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p11: f1 channel - 90 degree shaped pulse
[1 ms]
;p16: homospoil/gradient pulse
[1 ms]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;d0 : incremented delay (2D)
[3 us]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 ms]
;d13: short delay [4 us]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d23: 1/(4J(NN)) [15
ms]
;d26: 1/(4J(HN)) (J(HN) = 93Hz)
[2 ,5 ms]
; for correlation of H2 with N in Adenin 12 ,5ms

;inf1: 1/SW(N) = 2 * DW(N)
;inf0: 1/(2 * SW(N)) = DW(N)
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: >= 32
;td1: number of experiments in F1
;FnMODE: States-TPPI (or TPPI)
;cpd3: decoupling according to sequence defined
by cpdprg3

```

;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

#### Pulssequenz: HNN-COSY mit TROSY-Rücktransfer

```
;hnnco2 ,In ,ric aus hnnco2 ,In und
na_trhnnco2gpphspwg
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
;prosol relations=<triple_na>
#include <Avance ,incl>
#include <Grad ,incl>
#include <Delay ,incl>
;***** PULSES *****
;p1 high-power proton 90 degree pulse at p1
;p11 ~1 ,5 ms proton 90 at p2 (water flip-back
pulse), need to set phcor9, ;phcor14, phcor15 and
phcor18
;p21 high-power nitrogen 90 degree pulse at p3
;p3 high-power carbon 90 pulse at p2
;***** GRADIENT PULSES *****
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"
"p10=2 ,5m" ;G1 gradient pulse length
"p15=2 ,1m" ;G2 gradient pulse length
"p16=2m" ;G3 gradient pulse length
"p13=2m" ;G4 gradient pulse length
"p18=200u" ;G5 gradient pulse length
"p12=400u" ;G6 gradient pulse length
"p14=4m*0 ,101322" ;G7 gradient pulse length
;***** NITROGEN CHEMICAL SHIFT EVOLUTION
PERIOD *****
"in0=inf1/2"
"d0=in0/2-p21*0 ,637-p4/2" ;Sampling is
delayed by 0 ,5*dw to reduce baseline ;offset
;in15=1/(2sw) ;Increment 15 is equal to 1/15N
sweep width in Hz
;***** DELAYS *****
"d4=2 ,25m" ;INEPT transfer delay
(delta)
"d11=30m" ;Delay for disk I/O
"d12=20u" ;Delay for disk I/O
;2*d27 is the total length (2*delta) of 15N-15N
COSY period
;d16 defines first COSY period, whereas d17 and
d28 define second period
"d16=d27-10u-p15"
"d17=d27-10u-p16"
"d28=d27-64u-p13-p11"
;d24 defines epsilon delays in first reverse INEPT
"d24=2 ,7m-p18"
;Delays d5, d6, d7, d8 define gamma delays in
second reverse INEPT
"d5=2 ,7m-p12"
"d6=600u"
"d7=d6-p14"
"TAU=d0+d0+p4"
;***** Start of pulse sequence *****
1 ze
```

```
2 d1
3 d12 pl1:f1 pl2:f2 pl3:f3
50u UNBLKGRAD
d1 ;Recycle delay,
usually set between 1 to 1 ,5 seconds
;***** INEPT (time points a to b)*****
(p1 ph0):f1 ;First 90 degree
pulse on proton
d4 ;INEPT transfer
delay (delta)
(center (p22 ph10):f3 (p2 ph4):f1)
d4 ;INEPT transfer
delay (delta)
(p1 ph6):f1
2u
10u pl0:f1
(p11:sp1 ph18:r):f1 ;Low-power
water flip-back pulse
2u
p10:gp0 ;G1 gradient pulse
2 ,5m pl1:f1
;***** 15N-15N COSY transfer period (time
points b to c) *****
(p21 ph3):f3 ;First 90 degree
pulse on nitrogen
10u
p15:gp1 ;G2 gradient pulse
d16 ;First period in
first COSY transfer period
(p22 ph21):f3
10u
p15:gp1 ;G2 gradient pulse
d16 ;Second period
in first COSY transfer period
;***** 15N Chemical shift evolution period
(t1)(time points d to e) *****
(p21 ph22):f3
d0 ;t1 evolution
period
(p4 ph20):f2
d0
;(p22 ph0):f3
;TAU
;***** Second 15N-15N COSY interval (time
points e to f) *****
(p21 ph23):f3
10u
p16:gp3 ;G3 gradient pulse
d17 ;First period in
second COSY transfer period
(p22 ph24):f3
10u
p13:gp4 ;G4 gradient pulse with
coherence selection
d28 pl0:f1 ;Second period in
second COSY transfer period
;***** TROSY part of the pulse sequence (time
points f to g) *****
;***** First reverse INEPT *****
```

```

      (p11:sp1 ph9:r):f1      ;Low-power
water flip-back pulse      ph4=1
      4u                    ph5=3
      50u p1:f1             ph6=3
      (p1 ph8):f1          ph7=3
      4u                    ph8=1
      p18:gp2              ;G5 gradient pulse
      d24                  ;Epsilon delay
period                      ph9=2
      (center (p22 ph10):f3 (p2 ph0):f1)
      4u                    ph10=0
      p18:gp2              ;G5 gradient pulse
      d24                  ;Epsilon delay period
      (center (p21 ph7):f3 (p1 ph16):f1)
;***** Second reverse INEPT *****
      4u                    ph13=0
      p12:gp0              ;G6 gradient pulse
      d5                   ;Gamma(a) delay period
      (center (p22 ph10):f3 (p2 ph0):f1)
      4u                    ph14=2
      p12:gp0              ;G6 gradient pulse
      d5                   ;Gamma(a) delay period
      (p21 ph17):f3
      d6                    ph15=0
      4u                    ph16=2
      93u                   ph17=0
      (p2 ph0):f1          ph18=2
      4u                    ph20=0
      p14:gp4              ;G7 gradient pulse with
coherence selection        ph21=0
      d7                   ;Gamma(d)
delay period               ph22=1 2 3 0 3 0 1 2
;***** t2 period *****
      4u BLKGRAD           ph23=3 0 1 2 3 0 1 2
      go=2 ph31            1 2 3 0 1 2 3 0
      d1 mc #0 to 2 F1PH(ip3 & ip22, id0 & ip31 & ip31)
exit                       ph24=0
                               ph31=0 3 2 1
                               ;for z-only gradients:
                               ;gpz0: 50%
                               ;gpz1: -50%
                               ;gpz2: 50%
                               ;gpz3: 50%
                               ;gpz4: -50%
                               ;use gradient files:
                               ;gpnam0: SINE ,20
                               ;gpnam1: SINE ,20
                               ;gpnam2: SINE ,20
                               ;gpnam3: SINE ,20
                               ;gpnam4: SINE ,20
                               ;Processing
                               ;PHC0(F2): 90
                               ;PHC1(F2): -180
                               ;FCOR(F2): 1
ph0=0
ph1=0
ph3=0 1 2 3

```

Tabelle 6.2.1: NOE-Intensitäten bei einer Mischzeit von 50 ms und einer Temperatur von 278 K.

Zuordnung		$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Intensität	Zuordnung		$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Intensität
Atom-1	Atom-2				Atom-1	Atom-2			
G1H1	G1H1	13,02	13,02	269678	U7H6	U7H6	8,04	8,04	49313680
G1H1'	G1H1'	5,86	5,86	68535440	C8H1'	C8H1'	5,97	5,97	61449332
G1H1'	G1H4'	5,86	4,61	395071	C8H1'	C8H2'	6,00	4,14	773176
G1H1'	G1H8	5,86	8,20	194507	C8H1'	C8H4'	6,00	3,83	363520
G1H1'	G2H8	5,86	7,72	453391	C8H1'	C8H6	5,99	7,73	361426
G1H3'	G1H8	4,46	8,20	139794	C8H1'	G9H1	6,00	9,97	186116
G1H3'	G2H8	4,47	7,71	1835730	C8H2'	C8H5	4,14	6,14	310522
G1H5'2	G1H8	4,33	8,21	480220	C8H2'	C8H6	4,14	7,73	2706127
G1H8	G1H8	8,20	8,20	31976348	C8H4'	C8H1'	3,84	6,00	612969
G2H1	G2H1	13,43	13,43	25346772	C8H4'	C8H3'	3,84	4,51	849950
G2H1'	G2H2'	5,97	4,59	1147037	C8H4'	C8H4'	3,84	3,83	46300604
G2H1'	G2HO2'	5,97	6,97	495163	C8H4'	C8H5'1	3,84	2,69	628977
G2H2'	G2H1'	4,59	5,97	1966913	C8H4'	G9H5'2	3,84	4,45	1380023
G2H2'	G2H2'	4,59	4,58	1,48E+08	C8H41	C8H41	6,44	6,44	26308686
G2H2'	G2HO2'	4,58	6,97	2402766	C8H41	C8H42	6,44	7,18	7989606
G2H3'	G2H8	4,65	7,72	1255847	C8H42	C8H42	7,18	7,18	33392136
G2H5'1	G2H8	4,57	7,72	3197298	C8H5	U6H2'	6,14	3,80	1279195
G2H8	G2H8	7,72	7,72	89255120	C8H5	U6H3'	6,14	4,57	327804
C3H1'	C3H6	5,57	7,79	210913	C8H5	C8H42	6,14	7,18	1747915
C3H1'	C3HO2'	5,57	6,75	374456	C8H5	C8H6	6,14	7,73	1581737
C3H2'	C3HO2'	4,58	6,75	1033866	C8H5'1	C8H4'	2,70	3,83	1669789
C3H3'	C3HO2'	4,49	6,75	341010	C8H5'1	C8H5'1	2,70	2,69	9152415
C3H41	C3H41	7,06	7,05	31139936	C8H5'1	C8H5'2	2,70	3,63	3387539
C3H41	C3H42	7,06	8,69	8071553	C8H5'1	C8H6	2,70	7,73	265966
C3H41	G12H1	7,05	12,67	317224	C8H5'2	C8H3'	3,64	4,51	1132351
C3H42	G2H1	8,69	13,43	1158530	C8H5'2	C8H4'	3,63	3,84	2187424
C3H42	C3H42	8,69	8,69	43838252	C8H5'2	C8H5'1	3,64	2,69	3045066
C3H42	G12H1	8,69	12,67	1406690	C8H5'2	C8H5'2	3,64	3,63	14844581
C3H5	C3H41	5,35	7,05	1809246	C8H5'2	C8H6	3,64	7,73	150285
C3H5	C3H42	5,34	8,69	304590	C8H6	C8H6	7,74	7,73	69386592
C3H5	C3H5	5,35	5,34	25561042	C8H6	G9H1	7,74	9,98	108683
C3H5	C3H6	5,34	7,79	1637604	G9H1	U6H1'	9,98	5,69	235290
A4H1'	A4H8	6,02	8,11	238997	G9H1	U6HO2'	9,97	6,80	500545
A4H1'	A4HO2'	6,01	6,89	637982	G9H1	G9H1	9,97	9,97	44650104
A4H2	A4H2	7,44	7,44	40852552	G9H1'	G9H1'	6,01	6,01	144363984
A4H2	U11H3	7,44	13,83	975100	G9H1'	G9H4'	6,01	4,45	379121
A4H2'	A4H2'	4,65	4,65	62214736	G9H1'	G9H8	6,02	7,91	3520075
A4H3'	A4H3'	4,68	4,68	73903768	G9H2'	G9H1'	4,86	6,01	1663943
A4H3'	A4H8	4,69	8,11	1489123	G9H2'	G9H3'	4,86	5,71	2195673
A4H3'	A4HO2'	4,68	6,89	1171892	G9H3'	G9H3'	5,71	5,71	50183764
A4H3'	C5H6	4,68	7,31	2884314	G9H3'	G9H5'1	5,71	4,22	497490
A4H5'2	A4H8	4,19	8,11	542927	G9H3'	G9H5'2	5,71	4,46	2126679
A4H61	A4H61	6,48	6,48	2467179	G9H3'	G10H8	5,71	8,38	419270
A4H61	A4H62	6,48	8,35	1631397	G9H4'	G9H4'	4,46	4,45	154051184
A4H61	U11H3	6,48	13,83	326571	G9H4'	G9H8	4,46	7,91	156369
A4H62	U11H3	8,36	13,83	385715	G9H4'	G9H1'	4,46	6,01	909741
A4H8	A4H8	8,11	8,11	49646064	G9H8	G9H8	7,91	7,91	49982744

Fortsetzung der Tabelle 6.2.1									
Zuordnung		$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Intensität	Zuordnung		$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Intensität
Atom-1	Atom-2				Atom-1	Atom-2			
C5H1'	A4H1'	5,36	6,02	405877	G10H1	G10H1	13,54	13,54	31079192
C5H1'	A4H2	5,37	7,44	362593	G10H2'	G10HO2'	4,47	6,89	1381239
C5H1'	C5H1'	5,37	5,37	38068064	G10H21	G10H1	6,69	13,54	631221
C5H1'	C5H2'	5,37	4,39	475787	G10H21	G10H21	6,69	6,69	2965883
C5H1'	C5H6	5,37	7,31	181310	G10H21	G10H22	6,69	8,79	2401168
C5H2'	C5H6	4,40	7,31	228282	G10H22	G10H1	8,80	13,54	1070628
C5H2'	C5HO2'	4,39	7,06	1206298	G10H22	G10H22	8,80	8,80	2650572
C5H3'	C5H3'	4,18	4,18	1,16E+08	G10H3'	G10H3'	4,31	4,30	83533864
C5H3'	C5H6	4,18	7,31	1649386	G10H3'	G10H8	4,31	8,38	1030313
C5H3'	U6H6	4,17	7,78	1154544	G10H3'	U11H6	4,31	7,85	630115
C5H41	C5H41	7,20	7,20	35099008	G10H4'	G10H8	4,43	8,38	541969
C5H41	C5H42	7,20	8,60	7420169	G10H5'2	G10H5'2	4,54	4,54	120232208
C5H41	G10H1	7,20	13,54	257081	G10H5'2	G10H8	4,55	8,38	2414522
C5H42	C5H42	8,60	8,60	26215320	G10H5'2	G10HO2'	4,55	6,89	583609
C5H42	G10H1	8,60	13,54	1200838	G10H8	G10H8	8,38	8,38	46400152
C5H5	C5H41	5,26	7,20	1481592	U11H1'	U11H3	5,58	13,83	72163
C5H5	C5H42	5,25	8,60	350839	U11H1'	U11H6	5,58	7,85	193935
C5H5	C5H5	5,26	5,26	10453563	U11H1'	U11HO2'	5,58	6,94	232807
C5H5	C5H6	5,26	7,31	1651116	U11H2'	U11H1'	4,73	5,58	1538484
C5H5'1	C5H6	4,48	7,31	384749	U11H2'	U11HO2'	4,73	6,94	755961
C5H5'2	C5H6	4,06	7,31	613171	U11H2'	G12H8	4,73	7,82	3059967
C5H6	C5H6	7,32	7,31	38264324	U11H3	U11H3	13,83	13,83	23057120
U6H1'	U6H1'	5,70	5,69	1,05E+08	U11H3'	U11H6	4,62	7,85	1662759
U6H1'	U6H2'	5,69	3,80	1137081	U11H5	U11H6	5,17	7,85	955308
U6H1'	U6HO2'	5,69	6,80	2016290	U11H5'2	U11H5'2	4,09	4,09	54701972
U6H1'	G9H1	5,69	9,97	516880	U11H5'2	U11H6	4,09	7,85	249882
U6H1'	G10H1	5,69	13,54	176209	U11H5'1	U11H5'1	4,53	4,52	119616280
U6H1'	G10H22	5,69	8,79	195853	U11H6	U11H3	7,84	13,83	71422
U6H2'	U6H2'	3,79	3,79	3,51E+08	U11H6	U11H6	7,85	7,85	42128168
U6H2'	U6H3'	3,80	4,57	948022	G12H1	G12H1	12,67	12,67	31097096
U6H2'	U6H6	3,80	7,78	256870	G12H1'	A4H2	5,88	7,44	264806
U6H2'	U6HO2'	3,80	6,80	3088368	G12H1'	G12H1'	5,88	5,88	116582848
U6H2'	U7H6	3,80	8,04	136689	G12H1'	G12H8	5,88	7,82	221320
U6H2'	C8H42	3,80	7,18	455294	G12H1'	G12HO2'	5,88	6,96	811237
U6H2'	C8H5	3,80	6,14	1166065	G12H21	G12H1	8,14	12,67	219628
U6H2'	C8H6	3,81	7,73	202544	G12H22	G12H1	6,01	12,67	269402
U6H2'	G9H1	3,80	9,97	330233	G12H5'2	G12H8	4,17	7,82	560535
U6H3	U6H3	11,87	11,87	845633	G12H8	G12H8	7,82	7,82	42514864
U6H3'	U6HO2'	4,58	6,80	257528	C13H1'	C13H1'	5,52	5,52	55506708
U6H3'	C8H41	4,58	6,44	409176	C13H1'	C13H2'	5,52	4,30	1074987
U6H3'	C8H42	4,58	7,18	1037396	C13H1'	C13HO2'	5,52	6,85	589074
U6H3'	C8H5	4,57	6,14	199647	C13H2'	C13HO2'	4,30	6,85	1294055
U6H4'	U6H4'	4,39	4,39	64307660	C13H2'	C14H6	4,30	7,70	2503391
C5H2'	U6H6	4,39	7,78	2086974	C13H41	G2H1	7,09	13,42	249005
U6H4'	U6HO2'	4,39	6,80	384038	C13H41	C13H41	7,09	7,09	24304912
U6H4'	U7H5	4,39	5,89	911104	C13H42	C13H42	8,65	8,65	5921973
U6H5	C5H6	5,70	7,32	161439	C13H5	C13H41	5,31	7,09	1292393
U6H5	U6H6	5,70	7,78	2541031	C13H5	C13H5	5,31	5,30	18353628
U6H5'1	C5HO2'	4,53	7,06	392010	C13H5	C13H6	5,30	7,72	1632519



Fortsetzung der Tabelle 6.2.1									
Zuordnung		$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Intensität	Zuordnung		$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Intensität
Atom-1	Atom-2				Atom-1	Atom-2			
U6H6	U6H6	7,78	7,78	72864456	C14H1'	C14H1'	5,77	5,77	65587312
U6HO2'	U6H2'	6,80	3,80	2569507	C14H1'	C14H2'	5,77	4,04	1116993
U6HO2'	U7H6	6,80	8,04	265433	C14H1'	C14H4'	5,78	4,18	380775
U6HO2'	G9H1	6,80	9,97	608094	C14H1'	C14H6	5,77	7,70	271858
U7H1'	U7H1'	6,15	6,15	79474896	C14H2'	C14H2'	4,04	4,04	119080120
U7H1'	U7H2'	6,15	4,70	638206	C14H2'	C14H6	4,04	7,70	868552
U7H1'	U7H4'	6,15	4,52	563027	C14H3'	C14H3'	4,21	4,21	53310328
C8H5	U7H5'2	6,14	4,04	1134677	C14H3'	C14H6	4,21	7,70	1731949
C8H5	U7H5'1	6,14	4,27	245990	C14H41	G1H1	7,15	13,03	52141
U7H1'	U7H6	6,15	8,04	327003	C14H41	C14H41	7,16	7,16	23633464
U7H2'	U6HO2'	4,70	6,80	1357077	C14H41	C14H42	7,16	8,50	6575798
U7H2'	U7H1'	4,71	6,15	570101	C14H42	G1H1	8,50	13,02	83140
U7H2'	U7H6	4,70	8,04	3136709	C14H42	C14H42	8,50	8,50	21024216
U7H3'	U7H6	4,38	8,04	225311	C14H5	C14H41	5,58	7,16	1335346
U7H4'	U7H1'	4,52	6,15	611008	C14H5	C14H42	5,58	8,50	316958
U7H5	U6H4'	5,89	4,38	343910	C14H5	C14H5	5,58	5,58	133965448
U7H5	U7H5	5,89	5,89	95332216	C14H5	C14H6	5,58	7,70	1915769
U7H5	U7H6	5,89	8,04	2487917	C14H5'1	C13HO2'	4,52	6,85	488896
U7H5'2	C8H5	4,06	6,14	1708871	C14H6	C14H6	7,70	7,70	54708416
U7H5'1	U7H6	4,28	8,04	218710					
U7H5'1	C8H5	4,28	6,14	527380					
U7H6	U6HO2'	8,04	6,80	273855					

Tabelle 6.2.2: NOE-Intensitäten bei einer Mischzeit von 250 ms und einer Temperatur von 278 K.

Zuordnung		$\delta^1\text{H}$	$\delta^1\text{H}$	Intensität	Zuordnung		$\delta^1\text{H}$	$\delta^1\text{H}$	Intensität	Zuordnung		$\delta^1\text{H}$	$\delta^1\text{H}$	Intensität
Atom-1	Atom-2	(ppm)	(ppm)		Atom-1	Atom-2	(ppm)	(ppm)		Atom-1	Atom-2	(ppm)	(ppm)	
G1H1'	G1H1'	5,86	5,86	55797640	U6H2'	C8H6	3,81	7,73	474797	G9H2'	G9H1'	4,86	6,01	3221425
G1H1'	G1H4'	5,86	4,61	1119220	U6H2'	G9H1	3,80	9,97	933823	G9H2'	G9H3'	4,86	5,71	3622378
G1H1'	G1H8	5,86	8,19	405660	U6H3'	U6H1'	4,57	5,69	804885	G9H2'	G9H8	4,86	7,91	586081
G1H1'	G2H8	5,87	7,72	1345382	U6H3'	U6H3'	4,57	4,57	7,8E+07	G9H2'	G10H8	4,86	8,38	261044
G1H2'	G1H8	5,00	8,19	768325	U6H3'	U6HO2'	4,58	6,80	609196	G9H3'	G9H1'	5,71	6,02	579174
G1H3'	G1H8	4,46	8,21	480540	U6H3'	C8H41	4,58	6,44	971628	G9H3'	G9H2'	5,71	4,85	814777
G1H3'	G2H8	4,47	7,72	3844459	U6H3'	C8H42	4,58	7,18	1937201	G9H3'	G9H5'1	5,71	4,23	1595781
G1H5'2	G1H8	4,33	8,20	1117459	U6H3'	C8H5	4,58	6,14	512636	G9H3'	G9H5'2	5,71	4,46	4188513
G1H8	G1H8	8,18	8,18	14028593	U6H4'	U6H1'	4,39	5,69	2234906	G9H3'	G9H8	5,71	7,91	127871
G2H1	G2H1	13,43	13,43	19459200	U6H4'	U6H4'	4,39	4,39	4,3E+07	G9H3'	G10H8	5,71	8,38	981415
G2H1	C3H41	13,45	7,06	177125	C5H2'	U6H6	4,40	7,78	4453383	G9H4'	G9H4'	4,46	4,45	113743664
G2H1	C13H41	13,43	7,09	787364	U6H4'	U6HO2'	4,39	6,80	563380	G9H4'	G9H8	4,45	7,91	335401
G2H1'	G2H1'	5,97	5,97	50514680	U6H4'	U7H5	4,39	5,89	1493821	G9H4'	G9H1'	4,46	6,01	1968901
G2H1'	G2H2'	5,97	4,59	3063685	?	?	4,39	7,18	272289	G9H8	G9H8	7,91	7,91	43187660
G2H1'	G2H8	5,97	7,72	515465	U6H5	C5H3'	5,70	4,18	846579	G10H1	C5H41	13,54	7,20	848495
G2H1'	G2HO2'	5,97	6,97	547108	U6H5	C5H41	5,70	7,19	343414	G10H1	G10H1	13,54	13,54	23566560
G2H1'	C3H6	5,97	7,79	447657	U6H5	C5H42	5,70	8,60	169463	G10H1	G10H21	13,54	6,69	721711
G2H2'	G2H1'	4,60	5,97	4330062	U6H5	C5H6	5,70	7,31	389935	G10H1	G10H22	13,54	8,80	760217
G2H2'	G2H2'	4,60	4,59	1,03E+08	U6H5	U6H3'	5,70	4,57	964590	G10H1	U11H3	13,54	13,83	331616
G2H2'	G2HO2'	4,58	6,97	2058660	U6H5	U6H5	5,71	5,70	6,2E+07	G10H2'	G10H2'	4,47	4,47	77436008
G2H3'	G2H8	4,66	7,72	3173553	U6H5	U6H6	5,70	7,78	5624623	G10H2'	G10HO2'	4,47	6,89	1132570
G2H4'	G2H4'	4,61	4,60	1,07E+08	U6H5	C8H41	5,70	6,44	343371	G10H21	G10H1	6,69	13,54	1889157
G2H5'1	G2H8	4,58	7,72	6761558	U6H5'1	C5HO2'	4,53	7,06	356611	G10H21	G10H21	6,69	6,69	2325312
G2H8	G2H8	7,72	7,72	61378068	U6H5'1	U6HO2'	4,53	6,80	277263	G10H21	G10H22	6,70	8,80	2028242
G2HO2'	C3H6	6,98	7,79	284008	U6H5'2	C5HO2'	4,11	7,06	292124	G10H21	U11H3	6,70	13,83	127876
C3H1'	C3H6	5,57	7,79	694909	U6H6	U6H6	7,79	7,78	5,1E+07	G10H22	G10H1	8,80	13,54	2071094
C3H1'	C3HO2'	5,57	6,75	556756	U6HO2'	U6H6	6,80	7,78	118686	G10H22	G10H22	8,81	8,80	1869631
C3H2'	C3HO2'	4,59	6,75	760270	U6HO2'	U7H6	6,80	8,04	814582	G10H3'	G10H3'	4,31	4,30	55854092
C3H3'	C3HO2'	4,50	6,75	194219	U6HO2'	C8H5	6,80	6,14	328397	G10H3'	G10H8	4,31	8,38	3494275
C3H4'	C3H1'	4,49	5,57	1773152	U6HO2'	C8H6	6,80	7,73	151326	G10H3'	U11H6	4,31	7,85	1543691
C3H41	C3H41	7,06	7,05	16193864	U6HO2'	G9H1	6,80	9,97	1350299	G10H4'	G10H4'	4,42	4,42	76157624
C3H41	C3H42	7,07	8,69	11875017	U7H1'	U6HO2'	6,15	6,80	453656	G10H4'	G10H8	4,43	8,38	1648794
C3H41	G12H1	7,06	12,67	1187699	U7H1'	U7H1'	6,15	6,15	6,2E+07	G10H5'2	G10H5'2	4,54	4,54	84120280
C3H42	G2H1	8,69	13,43	2443832	U7H1'	U7H2'	6,16	4,70	884385	G10H5'2	G10H8	4,55	8,38	4670701
C3H42	C3H42	8,69	8,69	30329766	U7H1'	U7H4'	6,15	4,52	1438362	G10H5'2	G10HO2'	4,54	6,89	404651
C3H42	G12H1	8,70	12,67	2914913	C8H5	U7H5'2	6,15	4,05	2490162	G10H8	G9H1	8,38	9,98	178685
C3H5	C3H41	5,35	7,05	3581337	C8H5	U7H5'1	6,14	4,27	670707	G10H8	G10H8	8,39	8,38	36548220
C3H5	C3H42	5,34	8,69	1633524	U7H1'	U7H6	6,16	8,04	991628	G10HO2'	U11H6	6,90	7,85	22909
C3H5	C3H5	5,35	5,35	19561184	U7H2'	U6HO2'	4,70	6,80	2669224	U11H1'	G10H1	5,58	13,54	245303
C3H5	C3H6	5,35	7,79	4094275	U7H2'	U7H1'	4,71	6,15	1617432	U11H1'	G10H21	5,58	6,69	320688
C3H5'2	C3H5'2	4,08	4,08	33776888	U7H2'	U7H6	4,70	8,04	6239393	U11H1'	G10H22	5,58	8,79	302394
C3HO2'	A4H8	6,75	8,11	222930	U7H2'	G9H1	4,70	9,98	214373	U11H1'	U11H2'	5,59	4,73	1823838
A4H1'	A4H2	6,02	7,44	134279	U7H3'	U7H6	4,39	8,04	498322	U11H1'	U11H6	5,58	7,85	745468
A4H1'	A4H3'	6,02	4,68	2758107	U7H3'	C8H5	4,39	6,14	172659	U11H1'	U11HO2'	5,58	6,94	246685
A4H1'	A4H8	6,02	8,11	712744	U7H4'	U7H1'	4,52	6,15	1607712	U11H2'	U11H1'	4,73	5,58	3342485
A4H1'	A4HO2'	6,02	6,89	488539	U7H4'	U7H6	4,52	8,04	406771	U11H2'	U11HO2'	4,73	6,94	589276
A4H1'	C5H6	6,02	7,32	317715	U7H5	U6H4'	5,89	4,38	1005167	U11H2'	G12H1'	4,73	5,88	980317

Fortsetzung der Tabelle 6.2.2														
Zuordnung		$\delta^1\text{H}$	$\delta^1\text{H}$	Intensität	Zuordnung		$\delta^1\text{H}$	$\delta^1\text{H}$	Intensität	Zuordnung		$\delta^1\text{H}$	$\delta^1\text{H}$	Intensität
Atom-1	Atom-2	(ppm)	(ppm)		Atom-1	Atom-2	(ppm)	(ppm)		Atom-1	Atom-2	(ppm)	(ppm)	
A4H2	A4H2	7,45	7,44	35682836	U7H5	U6HO2'	5,89	6,80	144377	U11H2'	G12H8	4,73	7,82	6395486
A4H2	U11H3	7,45	13,83	2438137	U7H5	U7H2'	5,89	4,70	523547	U11H3	A4H2	13,83	7,44	1850774
A4H2'	A4H2'	4,66	4,65	44038404	U7H5	U7H6	5,89	8,04	5738048	U11H3	A4H61	13,83	6,48	235510
A4H3'	A4H3'	4,68	4,68	53643768	U7H5'2	C8H42	4,05	7,18	354722	U11H3	U11H3	13,83	13,83	19190694
A4H3'	A4H8	4,69	8,11	3653501	U7H5'2	C8H5	4,06	6,14	3401014	U11H3'	U11H6	4,62	7,85	3545411
A4H3'	A4HO2'	4,69	6,89	1150288	U7H5'1	U7H6	4,28	8,04	532285	U11H5	U11H6	5,17	7,85	2855067
A4H3'	C5H6	4,68	7,31	6367746	U7H5'1	C8H5	4,28	6,14	1327124	U11H5'2	U11H6	4,09	7,85	643303
A4H5'2	A4H8	4,19	8,11	1227739	U7H6	U6HO2'	8,04	6,80	866098	U11H5'1	U11H5'1	4,53	4,52	83558416
A4H61	C3H41	6,48	7,05	211442	U7H6	U7H6	8,04	8,04	3,7E+07	U11H6	U11H3	7,84	13,83	151266
A4H61	C3H42	6,48	8,69	352598	C8H1'	C8H1'	5,99	6,00	4,9E+07	U11H6	U11H6	7,85	7,85	29688846
A4H61	A4H61	6,49	6,48	1670604	C8H1'	C8H2'	6,00	4,14	1431468	U11HO2'	G12H8	6,95	7,82	242314
A4H61	A4H62	6,48	8,36	1439409	C8H1'	C8H4'	6,00	3,84	1005657	G12H1	G2H1	12,68	13,43	412817
A4H61	C5H42	6,48	8,60	301857	C8H1'	C8H6	5,99	7,73	772424	G12H1	C3H41	12,68	7,05	907074
A4H61	U11H3	6,48	13,83	861196	C8H1'	G9H1	6,00	9,97	441896	G12H1	G12H1	12,68	12,67	23920036
A4H62	C3H42	8,36	8,69	334865	C8H2'	C8H1'	4,15	6,00	1907266	G12H1'	A4H2	5,88	7,44	802059
A4H62	A4H62	8,35	8,36	3176355	C8H2'	C8H2'	4,15	4,14	3,8E+07	G12H1'	G12H1'	5,87	5,87	67402232
A4H62	C5H42	8,36	8,60	273776	C8H2'	C8H5	4,14	6,14	614179	G12H1'	G12H2'	5,88	4,65	729745
A4H62	U11H3	8,36	13,83	935543	C8H2'	C8H6	4,15	7,73	5387891	G12H1'	G12H8	5,88	7,82	626242
A4H8	A4H8	8,12	8,11	38486836	C8H4'	C8H1'	3,84	6,00	1201281	G12H1'	G12HO2'	5,88	6,97	1079527
A4HO2'	C5H6	6,89	7,32	206007	C8H4'	C8H2'	3,84	4,14	423837	G12H21	G12H1	8,13	12,67	526961
C5H1'	A4H1'	5,37	6,01	327155	C8H4'	C8H3'	3,84	4,51	2213137	G12H22	G12H1	6,00	12,67	638319
C5H1'	A4H2	5,37	7,44	1133465	C8H4'	C8H4'	3,84	3,83	3,2E+07	G12H5'2	G12H8	4,17	7,82	1138278
C5H1'	C5H1'	5,37	5,37	29695120	C8H4'	C8H5'1	3,84	2,69	1425025	G12H8	G12H8	7,82	7,82	31704606
C5H1'	C5H2'	5,37	4,39	2227362	C8H4'	G9H5'1	3,84	4,23	812676	G12HO2'	C13H6	6,96	7,72	394780
C5H1'	C5H3'	5,37	4,18	435937	C8H4'	G9H5'2	3,84	4,46	3154593	C13H1'	C13H1'	5,52	5,52	44671816
C5H1'	C5H4'	5,37	4,45	666535	C8H4'	G9H8	3,84	7,91	181879	C13H1'	C13H2'	5,52	4,30	2447937
C5H1'	C5H6	5,37	7,32	603504	C8H41	U6H2'	6,44	3,80	521033	C13H1'	C13H3'	5,52	4,43	821944
C5H2'	C5H6	4,40	7,31	548451	C8H41	U6H3'	6,44	4,58	840256	C13H1'	C13H6	5,52	7,71	861966
C5H2'	C5HO2'	4,40	7,06	926654	C8H41	U6H6	6,44	7,78	231037	C13H1'	C13HO2'	5,52	6,85	797285
C5H2'	G10H1	4,40	13,54	160358	C8H41	C8H41	6,44	6,44	1,6E+07	C13H2'	C13HO2'	4,31	6,85	1097166
C5H3'	C5H3'	4,18	4,18	79656272	C8H41	C8H42	6,44	7,18	1E+07	C13H2'	C14H6	4,31	7,70	4995315
C5H3'	C5H6	4,18	7,31	3427614	C8H41	C8H6	6,44	7,73	112253	C13H3'	C13HO2'	4,45	6,85	407680
C5H3'	C5HO2'	4,18	7,06	160963	C8H42	U6H6	7,18	7,78	193296	C13H41	G2H1	7,10	13,43	1020943
C5H3'	U6H6	4,18	7,78	2629030	C8H42	C8H42	7,18	7,18	2E+07	C13H41	C13H41	7,10	7,09	16081771
C5H41	C5H41	7,20	7,19	18686662	C8H42	C8H5	7,18	6,14	2659427	C13H41	C13H6	7,10	7,72	324462
C5H41	C5H42	7,20	8,60	11464664	C8H42	G9H1	7,18	9,98	84207	C13H42	C13H42	8,66	8,65	4296094
C5H41	G10H1	7,20	13,54	1054665	C8H5	U6H2'	6,14	3,80	2193355	C13H5	C13H41	5,31	7,09	3062629
C5H42	C5H42	8,60	8,60	18252676	C8H5	U6H3'	6,14	4,58	511280	C13H5	C13H5	5,31	5,31	13639499
C5H42	G10H1	8,58	13,54	1810061	C8H5	C8H2'	6,14	4,14	483032	C13H5	C13H6	5,31	7,72	3863821
C5H42	G10H22	8,61	8,78	156215	C8H5	C8H41	6,14	6,44	1491867	C13H5	C14H41	5,30	7,16	158189
C5H42	U11H3	8,60	13,83	160504	C8H5	C8H42	6,14	7,18	3308644	C13H5'2	G12HO2'	4,09	6,97	270621
C5H5	A4H8	5,26	8,12	315655	C8H5	C8H6	6,14	7,73	3504362	C13H5'1	C13H1'	4,58	5,52	739843
C5H5	C5H41	5,26	7,20	3681875	C8H5	G9H1	6,14	9,97	191115	C13H6	C13H5	7,72	5,31	1448386
C5H5	C5H42	5,26	8,60	1495818	C8H5'1	C8H2'	2,70	4,14	185324	C13HO2'	C14H6	6,86	7,70	281892
C5H5	C5H5	5,26	5,26	6063840	C8H5'1	C8H3'	2,70	4,51	1072512	C14H1'	C14H1'	5,77	5,77	55940372
C5H5	C5H6	5,26	7,31	4050218	C8H5'1	C8H4'	2,70	3,84	3983874	C14H1'	C14H2'	5,77	4,04	2973320
C5H5	U6H6	5,25	7,78	185202	C8H5'1	C8H5'1	2,70	2,69	5470942	C14H1'	C14H3'	5,78	4,21	766459
C5H5	G10H1	5,26	13,54	139668	C8H5'1	C8H5'2	2,70	3,63	4773578	C14H1'	C14H4'	5,77	4,18	1180811
C5H5'1	C5H6	4,48	7,31	909301	C8H5'1	C8H6	2,70	7,73	575748	C14H1'	C14H6	5,78	7,70	757207

Fortsetzung der Tabelle 6.2.2														
Zuordnung		$\delta^1\text{H}$	$\delta^1\text{H}$	Intensität	Zuordnung		$\delta^1\text{H}$	$\delta^1\text{H}$	Intensität	Zuordnung		$\delta^1\text{H}$	$\delta^1\text{H}$	Intensität
Atom-1	Atom-2	(ppm)	(ppm)		Atom-1	Atom-2	(ppm)	(ppm)		Atom-1	Atom-2	(ppm)	(ppm)	
C5H5'2	C5H6	4,06	7,31	1225959	C8H5'1	G9H5'2	2,69	4,46	275649	C14H2'	C14H1'	4,05	5,77	3052778
C5H6	A4H8	7,32	8,11	167588	C8H5'2	C8H2'	3,64	4,14	411891	C14H2'	C14H2'	4,05	4,04	83347312
C5H6	C5H6	7,32	7,31	26594780	C8H5'2	C8H3'	3,64	4,51	2295483	C14H2'	C14H6	4,05	7,70	2229655
C5H6	U6H6	7,32	7,78	261306	C8H5'2	C8H5'1	3,64	2,69	4399166	C14H3'	C14H6	4,21	7,70	3526928
C5HO2'	U6H6	7,06	7,78	427524	C8H5'2	C8H5'2	3,64	3,64	8791081	C14H41	G1H1	7,16	13,03	64595
U6H1'	U6H1'	5,69	5,69	71886720	C8H5'2	C8H6	3,64	7,73	484247	C14H41	C14H41	7,16	7,16	14263649
U6H1'	U6H2'	5,69	3,80	2172153	C8H5'2	G9H8	3,64	7,91	207689	C14H41	C14H42	7,16	8,50	9185745
U6H1'	U6HO2'	5,69	6,80	4245444	C8H6	C8H6	7,74	7,73	4,6E+07	C14H41	C14H6	7,15	7,70	260683
U6H1'	G9H1	5,69	9,97	1300812	C8H6	G9H1	7,74	9,97	278425	C14H42	G1H1	8,51	13,02	60822
U6H1'	G10H1	5,69	13,54	655423	G9H1	U6H1'	9,98	5,69	850627	C14H42	G2H1	8,51	13,43	235561
U6H1'	G10H21	5,69	6,69	355756	G9H1	U6HO2'	9,98	6,80	997080	C14H42	C14H42	8,51	8,50	13316558
U6H1'	G10H22	5,69	8,80	438344	G9H1	C8H1'	9,98	6,00	268253	C14H5	G2H1	5,58	13,43	317011
U6H2'	U6H1'	3,79	5,69	2835743	G9H1	G9H1	9,98	9,97	3,5E+07	C14H5	C13H2'	5,58	4,30	557161
U6H2'	U6H2'	3,80	3,79	3,01E+08	G9H1	G10H1	9,98	13,54	130530	C14H5	C13H41	5,57	7,09	235655
U6H2'	U6H3'	3,80	4,57	2423113	G9H1'	G9H1'	6,01	6,01	1,2E+08	C14H5	C14H41	5,58	7,16	2919137
U6H2'	U6H4'	3,80	4,38	771913	G9H1'	G9H2'	6,01	4,85	499336	C14H5	C14H42	5,58	8,50	1387016
U6H2'	U6H6	3,80	7,78	604322	G9H1'	G9H4'	6,01	4,46	1187031	C14H5	C14H5	5,58	5,58	107018904
U6H2'	U6HO2'	3,80	6,80	5611736	G9H1'	G9H5'1	6,01	4,22	256746	C14H5	C14H6	5,58	7,70	4323536
U6H2'	U7H6	3,80	8,04	332362	G9H1'	G9H8	6,02	7,91	8565784	C14H5'2	C13HO2'	4,05	6,85	353255
U6H2'	C8H41	3,80	6,44	545589						C14H5'1	C13HO2'	4,52	6,85	476322
U6H2'	C8H42	3,80	7,18	948849						C14H6	C14H6	7,70	7,70	38286944
U6H2'	C8H5	3,80	6,14	2280763										

### 6.3 Anhang III: DFT-Rechnungen

**Tabelle 6.3.1:** DFT-gerechnete  $^1J(\text{C}, \text{H})$ -Kopplungen für das Molekül Tetrahydrofuran (THF) mit Konformationen, die aus der Ribosekonformation der Reste 1-14 der 14mer Lösungsstruktur übernommen und auf das THF-Molekül übertragen wurden.

THF/Rest	$P_{\text{ss}}^1$ (°)	$P_{\text{oss}}^2$ (°)	$^1J(\text{C1}', \text{H1}')$ (Hz)	$^1J(\text{C2}', \text{H2}')$ (Hz)
1	4,87	3,229	145,28	131,91
2	0,69	1,385	145,33	131,92
3	25,16	24,726	144,44	132,1
4	8,74	9,616	145,1	132,02
5	14,14	14,29	144,92	132,09
6	19,31	19,58	144,65	132,07
7	157,15	162,2	140,53	127,07
8	159,06	156,9	140,15	127,24
9	32,65	33,442	143,77	132,09
10	2,34	-0,263	145,38	131,87
11	18,62	18,801	144,7	132,13
12	15,22	15,419	144,86	132,09
13	30,82	31,013	144,5	132,07
14	34,03	30,209	144,01	132,07

$P_{\text{ss}}^1$ : Zuckermodus aus der Lösungsstruktur,  $P_{\text{oss}}^2$ : Zuckermodus von THF nach der DFT-Geometrieoptimierung.

**Tabelle 6.3.2:** Experimentell gemessenen und DFT-gerechnete  $^1J(C, H)$ -Kopplungskonstanten für die Nukleotide der 14mer RNA. Rechnungen wurden mit dem Nukleotid-ähnlichem Model (siehe Kapitel 4) durchgeführt.

Rest	$^1J^a(C, H)$ (Hz)		$\theta_{avg}$ (°)	$^1J^b(C, H)$ (Hz)			Abweichung (Hz)	
	(C1',H1')	(C2',H2')		$^1J^b(C, H)$	$^1J^s(C, H)$	$^1J^b(C, H)$	$^1J^a - ^1J^s$	$^1J^a - ^1J^b$
				(C1',H1')	(C1',H1')	(C2',H2')	(C1',H1')	(C2',H2')
G1		163,7	100	173,4	176,4	160,8		2,9
G2	174,5		100	171,6	174,6	162,0	-0,1	
C3	178,9	158,0	100	175,9	178,9	161,3	0,0	-3,3
A4	174,7	161,9	100	170,2	173,2	161,5	1,5	0,4
C5	179,3	160,1	100	177,2	180,2	162,2	-0,9	-2,1
U6	178,5	157,7	-40	175,4	178,4	156,1	0,1	1,6
U7	167,1	148,1	160	165,4	168,4	147,9	-1,3	0,2
C8	169,3	148,1	150	165,7	168,7	147,1	0,6	1,0
G9	166,3	161,9	100	163,7	166,7	159,4	-0,4	2,5
G10	173,6	165,8	115	171,7	174,7	162,1	-1,1	3,7
U11	179,1	160,0	100	176,9	179,9	161,7	-0,8	-1,7
G12	174,7		100	170,8	173,8	161,4	0,9	
C13	178,5	162,5	100	178,1	181,1	161,9	-2,6	0,6
C14	174,7	155,9	-60	169,3	172,3	153,6	2,4	2,3

$^1J^a$ : experimentelle bestimmte Kopplungen,  $^1J^b$ : DFT-gerechnete Kopplungen,  $^1J^s$ : DFT-gerechnete Kopplungen mit der Korrektur von +3 Hz.  $\theta_{avg}$ : durchschnittliche Orientierung der 2'OH im Strukturbündel (20 Strukturen) der 14mer (2koc).

**Tabelle 6.3.3:** Zuckerkonformation der Riboseinheiten in der NMR-Lösungsstruktur und in Model-Molekülen nach der DFT-Geometrioptimierung.

Rest	NMR-Struktur		Optimierte Geometrie	
	P(°)	$\nu_{max}$ (°)	P(°)	$\nu_{max}$ (°)
G1	4,9	41,7	5,7	37,3
G2	0,7	35,6	8,8	36,6
C3	25,2	33,6	8,6	36,7
A4	8,7	34,9	3,3	33,6
C5	14,1	37,6	7,8	32,8
U6	19,3	43,4	11,4	36,7
U7	157,2	33,4	157,6	31,7
C8	159,1	39,2	165	35,7
G9	32,7	39,4	37,9	39,8
G10	2,3	43,0	1,0	36,3
U11	18,6	35,5	9,3	34,6
G12	15,2	36,8	5,3	34,6
C13	30,8	37,4	31,3	36,5
C14	34,0	27,8	11	26,4

**Tabelle 6.3.4:** Modelstruktur vom 14mer-Rest C3 (C3'-endo, *anti*): DFT-gerechnete  $^1J(\text{C,H})$ -Kopplungskonstanten in Abhängigkeit vom Torsionswinkel  $\phi$  (2'OH'-O2'-C2'-H2').

$\theta$ (°)	P (°)	$v_{\max}$ (°)	$^1J^b(\text{C1',H1'})$ (Hz)	$^1J^s(\text{C1',H1'})$ (Hz)	$^1J^b(\text{C2',H2'})$ (Hz)
-120	6,8	37,5	169,5	172,5	160,9
-100	7,0	37,4	169,7	172,7	160,3
-80	7,1	37,3	171,2	174,2	159,0
-60	7,0	37,3	173,2	176,2	157,5
-40	7,2	37,1	174,4	177,4	156,1
-20	7,1	36,3	175,1	178,1	154,9
0	7,4	35,6	175,5	178,5	154,4
20	9,8	33,8	174,6	177,6	154,4
40	12,3	32,2	173,9	176,9	154,8
60	14,1	30,5	173,6	176,6	155,2
80	12,9	30,9	174,1	177,1	157,3
100	8,6	36,7	175,3	178,3	161,3
120	8,1	37,1	175,9	178,9	161,3
140	7,4	36,7	175,7	178,7	160,2
160	7,3	36,2	175,0	178,0	158,9
180	7,0	36,4	174,0	177,0	158,8
200	6,2	37,0	172,8	175,8	159,8
220	6,4	37,4	171,8	174,8	160,5

$^1J^b$ : DFT-gerechnete Kopplungen,  $^1J^s$ : DFT-gerechnete Kopplungen mit der Korrektur von +3 Hz. P und  $v_{\max}$ : nach der DFT-Geometrioptimierung.

**Tabelle 6.3.5:** Modelstruktur vom 14mer-Rest U7 (C2'-endo, *anti*): DFT-gerechnete  $^1J(\text{C,H})$ -Kopplungskonstanten in Abhängigkeit vom Torsionswinkel  $\phi$  (2'OH'-O2'-C2'-H2').

$\theta$ (°)	P (°)	$v_{\max}$ (°)	$^1J^b(\text{C1',H1'})$ (Hz)	$^1J^s(\text{C1',H1'})$ (Hz)	$^1J^b(\text{C2',H2'})$ (Hz)
-120	159,5	34,2	165,3	168,3	145,6
-100	158,4	35,6	165,6	168,6	145,4
-80	158,9	35,5	166,1	169,1	144,4
-60	159,3	34,9	166,4	169,4	143,1
-40	159,3	34,5	166,7	169,7	141,6
-20	159,2	34,0	166,8	169,8	140,9
0	159,5	34,1	166,6	169,6	140,8
20	159,8	34,1	166,1	169,1	141,3
40	159,5	35,0	165,8	168,8	142,0
60	158,1	36,8	165,9	168,9	143,1
80	158,2	36,1	166,7	169,7	145,4
100	158,8	32,9	167,3	170,3	148,6
120	159,1	29,8	167,1	170,1	150,5
140	158,8	29,5	166,5	169,5	150,1
160	157,6	31,7	165,4	168,4	147,9
180	157,2	33,7	164,3	167,3	146,0
200	157,4	34,1	163,4	166,4	145,6
220	159,4	33,2	164,0	167,0	145,8

$^1J^b$ : DFT-gerechnete Kopplungen,  $^1J^s$ : DFT-gerechnete Kopplungen mit der Korrektur von +3 Hz. P und  $v_{\max}$ : nach der DFT-Geometrioptimierung.

#### 6.4 Anhang IV: NMR-Resonanzzuordnung der RNA-Schalter

**Tabelle 6.4.1:** Iminoprotonen NMR-Resonanzzuordnung der Aptamerdomäne mit der nativen P1-Helix (A-Apt-P1<sup>N</sup>) bei 283 K.

A-Apt-P1 <sup>N</sup>			A-Apt-P1 <sup>N</sup> + Mg <sup>2+</sup>			A-Apt-P1 <sup>N</sup> + Mg <sup>2+</sup> + Ade		
Rest	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{15}\text{N}$ (ppm)	Rest	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{15}\text{N}$ (ppm)	Rest	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{15}\text{N}$ (ppm)
						Ade	154,22	11,24
U27	162,35	13,78	U27	162,25	13,75	U18	161,59	13,08
U27*	162,24	13,67	U27*	162,25	13,75	U20	162,13	13,97
U31	158,08	11,03	U31	158,18	11,05	U22	162,95	13,04
U34	163,12	13,72	U34	163,02	13,69	U27	162,48	13,54
G37	147,25	13,08	G37	147,39	13,14	U31	158,22	10,95
G38	148,54	13,13	G38	148,38	13,32	U34	163,14	13,71
G38*	148,41	13,25	G38	148,64	13,17	G37	147,44	13,10
U39	154,74	10,12	U39	154,72	10,06	G38	148,65	13,21
U39	154,74	10,12	U39	154,72	10,06	U39	154,93	10,24
U40	163,33	14,38	U40	163,25	14,37	U40	163,45	14,34
U40*	163,00	14,15	U40*	162,88	14,11	U41	162,78	12,68
U41	162,69	12,68	U41	162,63	12,67	G42	145,57	11,28
U41*	162,45	12,72	U41*	162,41	12,72	G42'	145,72	11,37
G42	145,61	11,37	G42	145,58	11,36	G44	147,29	12,51
G44	146,90	12,52	G44	146,89	12,51	G45	148,28	13,00
G44*	147,00	12,74	G44*	146,93	12,76	G46	149,45	12,72
G45	147,53	12,74	G45	147,47	12,78	U47	157,94	10,58
G56	146,96	12,50	G56	146,89	12,51	U49	159,89	10,40
G57	146,91	12,10	G57	146,89	12,13	U51	163,30	13,42
U68	162,51	13,29	U68	162,42	13,28	G56	146,71	12,65
U71	161,48	13,07	U71	161,44	13,09	G57	146,96	12,14
U71*	161,61	13,17	U71*	161,77	13,45	U68	163,74	13,56
G72	146,46	11,72	G72	146,49	11,73	U71	161,81	13,67
G72*	146,37	11,53				G72	147,28	11,35
						U74	162,67	14,00
						U75	163,07	13,83



**Tabelle 6.4.2:** Iminoprotonen NMR-Resonanzzuordnung der Aptamerdomäne mit der nativen P1-Helix ( A-Apt-P1<sup>S</sup> ) bei 283 K.

A-Apt-P1 <sup>S</sup>			A-Apt-P1 <sup>S</sup> + Mg <sup>2+</sup>		
Rest	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{15}\text{N}$ (ppm)	Rest	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{15}\text{N}$ (ppm)
G15	148,59	13,06	G15	148,59	13,06
U17	162,19	13,88	U17	161,99	13,85
U18	162,31	13,08	U18	162,01	13,09
G19	147,04	12,29	G19	147,04	12,32
U27	162,33	13,84	U27	162,32	13,80
U31	157,31	11,18	U31	158,41	11,14
U34	163,07	13,76	U34	163,07	13,72
G37	147,48	13,21	G37	147,48	13,21
G38	148,74	13,17	G38	148,81	13,25
U39	155,28	10,12	U39	154,84	10,05
U40	163,26	14,39	U40	163,26	14,39
U41	162,72	12,74	U41	162,72	12,74
G42	145,66	11,44	G42	145,57	11,40
G44	147,58	12,51	G44	147,51	12,57
G45	147,61	12,75	G45	147,58	12,84
G56	146,93	12,58	G56	147,09	12,59
G57	146,92	12,15	G57	146,85	12,19
G80	148,36	13,32	G80	148,21	13,33



---

## Danksagung

---

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Harald Schwalbe für die Betreuung meiner Doktorarbeit. Ich bin sehr dankbar, dass ich von der hervorragenden Ausstattung und einer wissenschaftlich anregenden Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe profitieren konnte. Im besonderen Maße möchte ich mich bei ihm für die Überlassung der vielfältigen Projekte und Kooperationen, sowie die gewährten wissenschaftlichen Freiheiten bedanken. Das entgegengebrachte Vertrauen und Interesse für neue Ideen haben meine Arbeit sehr vorangebracht. Auch für die Möglichkeit meiner Teilnahme an wissenschaftlichen Konferenzen, dem EMBO-Kurs und der Lehre möchte ich mich ausdrücklich bedanken.

Bei Dr. Christian Richter bedanke ich mich für die Zusammenarbeit an der  $\Gamma$ -HCP-Pulssequenzen, für die Lehren über die NMR-Spektroskopie und alle Hilfestellungen am Spektrometer. Ich bin sehr dankbar für das stets vorhandene Interesse an meiner Arbeit und für die vielen Ratschläge. Eine besondere Dankbarkeit richtet sich an das unermüdliche Bemühen und die Geduld beim Seminar „Pulse sequences“, das mir sehr viel für unser gemeinsames Projekt und die spätere Arbeit gebracht hat.

Dr. Henry Jonker danke ich für die Einführung in das Programm ARIA, eine erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Strukturrechnung und die vielen unterhaltsamen „Coffee-breaks“. Ich erinnere mich gerne an den gut gelungen EMBO-Kurs und eine schöne Zeit in Beijing.

Bei Anna Paulus und Elena Hartmann bedanke ich mich für die jederzeit kompetenten Hilfestellungen in organisatorischen Fragen, die entgegengebrachte, wirklich warme Freundlichkeit und für die leckeren Süßigkeiten, die so manch einen Nachmittag gerettet haben.

Für die erfolgreiche Zusammenarbeit im Rahmen des Projekts über die  $^1J$ -Kopplungen möchte ich mich bei Prof. Dr. Max Holthausen ausdrücklich bedanken. Die Arbeit mit Sandor Tüllmann und insbesondere Puneet Gupta haben meine Doktorarbeit sehr bereichert.

Prof. Dr. Jens Wöhnert danke ich für hilfreiche Diskussionen und Anregungen an wichtigen Stellen meiner Doktorarbeit, insbesondere zum Thema RNA-Schalter.

Für viele NMR-*sehr*-theoretischen und lehrreiche Diskussionen möchte ich mich bei Boris Fürtig, Dominic Wagner und Elke Duchardt-Ferner bedanken.

Daniel Mathieu danke ich für alle Soforthilfsmaßnahmen am Spektrometer und die gute Zusammenarbeit an der immer besser werdenden  $^1J$ -Pulssequenz.

Jonas Noeske möchte ich für die Unterstützung im Labor und seine Einführung rund um das Thema RNA bedanken.

Martin Hänke und Fabian Hiller danke ich für den verlässlichen *tech-support*! Ebenso danke ich Mirko Cevic dafür, dass er mir bei allen Problemen und Aussetzern am Computer unkompliziert und kreativ geholfen hat.

Dem gesamten Arbeitskreis möchte ich für das angenehme Arbeitsklima, die gegenseitige Unterstützung und die geselligen Zeiten bei Konferenzen, *Bergfesten* oder auf unseren Arbeitskreisfahrten danken. Ich danke außerdem allen, die mir bei der Korrektur unzähliger OC-Klausuren geholfen haben, und dafür, dass diese Zeit, trotz ernüchternder Ergebnisse, zu unterhaltsamen Vormittagen wurde.

Dann möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des *Horizon Rooms* Christian Gerum, Jörg Rinnenthal, Max Stadler, Katja Barthelmes, Mirko Cevic und Andreas Hegelein für die freundliche Atmosphäre und Unterstützung bei allen Problemen, die im Alltag anfallen, bedanken. Insbesondere danke ich der wechselnden *lunch*-Gesellschaft, einschließlich Anke Reining und Kai Schlepckow, für amüsante und ernste Gespräche mit Inhalten aller Art, die den Tag erhellt und für die nötige Ablenkung gesorgt haben.

Anke Reining danke ich für die Hilfe im Labor, den fachlichen Austausch zum Thema RNA-Schalter und viele andere Themen. Danke für die Gelassenheit, die du wohltuend verbreitet hast.

Ein ganz großer Dank richtet sich zu meiner *rechten* Seite, wo die immer gut gelaunte, für alles offene und herzliche Katja Barthelmes sitzt. Ich danke dir für die Unterstützung in all den Jahren, für dein Vertrauen und Gespräche über Wissenschaft und vieles mehr. Danke, dass du da bist!

Noch ein großen Dank an alle engagierten Korrekturleser meiner Arbeit und früherer Manuskripte!

Zum Schluss gebührt mein Dank meinen Eltern, Geschwistern und Freunden für ihr Vertrauen, Unterstützung und die schöne Zeit neben der Doktorarbeit.

---

## Publikationen

---

1. Rinnenthal, J., Richter, C., **Nozinovic, S.**, Fürtig, B., Lopez, J., Glaubitz, C., Schwalbe, H. (2009), RNA Phosphodiester Backbone Dynamics of a Perdeuterated cUUCGg Tetraloop RNA from Phosphorus-31 NMR Relaxation Analysis.

*J. Biomol. NMR* 45, 143-155.

2. **Nozinovic, S.**, Richter, C., Rinnenthal, J., Fürtig, B., Duchardt-Ferner, E., Weigand, J. E., Schwalbe, H. (2010), Quantitative 2D and 3D  $\Gamma$ -HCP Experiments for the Determination of the Angles  $\alpha$  and  $\zeta$  in the Phosphodiester Backbone of Oligonucleotides.

*J. Am. Chem. Soc.* 132, 10318-10329.

3. **Nozinovic, S.**, Fürtig, B., Jonker, H. R. A., Richter, C., Schwalbe, H. (2010), High-resolution NMR Structure of an RNA Model System: the 14-mer cUUCGg Tetraloop hairpin RNA.

*Nucleic Acids Res.* 38, 683-694.

4. **Nozinovic, S.**, Gupta, P., Fürtig, B., Richter, C., Tüllmann, S., Duchardt-Ferner, E., Holthausen, M. C., Schwalbe, H. (2011), Determination of the Conformation of the 2'OH Group in RNA by NMR Spectroscopy and DFT Calculations.

*Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 5397-5400.

5. Cevec, M., Jonker H. R. A., **Nozinovic S.**, Richter C., Schwalbe H. (2011), NMR of Biomolecules: Towards Mechanistic Systems Biology.

Book chapter (Nucleic Acids), Series Editor: Ivano Bertini (Editor), Kathleen S. McGreevy (Editor), Giacomo Parigi (Editor), in press.

6. **Nozinovic, S.**, Reining, A., Noeske, J., Wöhnert, J., Schwalbe, H. (2011), Influence of Length of P1-Helix on Structure and Ligand Binding of A-switch RNA.

*In Vorbereitung*



## CURRICULUM VITAE

### SENADA NOZINOVIC

#### Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 17. 04. 1982  
Geburtsort: Zvornik in Bosnien und Herzegowina  
Nationalität: Bosnisch

#### Schulbildung:

09/1989 - 04/1992 Grundschule in Bosnien und Herzegowina  
04/1992 - 02/1994 Grundschule und Gymnasium in Kroatien  
04/1994 - 07/1996 G. A. Zinn-Gesamtschule in Frankfurt am Main  
09/1996 - 06/2001 J. W. Goethe-Gymnasium in Frankfurt am Main

#### Studium:

10/2001 - 03/2007 Studium der Chemie, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main  
10/2003 Vordiplom im Fach Chemie, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main  
10/2005 - 12/2005 Auslandsaufenthalt an der Oxford University, Großbritannien,  
in der Gruppe von Dr. Christina Redfield  
09/2006 – 03/2007 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie und  
Chemische Biologie, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main  
Betreuer: Prof. Dr. Harald Schwalbe  
Thema: *NMR und biochemische Methodenentwicklung zur Verbesserung der RNA-Strukturbestimmung*  
Seit 05/2007 Dissertation am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie,  
J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main  
Betreuer: Prof. Dr. Harald Schwalbe  
Thema: *NMR-spektroskopische Methodenentwicklung an RNA und strukturelle Charakterisierung des transkriptionellen Adenin-RNA-Schalters*

Akademische Lehrer:

Prof. Dr. W. Aßmus, Prof. Dr. N. Auner, Prof. Dr. B. Brutschy, Prof. Dr. E. Egert, Prof. Dr. J. Engels,  
Prof. Dr. M. Göbel, Prof. Dr. B. O. Kolbesen, Prof. Dr. G. Ludwig, Prof. Dr. M. Holthausen, Prof. Dr. T.  
Prisner, Prof. Dr. D. Rehm, Prof. Dr. M. Rueping, Prof. Dr. M. U. Schmidt, Prof. Dr. G. Schneider, Prof.  
Dr. H. Schwalbe, Prof. Dr. Stark, Prof. Dr. G. Stock, Prof. Dr. R. Tampé, Prof. Dr. J. Wachtveitl, Prof. Dr.  
M. Wagner, Prof. Dr. J. Wöhnert