

# Struktur und Dynamik Ligand-abhängiger regulatorischer RNA-Motive

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von  
**Janina Buck**  
aus VS-Villingen

Frankfurt am Main  
2010

(D30)



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

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. Harald Schwalbe  
Prof. Dr. Beatrix Süß

Datum der Disputation: 07. Oktober 2010



Meiner Familie.



# INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	3
Übersicht über die einzelnen Kapitel	6
<b>Kapitel 1: Allgemeine Einleitung</b>	
Einleitung	10
Katalytische RNA-Motive	11
Selbstspaltende Ribozym-Motive	11
Sensorische RNA-Motive	14
Riboswitch-vermittelte Genregulation	15
Strukturen Ligand-gebundener Riboswitch-RNAs	17
Guanin-abhängige Riboswitch-RNA	22
Kinetik regulatorischer Prozesse von Riboswitch-RNAs	25
Literatur	27
<b>Kapitel 2: Allgemeine experimentelle Methoden</b>	
RNA-Synthese und -Aufreinigung	36
Gelelektrophoretische Methoden	40
Ligand-Synthesen	41
UV-Spektroskopie	42
CD-Spektroskopie	43
NMR-spektroskopische Untersuchungen	43
Literatur	51
<b>Kapitel 3: Charakterisierung der Ligand-induzierten Faltung der Guanin Riboswitch-RNA</b>	
Einleitung	56
Material und Methoden	58
Ergebnisse	62
Diskussion	72
Literatur	74

**Kapitel 4: Einfluss von  $Mg^{2+}$  auf Struktur, Ligandbindung und funktionale Stabilität von Guanin Riboswitch-RNAs ( $Gsw^{apt}$  und  $Gsw^{loop}$ )**

Einleitung	80
Material und Methoden	85
Ergebnisse	87
Diskussion	102
Literatur	107

**Kapitel 5: Einfluss von Cofaktoren auf die Faltung von Guanin Riboswitch-RNAs ( $Gsw^{apt}$  und  $Gsw^{loop}$ )**

Einleitung	112
Material und Methoden	115
Ergebnisse und Diskussion	117
Zusammenfassende Diskussion	136
Literatur	144

**Kapitel 6: NMR-spektroskopische Charakterisierung von Struktur und Katalyse des *Adenin-abhängigen Hairpin Ribozyms***

Einleitung	148
Material und Methoden	151
Ergebnisse	155
Diskussion	169
Literatur	174

Anhang	177
Zusammenfassung	183
Danksagung	186
Publikationen	189
Lebenslauf	191



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1D, 2D,...,nD	ein-, zwei-,...,n-dimensional
5'-UTR	<i>5'-untranslated region</i> , 5'-nichttranslatierter Bereich
°C	Temperatur in Grad Celsius
$\delta$	chemische Verschiebung
$\Delta G^\ddagger$	Freie Aktivierungsenthalpie
A, Ade	Adenin
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
C, Cyt	Cytosin
CD	<i>circular dichroism</i> , Circulardichroismus
c-di-GMP	<i>bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate</i> , zyklisches di-Guanosinmonophosphat
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
CSP	<i>chemical shift perturbation</i> , chemische Verschiebungsänderung
DEAE	Diethylaminoethyl-Sepharose
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
D <sub>2</sub> O	Deuteriumoxid
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i> , Ethylendiamintetraessigsäure
ERETIC	<i>electronic reference to access in vivo concentrations</i>
eq	Äquivalente
FID	<i>free induction decay</i>
FMN	<i>flavin mononucleotide</i> , Flavinmononukleotid
FT	Fourier-Transformation
g	Gramm
G, Gua	Guanin
GARP	<i>globally optimized alternating phase rectangular pulse</i>
GlcN6P	<i>glucosamine-6-phosphate</i> , Glucosamin-6-Phosphat
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high pressure (performance) liquid chromatography</i> , Hochdruck(leistungs)- Flüssigchromatographie
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
Hyp	Hypoxanthin

Hz	Hertz
INEPT	<i>insensitive nuclei enhanced by polarization transfer</i>
J	skalare Kopplungskonstante
k	Geschwindigkeitskonstante
K	Temperatur in Kelvin
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
m	Meter
M	Molar
MD	<i>molecular dynamics</i> , Molekulardynamik
MHz	Megahertz
min	Minute
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
N	Nukleotid: A, G, C oder U
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernmagnetische Resonanz
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i> , Kern-Overhauser-Effekt
nt	Nukleotide
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD <sub>xxx</sub>	Optische Dichte bei xxx nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
pdb	<i>protein data bank</i>
PG	Photoschutzgruppe
ppm	<i>parts per million</i>
preQ1	7-Aminomethyl-7-deazaguanin
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rNTP	Ribonukleotidtriphosphat
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungszahl pro Minute
RP	<i>reversed phase</i> , Umkehrphase
s	Sekunde
SAM	<i>S-adenosylmethionine</i> , S-Adenosylmethionin
SD	<i>Shine-Dalgarno</i>
SELEX	<i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
SHAPE	<i>selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension</i>
S/N	<i>signal-to-noise ratio</i> , Signal-zu-Rausch Verhältnis
S.O.C	LB-Medium mit 250 mM KCl, 2 M MgCl <sub>2</sub> und 1 M Glucose
SOFAST	<i>band-selective optimized flip-angle short-transient</i>

TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBE	Tris/Borat/EDTA
TPP	<i>thiamine pyrophosphate</i> , Thiaminpyrophosphat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
U, Ura	Uracil
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
W	Watt
WATERGATE	<i>water suppression by gradient-tailored excitation</i>

## ÜBERSICHT ÜBER DIE EINZELNEN KAPITEL

In der allgemeinen Einleitung in **Kapitel 1** werden einige Aspekte regulatorischer RNA-Motive dargestellt. In Zusammenhang mit den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten RNAs liegt der Fokus hierbei auf selbstspaltenden Ribozym-Motiven und Riboswitch-RNAs. Es werden verschiedene Aspekte der strukturellen Organisation dieser RNA-Motive und des Einflusses der globalen Architektur auf ihre Funktion und Faltung beschrieben. Weitere Aspekte, entsprechend der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen, werden jeweils in den Kapiteln 3-6 eingeführt.

**Kapitel 2** beinhaltet die Beschreibung der allgemeinen experimentellen Bedingungen der in dieser Arbeit durchgeführten biochemischen, chemischen und spektroskopischen Methoden. Diese umfassen die RNA-Synthese und -Aufreinigung, gelelektrophoretische Methoden, Ligand-Synthesen, UV-Spektroskopie, CD-Spektroskopie und statische und zeitaufgelöste NMR-spektroskopische Untersuchungen. Zur Aufnahme der zeitaufgelösten NMR-Kinetiken werden zwei Methoden der *in situ* Reaktionsinitiierung angewandt. Diese umfassen die Licht-induzierte Aktivierung einer photogeschützten Verbindung und die Verwendung einer Mischapparatur. In diesem Kapitel allgemein aufgeführte Bedingungen werden in Kapiteln 3-6 jeweils durch entsprechende spezifische experimentelle Angaben und die Beschreibung zusätzlicher Methoden ergänzt.

In **Kapitel 3** werden die Ergebnisse der Ligand-induzierten Kinetik des Faltungsprozesses der Guanin Riboswitch-RNA Aptamerdomäne ( $Gsw^{apt}$ ) des *xpt-pbuX* Operons aus *B. subtilis* dargestellt. Die Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der RNA-Faltung wurde durch die Licht-induzierte Aktivierung des chemisch synthetisierten, photogeschützten Liganden und anschließender Detektion mittels zeitaufgelöster NMR-Methoden erreicht. Um bei der Größe des untersuchten RNA-Konstruktes die Analyse der Geschwindigkeitskonstanten individueller Signale zu ermöglichen, wurde eine Kombination aus selektiver Isotopenmarkierung und NMR-Filtermethoden entwickelt. Zusätzlich wurde auf der Basis der Analyse von NMR-Ligand-Linienbreiten eine schwach affine und nicht-spezifische Ligandbindung an die Riboswitch-RNA postuliert. Das Einbeziehen der NMR-spektroskopisch ermittelten Daten in MD-Simulationen ermöglichte einen Einblick in denkbare, in den Ligand-Bindungsprozess involvierte RNA-

Strukturensembles und damit eine Beschreibung eines Modells dieses Ligand-induzierten RNA-Faltungsprozesses.

In **Kapitel 4** werden die Ergebnisse struktureller NMR-spektroskopischer und biophysikalischer Untersuchungen an der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne (Gsw<sup>apt</sup>) und der G37A/C61U-Mutante (Gsw<sup>loop</sup>) vorgestellt. Dabei wurde der Einfluss von RNA-Mg<sup>2+</sup>-Interaktionen auf die RNA-Konformationen von Gsw<sup>loop</sup> im Ligand-freien und -gebundenen Zustand und auf die Stabilitäten individueller Strukturelemente charakterisiert und die Funktion des interhelikalen Tertiärstrukturelements, die Verknüpfung der Tertiärstrukturausbildung mit Ligand-Bindungscharakteristika und die temperaturabhängigen funktionalen Stabilitäten der Riboswitch-RNA-Konstrukte analysiert.

**Kapitel 5** beschreibt die Ergebnisse zeitaufgelöster NMR-Untersuchungen der Cofaktor-induzierten RNA-Faltungsprozesse der Guanin Riboswitch Aptamerdomänen Gsw<sup>apt</sup> und Gsw<sup>loop</sup>. Dabei wurde die Cofaktor-abhängige Ausbildung der Tertiärstrukturen der freien RNA und der spezifischen RNA-Ligand Komplexe untersucht, um anhand der Zusammenhänge von Ladungskompensation, Tertiärstrukturausbildung und konformationeller Dynamik des Ligand-freien RNA-Ensembles detaillierte Einblicke in spezifische Ligand-induzierte Faltungsprozesse der Riboswitch-RNA und damit in deren regulatorische Eigenschaften zu erhalten.

Kapitel 5 schließt mit einer zusammenfassenden Diskussion der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse der Guanin Riboswitch-RNAs (Kapitel 3-5).

Die NMR-spektroskopischen und biophysikalischen Untersuchungen des ‘*Adenin-abhängigen Hairpin Ribozym*’-Motivs (*adenine-dependent hairpin ribozyme*, ADHR1-nmr) werden in **Kapitel 6** beschrieben. Mittels statischer NMR-spektroskopischer Methoden wurden, basierend auf den Iminoprotonen-Reportersignalen, die RNA-Konformationen vor und nach der katalytischen Spaltreaktion charakterisiert. Eine dem natürlich vorkommenden *hairpin ribozyme* analoge chemische Spaltreaktion konnte basierend auf der Charakterisierung des 2',3'-zyklischen Phosphodiesters als Reaktionsprodukt mittels <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie für ADHR1-nmr bestätigt werden. Der strukturelle und funktionelle Einfluss der essentiellen Cofaktoren Adenin und Mg<sup>2+</sup> auf die Katalyse des Ribozym-Motivs wurde mittels NMR-spektroskopischer und biophysikalischer Methoden untersucht. Die Zeitskala der katalytischen Reaktion, die über Minuten stattfindet, ermöglichte die Untersuchung des Adenin-induzierten katalytischen Spaltprozesses der RNA mittels zeitaufgelöster 1D und 2D NMR-Methoden.



# **KAPITEL 1**

ALLGEMEINE EINLEITUNG

## EINLEITUNG

Die fortwährende Identifizierung verschiedenster natürlich vorkommender funktionaler RNA-Motive unterstreicht die Bedeutung von RNAs in unterschiedlichsten zellulären Prozessen (1). RNA-Strukturen lassen sich durch drei generelle Organisationsebenen definieren, welchen unterschiedliche informationelle, strukturelle und/oder funktionale Bedeutung zukommt (2). Die Nukleotidsequenz definiert die Primärstruktur der RNA und stellt eine einfache Möglichkeit dar, genetische Information zu speichern und zu transportieren. Durch die intrinsische Eigenschaft der RNA, stabile Sekundärstrukturen auszubilden, werden definierte RNA-Sequenzbereiche sozusagen abgeschirmt, wohingegen andere intra- oder intermolekulare Wechselwirkungen zugänglich bleiben. Die Interaktionen verschiedener Sekundärstrukturelemente miteinander führen zur Organisation von RNA-Architekturen auf der Ebene der Tertiärstruktur und sind vorwiegend verantwortlich für die globale Faltung der RNA. Die Ausbildung komplexer dreidimensionaler RNA-Tertiärstrukturen stellt häufig die Basis intermolekularer Wechselwirkungen dar. Die Tertiärstruktur kann beispielsweise zur Ausbildung spezifischer Bindungstaschen für Cofaktoren oder Ionen führen und diese Interaktionen können im Folgenden katalytische Reaktionen oder regulatorische Funktionen induzieren, oder sie stellt die Basis für spezifische RNA-Protein-Wechselwirkungen dar. Die funktionale Vielseitigkeit von RNA ist ebenfalls der Eigenschaft zuzuschreiben, dass eine Vielzahl verschiedenster Konformationen ausgebildet werden kann, ohne strukturelle Dynamik auszuschließen. In einigen Fällen ist die Konformationsänderung selbst ein wesentlicher Bestandteil der jeweiligen RNA-Funktion und kann infolge verschiedenster lokaler Veränderungen oder Interaktionen ausgelöst werden.

Obwohl zahlreiche zelluläre Funktionen von RNAs in direktem Zusammenhang mit Proteinen stehen, wurde auch eine Vielzahl unterschiedlichster RNA-Motive ermittelt, die ihre Funktion ohne eine initiale Beteiligung von Proteinen ausüben (3). Beispiele hierfür sind zahlreiche regulatorische RNA-Motive. Wichtige Aspekte bei der Aufklärung dieser RNA-vermittelten Regulationsprozesse beinhalten beispielsweise die Fragestellungen, (i) wie die dreidimensionale Architektur der RNA-Motive mit deren Funktion verknüpft ist und (ii) wie die RNA auf einer relevanten Zeitskala in eine funktionale Struktur faltet bzw. wie der entsprechende regulatorische Prozess stattfindet. Die Charakterisierung von beteiligten statischen Strukturen der Grund-, Übergangs- und Endzustände der entsprechenden RNA-Faltungsprozesse und deren thermodynamische Untersuchung können mögliche Aufschlüsse über die erstgenannte Fragestellung geben. Die Beantwortung der zweiten Fragestellung legt die Charakterisierung



dynamischer Aspekte von RNA-Faltungsprozessen bzw. der regulatorischen Prozesse auf den verschiedensten relevanten Zeitskalen zu Grunde. Im Folgenden sollen einige strukturelle und dynamische Aspekte katalytischer und sensorischer RNA-Motive vorgestellt werden.

## KATALYTISCHE RNA-MOTIVE

Die natürlich vorkommenden RNA-Enzyme oder auch Ribozyme sind katalytische RNA-Motive, die zu zahlreichen unterschiedlichsten zellulären Prozessen beitragen (4). Ihrer Funktion entsprechend können die natürlich vorkommenden katalytischen RNA-Motive in verschiedene Gruppen unterteilt werden (3, 5). Bislang wurden zum einen Ribozym-Motive identifiziert, (i) die RNA-Spaltung katalysieren. Diese RNA-Motive schließen sowohl selbstspaltende Ribozyme (siehe nachfolgender Abschnitt) als beispielsweise auch die RNA-Komponente der (bakteriellen) Ribonuklease (RNase) P ein, die verschiedene RNA-Substrate in einer *trans*-vermittelten Reaktion spaltet (5-7). Zum anderen wurden katalytische Ribozym-Motive identifiziert, deren biologische Funktion (ii) das Spleißen von pre-mRNA darstellt. Diese Ribozym-Motive, so genannte selbstspleißende Introns, katalysieren das präzise Entfernen von Introns aus pre-mRNA und die anschließende kovalente Verknüpfung der entsprechend angrenzenden Exons. Der jeweilige detaillierte Mechanismus der zu Grunde liegenden Reaktionen variiert in den verschiedenen selbstspleißenden RNA-Motiven (3), die aufgrund der meist charakteristischen Sekundärstrukturfaltung zusätzlich in verschiedene Gruppen unterteilt werden (8, 9). (iii) Eine weitere Funktion wird vom Ribosom selbst ausgeübt, dessen RNA-vermittelte katalytische Funktion im aktiven Peptidyl-Transferase-Zentrum die Ausbildung von Peptidbindungen beinhaltet (10, 11).

In Zusammenhang mit dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten RNA-Motiv, dem ‘*Adenin-abhängigen Hairpin Ribozym*’ (Kapitel 6), sollen im Folgenden die selbstspaltenden Ribozym-Motive detaillierter vorgestellt werden.

### Selbstspaltende Ribozym-Motive

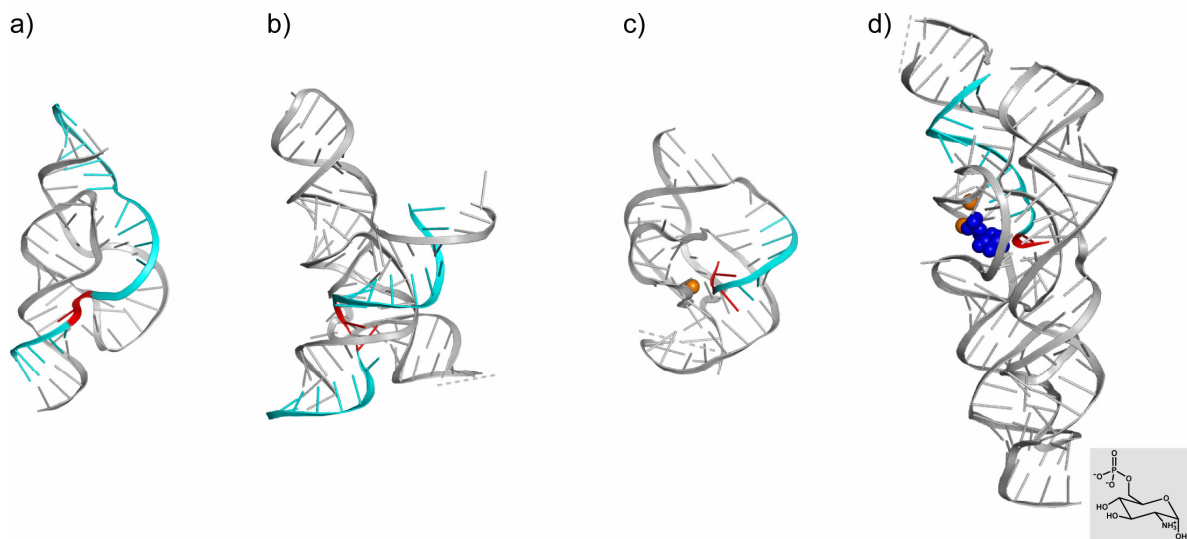
Die bisher bekannten selbstspaltenden Ribozym-Motive schließen das *hammerhead* (12, 13), das *hepatitis delta virus* (HDV) (14, 15), das *Varkud satellite* (16, 17), das *hairpin* (18-21) und das *glmS* (22) Ribozym ein. Während die Funktion des *glmS* Ribozyms in der Spaltung der mRNA liegt und damit die Genexpression reguliert, sind die weiteren genannten Ribozym-Motive

vorwiegend in Prozesse der RNA-Replikation involviert. Diese selbstspaltenden Ribozym-Motive katalysieren beispielsweise die Prozessierung von Satelliten-, Virus- oder Viroiden-RNAs (4). Obwohl sich die selbstspaltenden Ribozym-Motive sowohl in ihrer RNA-Sequenz und ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur als auch in ihrer zellulären Funktion stark unterscheiden, liegt ihrem katalytischen Mechanismus jeweils die gleiche chemische Reaktion selbst zu Grunde, nämlich eine jeweils positionsspezifische hydrolytische Spaltung des RNA-Phosphatrückgrats. Diese von Ribozym-Motiven katalysierte Reaktion ist dabei, sofern untersucht, reversibel, d.h. sie beinhaltet sowohl die Spalt- als auch die Ligationsreaktion.

Aufgrund verschiedener biochemischer und struktureller Untersuchungen wird angenommen, dass der Mechanismus, durch den diese chemische Reaktion katalysiert wird, in den verschiedenen Ribozym-Motiven im Detail variiert (23-26). Die katalytischen Reaktionen weisen beispielsweise unterschiedliche pH- und Kationen-Abhängigkeiten auf. Des Weiteren werden mögliche Unterschiede im Reaktionsmechanismus dadurch hervorgerufen, dass sich die aktiven Zentren in den verschiedenen Ribozym-Motiven in ihrer Architektur und auch in den an der Reaktion durch die entsprechende strukturelle Position denkbar beteiligten RNA-Nukleotiden bzw. funktionellen Gruppen unterscheiden. Zudem sind für die katalytische Aktivität der Ribozym-Motive zum Teil verschiedene zusätzliche Cofaktoren wie Ionen oder Liganden essentiell erforderlich. So wurde beispielsweise im HDV Ribozym unter anderem spezifisch gebundenes  $Mg^{2+}$  als denkbarer Reaktionspartner im aktiven Zentrum beobachtet (27), während das *glmS* Ribozym nur in Gegenwart des zusätzlichen Cofaktors Glucosamin-6-Phosphat (GlcN6P) katalytische Aktivität aufweist (22) (Abbildung 1.1). Basierend auf allgemeinen Vorstellungen enzymatisch katalysierter Reaktionen werden als den katalytischen Ribozym-Motiven zu Grunde liegende Mechanismen generell denkbare Aspekte diskutiert: die Positionierung des Substrates, die Aktivierung des Nucleophils bzw. die Protonierung der Abgangsgruppe und/oder die Stabilisierung des Übergangszustandes bzw. die Destabilisierung des Grundzustandes (4, 26).

Die Kristallstrukturen verschiedener selbstspaltender Ribozym-Motive illustrieren wesentliche Aspekte, wie die unterschiedlichen spezifischen Tertiärstrukturfaltungen dieser RNA-Motive die jeweilige katalytische Funktion ermöglichen könnten. Die Strukturen von stabilisierten pre-katalytischen Konformationen, stabilisierten Übergangszuständen und RNA-Konformationen nach Ablauf der jeweiligen Spaltreaktion veranschaulichen strukturelle Aspekte entlang des katalytischen Reaktionsweges. Die Strukturen zeigen beispielsweise, wie das jeweilige Substrat durch zahlreiche Sekundär- und/oder Tertiärstrukturinteraktionen positioniert wird oder auch die Architektur des jeweiligen aktiven Zentrums der katalytischen Reaktion. Aufgrund der

Beobachtung von in der direkten strukturellen Umgebung des aktiven Zentrums positionierten Nukleotiden der Ribozym-Motive werden in Zusammenhang mit verschiedensten weiteren biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen deren Beteiligung an der katalytischen Reaktion diskutiert. Zusätzlich geben im aktiven Zentrum lokalisierte  $Mg^{2+}$ -Ionen oder im Falle des *glmS* Ribozym-Motivs sogar ein komplexierter Ligand Aufschluss über deren mögliche Beteiligung an der katalytischen Reaktion selbst (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1:** Kristallstrukturen selbstspaltender Ribozym-Motive. Die Nukleotide, deren Phosphodiesterverknüpfung in der katalytischen Reaktion positionsspezifisch geschnitten wird, sind rot hervorgehoben. Der Substrat RNA-Strang ist jeweils türkis dargestellt. (Ausschließlich zur Kristallisation zusätzlich eingeführte Elemente sind nicht dargestellt. Deren Position ist jeweils durch eine graue gestrichelte Linie gekennzeichnet); **a)** *hammerhead* Ribozym-Motiv aus *Schistosoma mansoni* in einer stabilisierten pre-katalytischen Konformation (pdb: 2GOZ) (28); **b)** Stabilisierter Übergangszustand des *hairpin* Ribozym-Motivs (pdb: 1M5O) (29); **c)** Stabilisierte pre-katalytische Struktur des HDV Ribozym-Motivs (pdb: 1SJ3) (30). Ein im aktiven Zentrum dieser RNA-Struktur identifiziertes  $Mg^{2+}$ -Ion, dessen Beteiligung an der katalytischen Reaktion selbst diskutiert wird, ist orange gekennzeichnet; **d)** GlcN6P-vermitteltes Ribozym/Riboswitch RNA-Motiv aus *Bacillus anthracis* in Komplex mit GlcN6P (pdb: 2NZ4) (31). Entsprechend der Darstellung der Kristallstrukturen von Riboswitch-RNA Aptamerdomänen in Abbildung 1.2, ist auch für das GlcN6P-vermittelte Ribozym/Riboswitch RNA-Motiv der Ligand als Strukturformel angegeben (grau hinterlegt) und im RNA-Ligand Komplex in der Kugeldarstellung gekennzeichnet (blau).  $Mg^{2+}$ -Ionen, für die in der Kristallstruktur die Beteiligung an  $Mg^{2+}$ -vermittelten RNA-Ligand-Interaktionen identifiziert wurde, sind orange gekennzeichnet.

Des Weiteren wurden für einige Ribozym-Motive Tertiärstrukturinteraktionen identifiziert, deren Ausbildung die jeweilige katalytische Funktion essentiell beeinflussen. Eine stabilisierte pre-katalytische Struktur des *hammerhead* Ribozym-Motivs aus *S. mansoni* (28) zeigt beispielsweise die Ausbildung von Tertiärinteraktionen zwischen Nukleotiden, die strukturell dem aktiven Zentrum entfernt sind. Diese weit reichenden Tertiärinteraktionen beeinflussen auch die Konformation des aktiven Zentrums und führen im Vergleich zu verkürzten minimalen RNA-Konstrukten zu signifikant erhöhter Aktivität des Ribozym-Motivs und einer Reduktion der für die katalytische Aktivität essentiell erforderlichen  $Mg^{2+}$ -Konzentration (28, 32, 33).

Das *hairpin* Ribozym-Motiv wird durch zwei Domänen beschrieben, die eine Vierwege-Kreuzung bilden, wobei auch in einem Minimalkonstrukt mit einer Zweifurche-Kreuzung katalytische Aktivität beobachtet wurde (20). Diese vom aktiven Zentrum entfernt lokalisierten zusätzlichen Helices der natürlichen RNA-Sequenz führen, analog der Situation im *hammerhead* Ribozym-Motiv, im Vergleich zum Minimalkonstrukt zu einer Reduktion der essentiell erforderlichen  $Mg^{2+}$ -Konzentration (34, 35). Die Ausbildung eines intramolekularen Kontakts der beiden Domänen wurde als essentielle Voraussetzung für die katalytische Aktivität ermittelt (36, 37). Die Kristallstruktur eines stabilisierten Übergangszustandes des *hairpin* Ribozym-Motivs bestätigt die Ausbildung von intramolekularen Tertiärinteraktionen, die unter anderem eine intramolekulare Watson-Crick-Basenpaarung zwischen Nukleotiden der beiden Domänen einschließen (29) (siehe Kapitel 6).

## SENSORISCHE RNA-MOTIVE

Eine Regulation der Genexpression ohne initiale Beteiligung von Proteinen wurde als die biologische Funktion verschiedenster sensorischer RNA-Motive ermittelt (38). Allgemein definiert handelt es sich hierbei um strukturierte Bereiche von mRNAs, für die ein spezifisches internes oder externes zelluläres Signal zu einer strukturellen Veränderungen der RNA-Konformation oder der Initiierung der mRNA-Spaltung führt, die im Folgenden die Expression der entsprechenden Gene beeinflusst. Die zu Grunde liegenden Regulationsmechanismen variieren stark und unterliegen verschiedensten strukturellen und dynamischen Aspekten. Sie können sich sowohl negativ als auch positiv auf die Genexpression auswirken, *in cis* oder *trans* agieren und verschiedenste zelluläre Prozesse, beispielsweise die Transkription oder die Translation, beeinflussen.

Die *cis*-regulierenden RNA-Motive sind meist in 5'-nichttranslatierten Bereichen (5'-*untranslated region*, 5'-UTR) lokalisiert und fungieren als Sensoren, die auf Veränderungen der direkten Umgebung in Form einer Konformationsänderung reagieren und daraufhin die Genexpression modulieren. Diese strukturierten RNA-Motive können als Rezeptoren für verschiedenste RNAs oder spezifische Metaboliten fungieren oder auch auf physikalische Signale wie beispielsweise die Temperatur ansprechen (39). Die Interaktion mit diesen Komponenten bzw. der verursachte Effekt führt zu einer Umstrukturierung der 5'-UTR der mRNA und beeinflusst im Folgenden die Expression des entsprechend 3'-nachfolgenden Gens. Die Möglichkeit von RNA-Motiven, als zelluläre Regulationsfaktoren zu agieren, ist durch verschiedene Aspekte begünstigt. (i) Die große strukturelle Flexibilität von RNAs ermöglicht die spezifische Erkennung verschiedenster regulatorischer Signale. (ii) RNAs können durch allosterische Umstrukturierungen in Abhängigkeit des jeweiligen Signals zelluläre Prozesse beeinflussen. Modulationen weitreichender RNA-Interaktionen in Folge einer lokalen strukturellen Veränderung ermöglichen dabei auch die Signalübermittlung zwischen verschiedenen Domänen. (iii) Eine intrinsische Eigenschaft von RNAs besteht darin, in zahlreiche genregulatorische Prozesse involviert zu sein. Die Modulation von RNA-Strukturen in Abhängigkeit eines Signals kann somit die Genexpression auf verschiedensten Ebenen beeinflussen.

In Abhängigkeit des jeweilig auslösenden Signals können sensorische RNA-Motive in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen (Kapitel 3-5) sollen im Folgenden einige strukturelle und kinetische Aspekte der Metabolit-abhängigen Regulation der Genexpression durch so genannte Riboswitch-RNA Elemente eingeführt werden.

### **Riboswitch-vermittelte Genregulation**

Riboswitch-RNAs sind eine Klasse *cis*-regulatorischer Strukturelemente, die bisher vorwiegend in den 5'-nichttranslatierten Bereichen von bakteriellen mRNAs identifiziert wurden und Genexpression auf verschiedensten Ebenen beeinflussen (40, 41). Es handelt sich dabei um strukturierte RNA-Elemente, die als Rezeptoren für spezifische Metaboliten auftreten. Der diesen RNA-Elementen zu Grunde liegende Gen-Regulationsmechanismus beruht generell auf einer RNA-Konformationsänderung, die in Abhängigkeit der Konzentration des spezifischen Metaboliten hervorgerufen wird und infolge dessen die Genexpression beeinflusst. Es wird ein modularer Aufbau dieser RNA-Elemente angenommen, charakterisiert durch eine hoch konservierte 'Aptamerdomäne' und eine 'Expressionsplattform' (42). Die Aptamerdomäne stellt

dabei die Ligand-Bindungsdomäne dar, deren Struktur durch die Gegenwart des spezifischen Metaboliten bestimmt wird. Das Modell der Regulation durch Riboswitch-RNA Elemente schlägt vor, dass in Abhängigkeit der Ligandkonzentration eine der möglichen alternativen RNA-Konformationen der Aptamerdomäne stabilisiert wird, was dann wiederum im Folgenden zur Ausbildung oder Destabilisierung des 3'-nachfolgenden Strukturelementes, der Expressionsplattform, führt. Die alternativ stabilisierten Strukturen der Expressionsplattform führen zur Modulation der Genexpression. Für die Kontrolle der Genexpression wurden verschiedenste Mechanismen identifiziert. In zahlreichen bakteriellen Spezies wurden Riboswitch-RNA Elemente identifiziert, die eine Genexpression sowohl auf der Ebene der Transkription oder auch der Translation modulieren. Einen Sonderfall stellt beispielsweise die GlcN6P-vermittelte Riboswitch-RNA dar, welche die mRNA-Prozessierung reguliert. Die Ligandbindung führt in dem zu Grunde liegenden Mechanismus, analog des von Ribozym-Motiven katalysierten Mechanismus, zu einer spezifischen Spaltung der RNA (siehe 'Katalytische RNA-Motive'). Eine Riboswitch-vermittelte Transkriptionskontrolle erfolgt generell durch die alternative Stabilisierung von Terminator- bzw. Antiterminator-Strukturen, und die Translation wird durch die strukturelle Verfügbarkeit der *Shine-Dalgarno* (SD) Sequenz bestimmt (39). Des Weiteren wurden Riboswitch-RNA Elemente auch in eukaryotischen Spezies identifiziert, die hier beispielsweise einen alternativen Spleißprozess der mRNA regulieren oder die 3'-Prozessierung kontrollieren (43-46).

Bislang charakterisierte natürlich vorkommende Riboswitch-RNA Elemente erkennen bzw. binden verschiedenste spezifische Metaboliten: die Aminosäuren Lysin (47) oder Glycin (48), die Nukleobasen Adenin (49), Guanin (50) oder preQ1 (7-Aminomethyl-7-Deazaguanin) (51, 52), die Nukleosid-Analoga 2'-Desoxyguanosin (53) oder zyklisches di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) (54), die Coenzyme B<sub>12</sub> (5'-Desoxy-5'-Adenosylcobalamin) (55), Flavinmononukleotid (FMN) (56), Thiaminpyrophosphat (TPP) (43, 45, 46, 57-59) oder S-Adenosylmethionin (SAM) (60-66), den Cofaktor Glucosamin-6-Phosphat (GIN6P) (67) oder Mg<sup>2+</sup>-Ionen (68). Die Riboswitch-RNA Elemente sind dabei oft an der Regulation derjenigen Gene beteiligt, deren Produkte in die Biosynthese, den Metabolismus und/oder den Transport des jeweilig spezifischen Metaboliten involviert sind und ermöglichen damit einen Rückkopplungsmechanismus. Zusätzlich wurden weitere komplexere Riboswitch-RNA Elemente identifiziert, deren Mechanismus beispielsweise die kooperative Bindung von Liganden erfordert (48) oder abhängig ist vom Zusammenwirken direkt nachfolgender Tandem-Riboswitch-Elemente, die spezifisch unterschiedliche Liganden binden (69). Computer-basierte vergleichende Genomik-

Untersuchungen lassen zudem weitere Riboswitch-RNA Elemente in verschiedensten Spezies vermuten (70, 71).

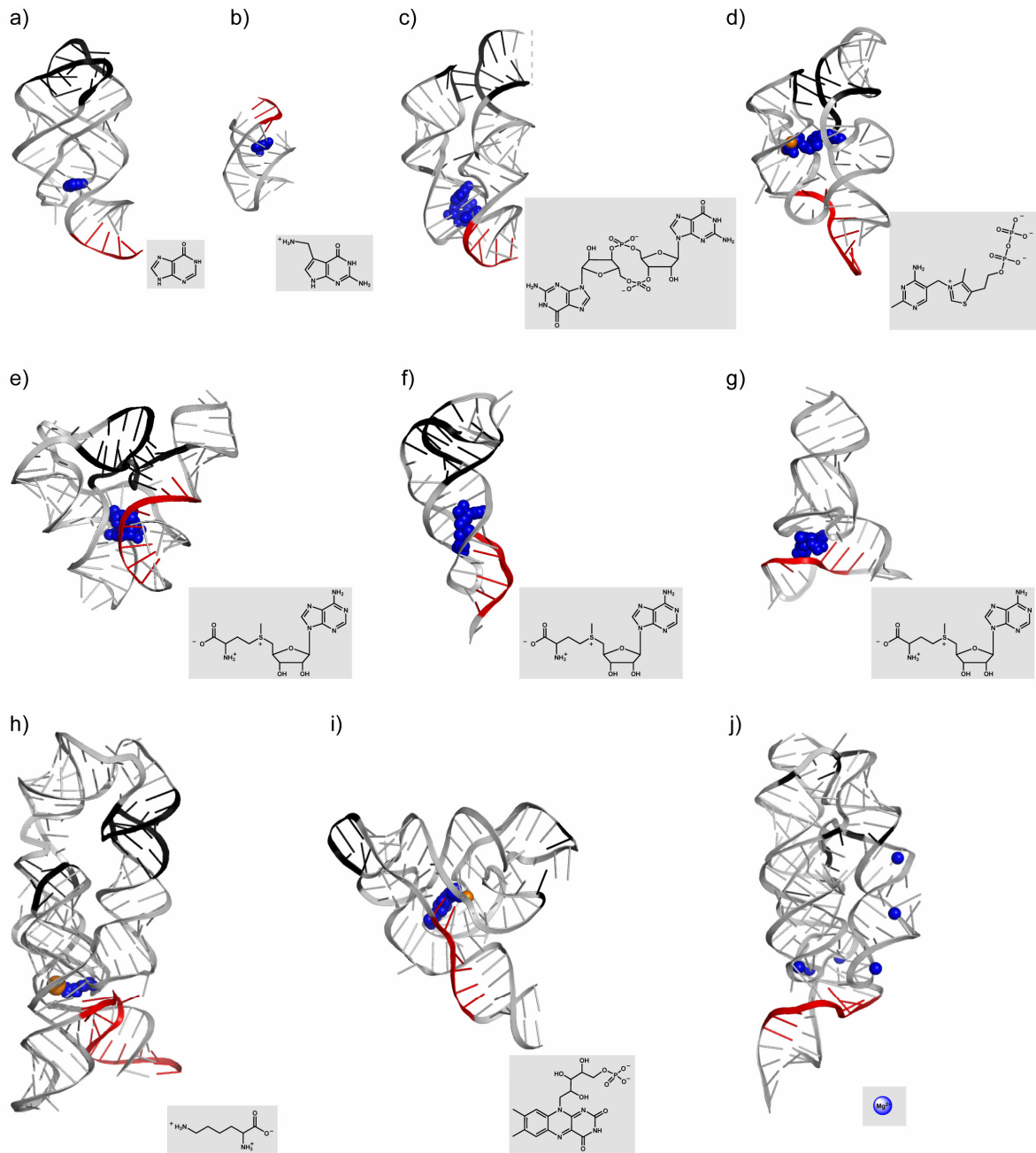
### **Strukturen Ligand-gebundener Riboswitch-RNAs**

Die präzise Regulation des jeweiligen zellulären Prozesses stellt verschiedene Anforderungen an Riboswitch-RNAs. Die Riboswitch-RNA Elemente müssen nicht nur entsprechend der Konzentration des Metaboliten durch die jeweils alternativ stabilisierte RNA-Konformation ein regulatorisches Signal übermitteln, sondern auch selektiv nur auf den spezifischen Metaboliten ansprechen. Diese Prozesse werden in den verschiedenen Riboswitch-RNA Elementen durch die Beteiligung unterschiedlichster Sekundär- und Tertiärstrukturen realisiert. Im Sinne der Genregulation sind die beiden Prozesse miteinander gekoppelt; dennoch konnte gezeigt werden, dass die Aptamerdomänen die jeweils spezifischen Metaboliten auch in Abwesenheit der vollständigen Expressionsplattform binden. Riboswitch-RNA Elemente sind erstaunlich spezifisch, so dass bereits geringe strukturelle Modifikationen des natürlichen Metaboliten eine signifikante Abnahme der Bindungsaffinität bewirken. Riboswitch-RNAs unterscheiden beispielsweise zwischen Metaboliten aufgrund relevanter funktioneller Gruppen (49, 50, 56, 72), der Molekülgröße (57, 72), der Stereochemie (47) oder Ladungen des Moleküls (66).

Die Aufklärung zahlreicher Kristallstrukturen von Ligand-gebundenen Aptamerdomänen der Riboswitch-RNAs illustrieren, wie diese meist hoch konservierten RNA-Domänen die Bindung des jeweils spezifischen Metaboliten realisieren. Dabei weisen die verschiedenen Strukturen zahlreiche Unterschiede auf, wie beispielsweise der inter- und intramolekularen Sekundär- und Tertiärstrukturelemente, der Größe oder der Organisation der globalen Architektur (73-75). Die preQ1 Riboswitch-RNA stellt mit 34 Nukleotiden (nt) beispielsweise die bisher kleinste charakterisierte Kristallstruktur einer natürlich vorkommenden Ligand-gebundenen Riboswitch-RNA Aptamerdomäne dar (76). Das Gegenstück dazu bildet die Kristallstruktur der Lysin Riboswitch-RNA Aptamerdomäne, die 174 Nukleotide umfasst (77).

Die hohe Spezifität und Selektivität der Riboswitch-RNAs für den jeweiligen Metaboliten wird oft durch die Ausbildung komplexer Ligand-Bindungstaschen hervorgerufen. Kristallstrukturen der RNA-Ligand Komplexe zeigen, dass die Strukturierung der Bindungstaschen durch zahlreiche Strukturelemente bestimmt wird. Dabei werden sowohl zahlreiche intramolekulare Tertiärstruktur motive als auch intermolekulare RNA-Ligand-Wechselwirkungen ausgebildet. Diese Wechselwirkungen umfassen elektrostatische und hydrophobe Interaktionen sowie zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen und die Ausbildung verschiedenster kanonischer und

nicht-kanonischer Struktur motive, wie beispielsweise Basentripel oder -quadrupel (73, 74, 78) (Abbildung 1.2).



**Abbildung 1.2:** Kristallstrukturen von Riboswitch-RNA Aptamerdomänen in Komplex mit dem jeweilig spezifischen Liganden. Der entsprechende Ligand ist als Strukturformel angegeben (grau hinterlegt) und im RNA-Ligand Komplex in der Kugeldarstellung gekennzeichnet (blau). RNA-Sequenzbereiche, von denen im jeweiligen Riboswitch-RNA Regulationsmechanismus die Beteiligung an alternativen/regulierenden Strukturelementen angenommen wird, sind in rot gekennzeichnet. RNA-Strukturbereiche, die in weit reichende Tertiärstrukturelemente involviert sind und somit die globale RNA-Architektur definieren, sind in schwarz hervorgehoben. Für die



Ligandbindung als essentiell identifizierte Kationen sind in der Kugeldarstellung (orange) gekennzeichnet; **a**) Guanin Riboswitch-RNA (68nt) aus *Bacillus subtilis* in Komplex mit Hypoxanthin (pdb: 1U8D) (79). Die Kristallstrukturen der Adenin-abhängigen (80) und einer modifizierten 2'-Desoxyguanosin-abhängigen (81) Riboswitch-RNA Aptamerdomäne zeigen ähnliche globale Architekturen und sind aus diesem Grund hier nicht dargestellt; **b**) preQ1 Riboswitch-RNA (34nt) aus *Bacillus subtilis* in Komplex mit preQ1 (pdb: 3FU2) (76); **c**) c-di-GMP Riboswitch-RNA (88nt) aus *Vibrio cholerae* in Komplex mit c-di-GMP (3IRW) (82) (die ausschließlich zur Kristallisation zusätzlich eingeführten Elemente sind nicht dargestellt; deren Position ist durch die graue gestrichelte Linie gekennzeichnet); **d**) TPP Riboswitch-RNA (80nt) aus *Escherichia coli* in Komplex mit TPP ( $Mg^{2+}$ -Ionen sind orange gekennzeichnet) (2GDI) (83). Während weitere Kristallstrukturen von TPP-vermittelten Riboswitch-Elementen aus verschiedenen Organismen (72, 84) zeigen, dass sich deren molekulare Liganderkennung unterscheidet, ist die globale Architektur jeweils vergleichbar; **e**) SAM-I Riboswitch-RNA (94nt) aus *Thermoanaerobacter tengcongensis* in Komplex mit SAM (2GIS) (85); **f**) SAM-II Riboswitch-RNA (52nt) aus  $\alpha$ -Proteobakterien (*Saragossa Sea* Metagenom) in Komplex mit SAM (2QWY) (86); **g**) SAM-III Riboswitch-RNA (53nt) aus *Enterococcus faecalis* in Komplex mit SAM (3E5C) (87); **h**) Lysin Riboswitch-RNA (174nt) aus *Thermotoga maritima* in Komplex mit Lysin ( $K^+$ -Ion ist orange gekennzeichnet) (pdb: 3DIL) (77); **i**) FMN Riboswitch-RNA (112nt) aus *Fusobacterium nucleatum* in Komplex mit FMN ( $Mg^{2+}$ -Ion ist orange gekennzeichnet) (pdb: 3F2Q) (88); **j**)  $Mg^{2+}$ -abhängige Riboswitch-RNA Element (161nt) aus *Bacillus subtilis* in Komplex mit  $Mg^{2+}$  (pdb: 2QBZ) (89).

Die komplexen Architekturen der RNA-Ligand Komplexe werden häufig zusätzlich durch Kationen stabilisiert. Für einige Liganden, wie beispielsweise TPP (72, 83, 84), FMN (88) oder Lysin (77), wird außerdem deren negative Ladung durch Kationen kompensiert, indem die entsprechend funktionellen Gruppen über Kationen-vermittelte Interaktionen mit der RNA verknüpft werden. Zusätzlich wurde ein Riboswitch-RNA Element identifiziert, dessen regulatorische RNA-Konformationsänderung ausschließlich durch  $Mg^{2+}$ -Ionen vermittelt wird (89). Die Kristallstruktur der  $Mg^{2+}$ -abhängigen Riboswitch-RNA aus *B. subtilis* in Komplex mit  $Mg^{2+}$  zeigt, dass  $Mg^{2+}$ -Ionen dabei sowohl lokale Konformationsänderungen induzieren als auch die Ausbildung von Tertiärinteraktionen vermitteln. Durch die Bindung der  $Mg^{2+}$ -Ionen wird eine kompakte RNA-Struktur stabilisiert, die auch den RNA-Sequenzbereich einschließt, von welchem die Beteiligung am Gen-Regulationsmechanismus angenommen wird.

Für den Metaboliten S-Adenosylmethionin wurden bisher fünf verschiedene Klassen von Riboswitch-RNA Elementen mit unterschiedlichen Strategien der Liganderkennung identifiziert (60-62, 64-66, 90). Die Kristallstrukturen der RNA-Ligand Komplexe der Riboswitch-Elemente SAM I-III zeigen, dass sich in den RNA-Ligand Komplexen nicht nur die jeweilige

Ligandbindung unterscheidet, sondern auch die globalen RNA-Architekturen und sogar die Konformation, die der jeweils gebundene Ligand selbst einnimmt (85-87). In der Kristallstruktur der SAM-I Riboswitch-RNA aus *T. tengcongensis* ist der Ligand in einer kompakten Konformation stabilisiert, in welcher die beiden Untereinheiten, die Adenosyleinheit und die Seitenkette, strukturell übereinander angeordnet sind. Neben zahlreichen Wechselwirkungen mit der RNA wird die Konformation des gebundenen Liganden so auch durch intramolekulare  $\pi$ -Kation-Stapelwechselwirkungen stabilisiert (85). Im Gegensatz dazu ist der Ligand in der Kristallstruktur einer SAM-II Riboswitch-RNA durch zahlreiche intermolekulare Wechselwirkungen in einer eher gestreckten Konformation stabilisiert (86).

Durch die Bindung des jeweilig spezifischen Metaboliten werden verschiedenste Sekundär- und Tertiärstrukturen der Aptamerdomäne stabilisiert. Dies schließt für viele Riboswitch-RNA Elemente auch den Sequenzbereich ein, der in den vorgeschlagenen Modellen der Gen-Regulationsmechanismen in Abwesenheit des Liganden zu alternativ stabilisierten Strukturen im Bereich der Expressionsplattform führen würde. Dieser Sequenzbereich repräsentiert demzufolge eine strukturelle Verknüpfung zwischen der Aptamerdomäne und der Expressionsplattform bzw. definiert die Übermittlung des Ligandbindungszustandes in das genregulatorische Signal. In vielen Riboswitch-RNA Elementen ist der RNA-Strang am 3'-Ende der jeweiligen Helix P1 je nach Ligandbindungszustand in alternativ stabilisierte Strukturelemente involviert (Abbildung 1.2). Eine Ausnahme bildet beispielsweise die SAM-III Riboswitch-RNA, für welche die *Shine-Dalgarno* Sequenz Teil der Ligand-Bindungsregion selbst ist bzw. teilweise sogar direkt an der Ligandbindung partizipiert (62, 87).

Die Ausbildung weit reichender RNA-RNA-Tertiärinteraktionen bestimmt die globale Architektur zahlreicher Riboswitch-RNA Aptamerdomänen, die oft zusätzlich auch als essentiell für die Funktion bzw. die Ligandbindung ermittelt wurde (Abbildung 1.2). Im Folgenden wird eine Auswahl dieser weit reichenden Tertiärinteraktionen vorgestellt, deren Relevanz in biochemischen und/oder kristallographischen Untersuchungen ermittelt wurde.

Die Kristallstruktur der TPP Riboswitch-RNA aus *E. coli* in Komplex mit TPP zeigt beispielsweise, dass die RNA-Architektur hierbei durch verschieden Elemente stabilisiert wird. Die Ligandbindung selbst führt zu einer Verbrückung der helikalen Elemente, zusätzlich werden aber auch zwischen dem Ligand entfernt lokalisierten Strukturbereichen Tertiärinteraktionen ausgebildet. Diese weit reichenden Tertiärinteraktionen bilden ein interhelikales Helix-Schlaufen-Strukturmotiv aus, das durch Kationen stabilisiert wird (83). Die Ausbildung dieser

Tertiärinteraktionen induziert in Folge die Stabilisierung der globalen RNA-Architektur (72, 83, 84) (siehe Abschnitt 'Kinetik regulatorischer Prozesse von Riboswitch-RNAs').

Die Kristallstruktur der Ligand-gebundenen SAM-I Riboswitch-RNA aus *T. tengcongensis* weist eine komplexe dreidimensionale Struktur auf, die neben den intra- und intermolekularen Wechselwirkungen der Ligand-Bindungstasche zahlreiche davon entfernt lokalisierte Tertiärinteraktionen, darunter beispielsweise eine Pseudoknotenstruktur, ausbildet (85). Die Kristallstruktur einer SAM-II Riboswitch-RNA zeigt, wie die globale Architektur durch zahlreiche Tertiärinteraktionen einer Adenin-reichen Schlaufenregion mit einem helikalen Element stabilisiert wird (86). Im Gegensatz dazu konnten in der SAM-III Riboswitch-RNA Aptamerdomäne aus *E. faecalis* neben den Tertiärkontakten in der Ligand-Bindungsregion keine zusätzlichen weit reichenden Tertiärstrukturelemente beobachtet werden (87).

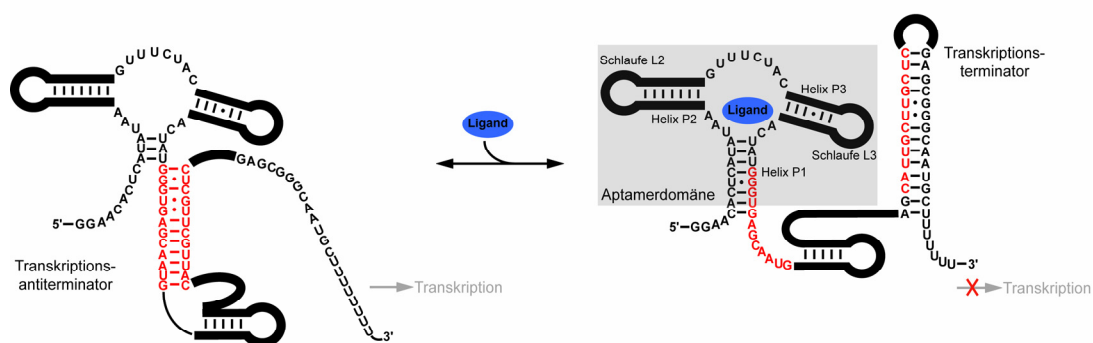
Die Kristallstruktur der c-di-GMP Riboswitch-RNA aus *V. cholerae* in Komplex mit c-di-GMP zeigt ebenfalls die Ausbildung zahlreicher weit reichender Tertiärinteraktionen, die der Bindungstasche entfernt lokalisiert sind, jedoch die globale RNA-Architektur stabilisieren. Ein Tertiärstrukturmotiv wird hierbei durch interhelikale Interaktionen einer apikalen Vierfach-Schleife mit einer entsprechenden Rezeptorsequenz ausgebildet. Die Anordnung der Helices wird des Weiteren durch interhelikale Ribose-Ribose-Wechselwirkungen und eine interhelikale Watson-Crick-Basenpaarungsinteraktion stabilisiert (82).

Die 174nt-Sequenz der Lysin Riboswitch-RNA Aptamerdomäne aus *T. maritima* wird durch zwei Bereiche weit reichender interhelikaler Tertiärinteraktionen stabilisiert (77). Zum einen bildet sich eine interhelikale Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung aus, und zum anderen wird die parallele Anordnung zweier Helices durch verschiedene Schlaufen-Helix-Interaktionen stabilisiert. Biochemische Untersuchungen der Lysin Riboswitch-RNA aus *B. subtilis* zeigten, dass die Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung auch in Abwesenheit des Liganden Lysin ausgebildet wird, die stabil ausgebildete Tertiärinteraktion aber keine essentielle Voraussetzung für Ligandbindung darstellt. Eine effiziente Lysin-vermittelte Termination der Transkription wurde allerdings nur in Gegenwart der ausgebildeten Tertiärinteraktion beobachtet (91).

In Kristallstrukturen der Ligand-gebundenen Aptamerdomänen der Adenin- und Guanin-abhängigen Riboswitch-RNA Elemente konnte die Ausbildung eines Tertiärstrukturmotivs ermittelt werden, das die apikalen Schlaufen der Helices P2 und P3 in einer interhelikalen Schlaufen-Schlaufen-Interaktion miteinander verbindet und so zu einer kompakten Anordnung der Helices führt (79, 80) (Abbildung 1.4). In NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Guanin Riboswitch-RNA Aptamerdomäne aus *B. subtilis* konnte die Ausbildung dieser Tertiärinteraktionen bereits in der freien RNA beobachtet werden (92) (siehe Kapitel 3-5).

## Guanin-abhängige Riboswitch-RNA

Die Konsensussequenz der Guanin Riboswitch-RNA Aptamerdomäne wurde in nicht-kodierenden Bereichen verschiedener bakterieller mRNAs identifiziert (50, 93). In *Bacillus subtilis* wird beispielsweise die Expression des *xpt-pbuX* Operons durch ein Guanin-abhängiges Riboswitch-RNA Element reguliert (50, 94). Das *B. subtilis* *xpt-pbuX* Operon kodiert beispielsweise für eine Xanthin-Phosphoribosyl-Transferase und eine Xanthin-spezifische Purinpermease (95). Diese Guanin Riboswitch-RNA reguliert die Transkription, indem infolge der Ligandbindung an die Aptamerdomäne eine 3'-nachgelagerte Terminatorstruktur ausgebildet wird (50). Die Bindung des Liganden führt somit zu einem vorzeitigen Abbruch der Transkription, wohingegen in Abwesenheit des Liganden eine Antiterminatorstruktur ausgebildet wird, die eine vollständige Transkription der mRNA zulässt (50) (Abbildung 1.3).

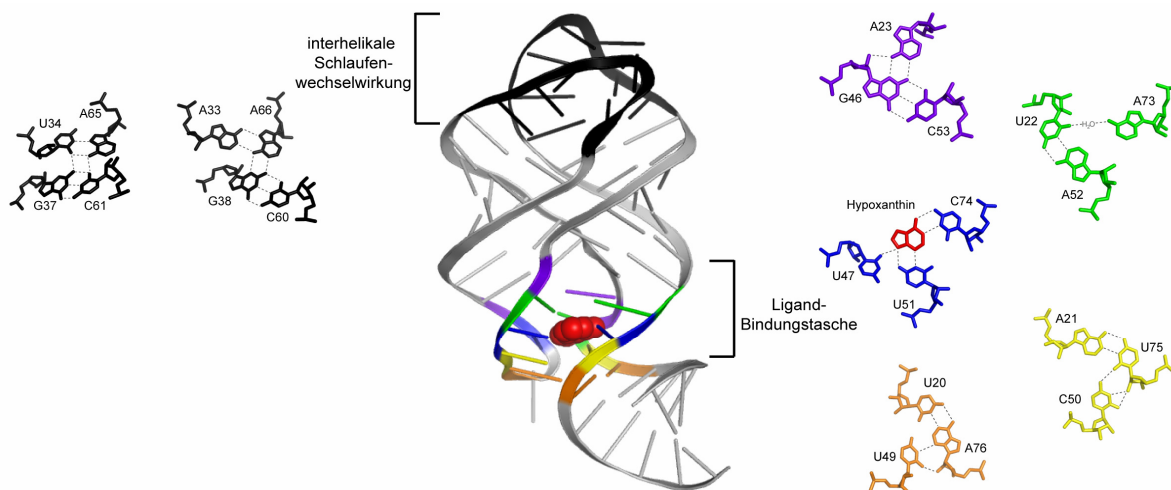


**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung des postulierten Regulationsmechanismus der Guanin Riboswitch-RNA des *xpt-pbuX* Operons aus *B. subtilis* (50). Die strukturellen Bereiche, die in dem zu Grunde liegenden Regulationsmechanismus in alternative Strukturelemente involviert sind, sind rot hervorgehoben. In Anwesenheit des Liganden wird Helix P1 der Aptamerdomäne stabilisiert und eine Terminatorstruktur ausgebildet, die zum vorzeitigen Abbruch der Transkription führt.

Die Sekundärstruktur der Guanin-abhängigen Riboswitch-RNA Aptamerdomäne ist durch drei Helices (P1, P2 und P3) charakterisiert, die um eine Drei-Wege-Kreuzung angeordnet sind (Abbildungen 1.3 und 4.1). Helices P2 und P3 schließen jeweils mit einer apikalen Schleife (L2 und L3) ab. Der RNA-Strang am 3'-Ende von Helix P1 ist im Modell des Gen-Regulationsmechanismus der Guanin Riboswitch-RNA des *xpt-pbuX* Operons aus *B. subtilis* im Kontext der vollständigen Riboswitch-RNA-Sequenz je nach Ligandbindungszustand in alternative Konformationen involviert (Abbildungen 1.2 und 1.3).

Die Kristallstrukturen der Ligand-gebundenen Aptamerdomäne der Guanin-abhängigen Riboswitch-RNA weisen eine komplexe Architektur auf (79, 80). Die Struktur des RNA-Ligand Komplexes entspricht einer 'Y'-ähnlichen Form, in welcher die Helices parallel angeordnet sind (96). Dabei können zwei strukturelle Bereiche mit zahlreichen komplexen Tertiärstrukturwechselwirkungen identifiziert werden (Abbildung 1.4).

Die Ausbildung der Ligand-Bindungstasche ist durch zahlreiche Wechselwirkungen stabilisiert und führt dazu, dass der heterozyklische Ligand fast vollständig umschlossen wird. In der Kristallstruktur des RNA-Hypoxanthin Komplexes konnten 97.8 % der Ligandoberfläche als dem Lösungsmittel unzugänglich ermittelt werden (79). Der Ligand selbst ist in ein intermolekulares Basenquadrupel involviert. Dabei sind nahezu alle funktionellen Gruppen des Liganden an Wasserstoffbrückenbindungen mit der Riboswitch-RNA beteiligt (Abbildung 1.4). Dieses intermolekulare Basenquadrupel wird zusätzlich sowohl oberhalb (durch das Wasser-vermittelte Basentripel U22-A52-A73 und das Basentripel A23-G46-C53) als auch unterhalb (Basentripel U20-A76-U49 und Basentripel A21-U75-C50) durch aufeinander gestapelte Basentripel umschlossen.



**Abbildung 1.4:** Kristallstruktur der Guanin Riboswitch-RNA Aptamerdomäne des *xpt-pbuX* Operons aus *B. subtilis* in Komplex mit dem Liganden Hypoxanthin (79). Die Bereiche komplexer Tertiärstrukturinteraktionen sind jeweils detailliert dargestellt und farblich annotiert (80). Die interhelikale Schlaufenwechselwirkung wird vorwiegend durch die Ausbildung zweier Basenquadrupel definiert (schwarz). Der Ligand selbst (rot) ist durch zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen in ein intermolekulares Basenquadrupel mit der RNA involviert (blau). Zusätzlich wird die Ligand-Bindungstasche durch ober- (violett, grün) und unterhalb (orange, gelb) angeordnete Basentripel strukturiert.

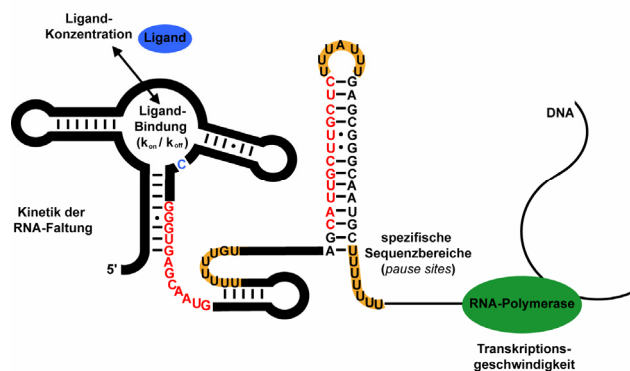
Die molekulare Erkennung des Liganden Guanin/Hypoxanthin erfolgt über eine Watson-Crick Wechselwirkung mit dem entsprechend komplementären Nukleotid an einer spezifischen Sequenzposition (Cytosin 74) der Riboswitch-RNA (97). Eine Mutation dieser Sequenzposition (C74→U) konvertiert die Spezifität der Riboswitch-RNA und ermöglicht nun die Bindung des zuvor nicht spezifisch erkannten Purinliganden Adenin (98) (siehe Kapitel 4). Die N3/N9-Seite des Liganden wird durch das Nukleotid U51 gebunden, und die Kristallstrukturen lassen zusätzlich eine Wasserstoffbrücke vom N9-Atom des Liganden zum Nukleotid U47 vermuten (79, 80). Das N7-Atom auf der Hoogsteen-Seite des Purins bildet außerdem eine Wasserstoffbrücke zur 2'-OH-Gruppe des Nukleotids U22, welches in das direkt oberhalb angeordnete Basentripel (Wasser-vermitteltes Basentripel U22-A52-A73) involviert ist (Abbildung 1.4). Die Guanin Riboswitch-RNA bindet die Liganden Guanin ( $K_D \sim 5$  nM) und Hypoxanthin ( $K_D \sim 50$  nM) mit hoher Affinität und Spezifität, wohingegen für die Nukleobase Adenin lediglich ein  $K_D$  von  $\sim 300$   $\mu$ M bestimmt wurde (50). Kristallstrukturen (79, 80) und NMR-spektroskopische Untersuchungen (97) der RNA-Ligand Komplexe deuten an, dass die exozyklische  $\text{NH}_2$ -Gruppe an Position 2 des Purinliganden zwar für die spezifische Bindung des Liganden nicht essentiell ist, aber die höhere Affinität der RNA für den Ligand Guanin im Vergleich zu Hypoxanthin zur Folge hat. Durch diese zusätzliche funktionelle Gruppe des Liganden Guanin können weitere Wasserstoffbrückenbindungen mit den Carbonyl-Gruppen der Nukleotide C74 und U51 ausgebildet werden.

Die Organisation der globalen Architektur der Guanin Riboswitch-RNA Aptamerdomäne wird zusätzlich durch interhelikale Wechselwirkungen der apikalen Schlaufenregionen (L2 und L3) bestimmt. Diese bilden ein Schlaufen-Schlaufen Strukturmotiv (*kissing loop interactions*), das zu der kompakten, parallelen Anordnung der Helices P2 und P3 führt (nachfolgend als interhelikale Schlaufeninteraktion bezeichnet). Diese interhelikalen Interaktionen werden wesentlich durch die Ausbildung zweier interhelikaler Basenquadrupel bestimmt (Abbildungen 1.2 und 1.4). Dabei werden zwei interhelikale Watson-Crick GC-Basenpaarungsinteraktionen (G37-C61 und G38-C60), eine interhelikale AU-Basenpaarungsinteraktion (U34-A65) und eine interhelikale AA-Basenpaarungsinteraktion (A33-A66) ausgebildet. Die Nukleotide G62 und U63 der Schlaufe L3 sind durch Stapelwechselwirkungen oberhalb der Basenquadrupel stabilisiert und schließen das Schlaufen-Schlaufen-Strukturmotiv ab. Das Nukleotid G32 der Schlaufe L2 wird durch Stapelwechselwirkungen zwischen der Helix P2 und den Basenquadrupel-Motiven der interhelikalen Schlaufeninteraktion positioniert (siehe Kapitel 4).

## Kinetik regulatorischer Prozesse von Riboswitch-RNAs

Die Kinetik der Ligand-induzierten RNA-Faltungsprozesse und der Übermittlung des Ligandbindungszustandes der Aptamerdomäne in die regulatorische RNA-Konformation der Expressionsplattform stellen essentielle Aspekte für das Verständnis dieser Gen-Regulationsmechanismen dar (99).

Eine Vielzahl bisher identifizierter Riboswitch-RNA Elemente regulieren die Genexpression auf der Ebene der Transkription. Dem zu Grunde liegenden Modell zufolge, führt hier ein der Aptamerdomäne 3'-nachgelagertes Terminator-Strukturelement zum vorzeitigen Abbruch der Transkription. Denkbare thermodynamische und kinetische Faktoren, die einen transkriptionalen Gen-Regulationsmechanismus beeinflussen könnten, sind am Beispiel der Guanin Riboswitch-RNA aus *B. subtilis* in Abbildung 1.5 schematisch dargestellt (100).



**Abbildung 1.5:** Schematische Darstellung von denkbaren kinetischen und thermodynamischen Faktoren, die, gezeigt am Beispiel der Guanin Riboswitch-RNA aus *B. subtilis*, einen Transkriptions-Regulationsmechanismus beeinflussen könnten (modifiziert nach (100)).

In Abhängigkeit der Ligandkonzentration müssen die Prozesse der RNA-Faltung, der Ligandbindung und der je nach Ligandbindungszustand induzierten Strukturausbildung der Expressionsplattform demnach in einem Zeitfenster stattfinden, in dem ein regulatorisches Signal Einfluss auf die Transkription hat. Dieses Zeitfenster wird durch die Transkriptionsgeschwindigkeit der RNA-Polymerase in diesem spezifischen Sequenzbereich bestimmt. Die Transkriptionsgeschwindigkeit kann wiederum (neben Faktoren wie beispielsweise rNTP- oder  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen) durch mögliche intrinsische Faktoren, wie beispielsweise spezifische Sequenzbereiche die zu langsameren Transkriptionsgeschwindigkeiten der RNA-Polymerase führen (*pause sites*) (101) oder auch durch Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise NusA (102) beeinflusst werden (103). Die verschiedenen Prozesse könnten

möglicherweise auch miteinander gekoppelt sein. So ist vorstellbar, dass neben der Ligandkonzentration eine strukturelle Organisation der weit reichenden Tertiärstrukturelemente der Riboswitch-RNA Aptamerdomäne auch die Geschwindigkeit der Ligandbindung beeinflusst. Die Faltung der Tertiärstrukturelemente könnte wiederum durch zusätzliche Faktoren wie beispielsweise die vorliegende  $Mg^{2+}$ -Konzentration beeinflusst sein.

Ein transkriptional-vermittelter Riboswitch-RNA Regulationsprozess kann denkbar kinetisch oder thermodynamisch kontrolliert sein oder die Transkription durch eine Kombination der entsprechenden Faktoren beeinflussen. Eine thermodynamische Kontrolle des Prozesses beschreibt ein Modell, für welches die konzentrationsabhängige RNA-Ligand Komplexbildung stattfindet, bevor die RNA-Polymerase den für die regulatorische Funktion verantwortlichen Sequenzbereich erreicht. Falls die Kinetik der RNA-Faltung und der Ligandbindung der Riboswitch-RNA Aptamerdomäne nicht in diesem Zeitfenster stattfinden, unterliegt der Regulationsprozess demnach einer kinetischen Kontrolle.

Bislang kinetisch untersuchte Ligand-induzierte Faltungsprozesse schließen die durch FMN- (103), TPP- (104), c-di-GMP- (82) und Purin-vermittelten (98, 105-107) Riboswitch-RNA Elemente ein. Für die *ribD* FMN Riboswitch-RNA aus *B. subtilis* wird eine transkriptionale Regulation der Genexpression angenommen (56). In *stopped-flow* Fluoreszenzmessungen der FMN Riboswitch-RNA wurden Ligand-Assoziationsprozesse im Bereich von Sekunden ermittelt, während die Dissoziation des Liganden von der FMN Riboswitch Aptamerdomäne in einem Bereich von  $k_{off}(25^{\circ}C) \sim 10^{-3} s^{-1}$  beobachtet wurde (103). Zusätzlich konnte in Gegenwart reduzierter rNTP-Konzentrationen oder des Transkriptionsfaktors NusA eine erhöhte Effizienz der Transkriptionstermination beobachtet werden. Zusammenfassend wurde postuliert, dass die Regulationsprozesse für diese FMN Riboswitch-RNA kinetisch kontrolliert sind, und dass zusätzliche Faktoren, wie beispielsweise intrinsische *pause sites* und/oder Transkriptionsfaktoren die Regulation beeinflussen.

Für die *thiM* TPP-vermittelte Riboswitch-RNA aus *E. coli* konnten in Fluoreszenzmessungen mit an selektiven Sequenzpositionen eingeführten Fluoreszenzmarkern verschiedene Ligand-induzierte Prozesse aufgelöst werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Modell der Ligandbindung durch die Aptamerdomäne vorgeschlagen, in welchem die Erkennung und Bindung des Liganden und die dadurch induzierte Ausbildung der weit reichenden Tertiärinteraktionen (Abbildung 1.2) auf einer vergleichbaren Zeitskala stattfinden. Die Strukturierung der Drei-Wege-Kreuzung und die Stabilisierung der Helix P1 in der Ligand-gebundenen Konformation der Aptamerdomäne erfolgen daraufhin signifikant langsamer (104).



Purin-abhängige Riboswitch-RNAs stellen die bisher am ausführlichsten kinetisch und thermodynamisch charakterisierten Riboswitch-RNA Elemente dar. In verschiedenen Fluoreszenz- (98, 106-109), Einzelmolekülkraft- (105) und zeitaufgelösten NMR-Spektroskopie (110) Untersuchungen wurden Faltungsprozesse dieser Riboswitch-RNA Elemente charakterisiert. In Zusammenhang mit den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen werden kinetische Aspekte von Purin-vermittelten Riboswitch-RNA Faltungsprozessen in Kapiteln 3-5 dargestellt.

## LITERATUR

1. Sharp, P.A. (2009) The Centrality of RNA. *Cell*, **136**, 577-80.
2. Batey, R.T., Rambo, R.P., Doudna, J.A. (1999) Tertiary motifs in RNA structure and folding. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **38**, 2326-43.
3. Serganov, A., Patel, D.J. (2007) Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins. *Nat. Rev.*, **8**, 776-90.
4. Fedor, M.J., Williamson, J.R. (2005) The catalytic diversity of RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 399-412.
5. Doudna, J.A., Cech, T.R. (2002) The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature*, **418**, 222-8.
6. Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., Altman, S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, **35**, 849-57.
7. McClain, W.H., Lai, L.B., Gopalan, V. (2010) Trials, travails and triumphs: an account of RNA catalysis in RNase P. *J. Mol. Biol.*, **397**, 627-46.
8. Michel, F., Dujon, B. (1983) Conservation of RNA secondary structures in two intron families including mitochondrial-, chloroplast- and nuclear-encoded members. *EMBO J.*, **2**, 33-8.
9. Michel, F., Umesono, K., Ozeki, H. (1989) Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns-a review. *Gene*, **82**, 5-30.
10. Ramakrishnan, V. (2002) Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*, **108**, 557-72.
11. Schmeing, T.M., Ramakrishnan, V. (2009) What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*, **461**, 1234-42.

12. Forster, A.C., Symons, R.H. (1987) Self-cleavage of virusoid RNA is performed by the proposed 55-nucleotide active site. *Cell*, **50**, 9-16.
13. Prody, G.A., Bakos, J.T., Buzayan, J.M., Schneider, I.R., Bruening, G. (1986) Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science*, **231**, 1577-80.
14. Been, M.D., Wickham, G.S. (1997) Self-cleaving ribozymes of hepatitis delta virus RNA. *Eur. J. Biochem.*, **247**, 741-53.
15. Wu, H.N., Lin, Y.J., Lin, F.P., Makino, S., Chang, M.F., Lai, M.M. (1989) Human hepatitis delta virus RNA subfragments contain an autocleavage activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1831-5.
16. Lilley, D.M. (2004) The Varkud satellite ribozyme. *RNA*, **10**, 151-8.
17. Saville, B.J., Collins, R.A. (1990) A site-specific self-cleavage reaction performed by a novel RNA in *Neurospora* mitochondria. *Cell*, **61**, 685-96.
18. Fedor, M.J. (2000) Structure and function of the hairpin ribozyme. *J. Mol. Biol.*, **297**, 269-91.
19. Feldstein, P.A., Buzayan, J.M., Bruening, G. (1989) Two sequences participating in the autolytic processing of satellite tobacco ringspot virus complementary RNA. *Gene*, **82**, 53-61.
20. Hampel, A., Tritz, R. (1989) RNA catalytic properties of the minimum (-)sTRSV sequence. *Biochemistry*, **28**, 4929-33.
21. Haseloff, J., Gerlach, W.L. (1989) Sequences required for self-catalysed cleavage of the satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Gene*, **82**, 43-52.
22. Winkler, W.C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J.A., Breaker, R.R. (2004) Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature*, **428**, 281-6.
23. Bevilacqua, P.C., Yajima, R. (2006) Nucleobase catalysis in ribozyme mechanism. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **10**, 455-64.
24. Cochrane, J.C., Strobel, S.A. (2008) Catalytic strategies of self-cleaving ribozymes. *Acc. Chem. Res.*, **41**, 1027-35.
25. Lilley, D.M. (2005) Structure, folding and mechanisms of ribozymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **15**, 313-23.
26. Fedor, M.J. (2009) Comparative Enzymology and Structural Biology of RNA Self-Cleavage. *Annu. Rev. Biophys.*, **38**, 271-99.
27. Nakano, S., Chadalavada, D.M., Bevilacqua, P.C. (2000) General acid-base catalysis in the mechanism of a hepatitis delta virus ribozyme. *Science*, **287**, 1493-7.
28. Martick, M., Scott, W.G. (2006) Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell*, **126**, 309-20.
29. Rupert, P.B., Massey, A.P., Sigurdsson, S.T., Ferre-D'Amaré, A.R. (2002) Transition state stabilization by a catalytic RNA. *Science*, **298**, 1421-4.

30. Ke, A., Zhou, K., Ding, F., Cate, J.H., Doudna, J.A. (2004) A conformational switch controls hepatitis delta virus ribozyme catalysis. *Nature*, **429**, 201-5.
31. Cochrane, J.C., Lipchick, S.V., Strobel, S.A. (2007) Structural investigation of the glmS ribozyme bound to its catalytic cofactor. *Chem. Biol.*, **14**, 97-105.
32. De la Pena, M., Gago, S., Flores, R. (2003) Peripheral regions of natural hammerhead ribozymes greatly increase their self-cleavage activity. *EMBO J.*, **22**, 5561-70.
33. Khvorova, A., Lescoute, A., Westhof, E., Jayasena, S.D. (2003) Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 708-12.
34. Walter, F., Murchie, A.I., Lilley, D.M. (1998) Folding of the four-way RNA junction of the hairpin ribozyme. *Biochemistry*, **37**, 17629-36.
35. Walter, N.G., Burke, J.M., Millar, D.P. (1999) Stability of hairpin ribozyme tertiary structure is governed by the interdomain junction. *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 544-9.
36. Esteban, J.A., Banerjee, A.R., Burke, J.M. (1997) Kinetic mechanism of the hairpin ribozyme. Identification and characterization of two nonexchangeable conformations. *J. Biol. Chem.*, **272**, 13629-39.
37. Walter, N.G., Hampel, K.J., Brown, K.M., Burke, J.M. (1998) Tertiary structure formation in the hairpin ribozyme monitored by fluorescence resonance energy transfer. *EMBO J.*, **17**, 2378-91.
38. Winkler, W.C. (2005) Riboswitches and the role of noncoding RNAs in bacterial metabolic control. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **9**, 594-602.
39. Grundy, F.J., Hemkin, T.M. (2006) From ribosome to riboswitch: control of gene expression in bacteria by RNA structural rearrangements. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **41**, 329-38.
40. Winkler, W.C., Breaker, R.R. (2005) Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annu. Rev. Microbiol.*, **59**, 487-517.
41. Barrick, J.E., Breaker, R.R. (2007) The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome Biol.*, **8**, R239.
42. Winkler, W.C., Breaker, R.R. (2003) Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *Chembiochem*, **4**, 1024-32.
43. Sudarsan, N., Barrick, J.E., Breaker, R.R. (2003) Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *RNA*, **9**, 644-7.
44. Bocobza, S., Adato, A., Mandel, T., Shapira, M., Nudler, E., Aharoni, A. (2007) Riboswitch-dependent gene regulation and its evolution in the plant kingdom. *Genes Dev.*, **21**, 2874-9.
45. Cheah, M.T., Wachter, A., Sudarsan, N., Breaker, R.R. (2007) Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature*, **447**, 497-500.
46. Croft, M.T., Moulin, M., Webb, M.E., Smith, A.G. (2007) Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 20770-5.

47. Sudarsan, N., Wickiser, J.K., Nakamura, S., Ebert, M.S., Breaker, R.R. (2003) An mRNA structure in bacteria that controls gene expression by binding lysine. *Genes Dev.*, **17**, 2688-97.
48. Mandal, M., Lee, M., Barrick, J.E., Weinberg, Z., Emilsson, G.M., Ruzzo, W.L., Breaker, R.R. (2004) A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science*, **306**, 275-9.
49. Mandal, M., Breaker, R.R. (2004) Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 29-35.
50. Mandal, M., Boese, B., Barrick, J.E., Winkler, W.C., Breaker, R.R. (2003) Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell*, **113**, 577-86.
51. Meyer, M.M., Roth, A., Chervin, S.M., Garcia, G.A., Breaker, R.R. (2008) Confirmation of a second natural preQ1 aptamer class in Streptococcaceae bacteria. *RNA*, **14**, 685-95.
52. Roth, A., Winkler, W.C., Regulski, E.E., Lee, B.W., Lim, J., Jona, I., Barrick, J.E., Ritwik, A., Kim, J.N., Welz, R., Iwata-Reuyl, D., Breaker, R.R. (2007) A riboswitch selective for the queuosine precursor preQ1 contains an unusually small aptamer domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 308-17.
53. Kim, J.N., Roth, A., Breaker, R.R. (2007) Guanine riboswitch variants from *Mesoplasma florum* selectively recognize 2'-deoxyguanosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 16092-7.
54. Sudarsan, N., Lee, E.R., Weinberg, Z., Moy, R.H., Kim, J.N., Link, K.H., Breaker, R.R. (2008) Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science*, **321**, 411-3.
55. Nahvi, A., Sudarsan, N., Ebert, M.S., Zou, X., Brown, K.L., Breaker, R.R. (2002) Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem. Biol.*, **9**, 1043-49.
56. Winkler, W.C., Cohen-Chalamish, S., Breaker, R.R. (2002) An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15908-13.
57. Winkler, W., Nahvi, A., Breaker, R.R. (2002) Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature*, **419**, 952-6.
58. Kubodera, T., Watanabe, M., Yoshiuchi, K., Yamashita, N., Nishimura, A., Nakai, S., Gomi, K., Hanamoto, H. (2003) Thiamine-regulated gene expression of *Aspergillus oryzae* thiA requires splicing of the intron containing a riboswitch-like domain in the 5'-UTR. *FEBS Lett.*, **555**, 516-20.
59. Wachter, A., Tunc-Ozdemir, M., Grove, B.C., Green, P.J., Shintani, D.K., Breaker, R.R. (2007) Riboswitch control of gene expression in plants by splicing and alternative 3' end processing of mRNAs. *Plant Cell*, **19**, 3437-50.
60. Corbino, K.A., Barrick, J.E., Lim, J., Welz, R., Tucker, B.J., Puskarz, I., Mandal, M., Rudnick, N.D., Breaker, R.R. (2005) Evidence for a second class of S-adenosylmethionine riboswitches and other regulatory RNA motifs in alpha-proteobacteria. *Genome Biol.*, **6**, R70.
61. Epshtein, V., Mironov, A.S., Nudler, E. (2003) The riboswitch-mediated control of sulfur metabolism in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5052-6.

62. Fuchs, R.T., Grundy, F.J., Henkin, T.M. (2006) The S(MK) box is a new SAM-binding RNA for translational regulation of SAM synthetase. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 226-33.
63. McDaniel, B.A., Grundy, F.J., Kurlekar, V.P., Tomsic, J., Henkin, T.M. (2006) Identification of a mutation in the *Bacillus subtilis* S-adenosylmethionine synthetase gene that results in derepression of S-box gene expression. *J. Bacteriol.*, **188**, 3674-81.
64. Poiata, E., Meyer, M.M., Ames, T.D., Breaker, R.R. (2009) A variant riboswitch aptamer class for S-adenosylmethionine common in marine bacteria. *RNA*, **15**, 2046-56.
65. Weinberg, Z., Regulski, E.E., Hammond, M.C., Barrick, J.E., Yao, Z., Ruzzo, W.L., Breaker, R.R. (2008) The aptamer core of SAM-IV riboswitches mimics the ligand-binding site of SAM-I riboswitches. *RNA*, **14**, 822-8.
66. Winkler, W.C., Nahvi, A., Sudarsan, N., Barrick, J.E., Breaker, R.R. (2003) An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine. *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 701-7.
67. Barrick, J.E., Corbino, K.A., Winkler, W.C., Nahvi, A., Mandal, M., Collins, J., Lee, M., Roth, A., Sudarsan, N., Jona, I., Wickiser, J.K., Breaker, R.R. (2004) New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 6421-6.
68. Cromie, M.J., Shi, Y., Latifi, T., Groisman, E.A. (2006) An RNA sensor for intracellular  $Mg^{2+}$ . *Cell*, **125**, 71-84.
69. Welz, R., Breaker, R.R. (2007) Ligand binding and gene control characteristics of tandem riboswitches in *Bacillus anthracis*. *RNA*, **13**, 573-82.
70. Weinberg, Z., Barrick, J.E., Yao, Z., Roth, A., Kim, J.N., Gore, J., Wang, J.X., Lee, E.R., Block, K.F., Sudarsan, N., Neph, S., Tompa, M., Ruzzo, W.L., Breaker, R.R. (2007) Identification of 22 candidate structured RNAs in bacteria using the CMfinder comparative genomics pipeline. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 4809-19.
71. Weinberg, Z., Wang, J.X., Bogue, J., Yang, J., Corbino, K., Moy, R.H., Breaker, R.R. (2010) Comparative genomics reveals 104 candidate structured RNAs from bacteria, archaea, and their metagenomes. *Genome Biol.*, **11**, R31.
72. Edwards, T.E., Ferre-D'Amaré, A.R. (2006) Crystal structures of the Thi-box riboswitch bound to thiamine pyrophosphate analogs reveal adaptive RNA-small molecule recognition. *Structure*, **14**, 1459-68.
73. Edwards, T.E., Klein, D.J., Ferre-D'Amaré, A.R. (2007) Riboswitches: small-molecule recognition by gene regulatory RNAs. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **17**, 273-9.
74. Schwalbe, H., Buck, J., Fürtig, B., Noeske, J., Wöhnert, J. (2007) Structures of RNA switches: insight into molecular recognition and tertiary structure. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **46**, 1212-9.
75. Serganov, A. (2009) The long and the short of riboswitches. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **19**, 251-9.

76. Klein, D.J., Edwards, T.E., Ferre-D'Amaré, A.R. (2009) Cocrystal structure of a class I preQ1 riboswitch reveals a pseudoknot recognizing an essential hypermodified nucleobase. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 343-4.
77. Serganov, A., Huang, L., Patel, D.J. (2008) Structural insights into amino acid binding and gene control by a lysine riboswitch. *Nature*, **455**, 1263-7.
78. Montange, R.K., Batey, R.T. (2008) Riboswitches: emerging themes in RNA structure and function. *Annu. Rev. Biophys.*, **37**, 117-33.
79. Batey, R.T., Gilbert, S.D., Montange, R.K. (2004) Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine. *Nature*, **432**, 411-5.
80. Serganov, A., Yuan, Y.R., Pikovskaya, O., Polonskaia, A., Malinina, L., Phan, A.T., Hobartner, C., Micura, R., Breaker, R.R., Patel, D.J. (2004) Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs. *Chem. Biol.*, **11**, 1729-41.
81. Edwards, A.L., Batey, R.T. (2009) A structural basis for the recognition of 2'-deoxyguanosine by the purine riboswitch. *J. Mol. Biol.*, **385**, 938-48.
82. Smith, K.D., Lipchock, S.V., Ames, T.D., Wang, J., Breaker, R.R., Strobel, S.A. (2009) Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 1218-23.
83. Serganov, A., Polonskaia, A., Phan, A.T., Breaker, R.R., Patel, D.J. (2006) Structural basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch. *Nature*, **441**, 1167-71.
84. Thore, S., Leibundgut, M., Ban, N. (2006) Structure of the eukaryotic thiamine pyrophosphate riboswitch with its regulatory ligand. *Science*, **312**, 1208-11.
85. Montange, R.K., Batey, R.T. (2006) Structure of the S-adenosylmethionine riboswitch regulatory mRNA element. *Nature*, **441**, 1172-5.
86. Gilbert, S.D., Rambo, R.P., Van Tyne, D., Batey, R.T. (2008) Structure of the SAM-II riboswitch bound to S-adenosylmethionine. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 177-82.
87. Lu, C., Smith, A.M., Fuchs, R.T., Ding, F., Rajashankar, K., Henkin, T.M., Ke, A. (2008) Crystal structures of the SAM-III/S(MK) riboswitch reveal the SAM-dependent translation inhibition mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 1076-83.
88. Serganov, A., Huang, L., Patel, D.J. (2009) Coenzyme recognition and gene regulation by a flavin mononucleotide riboswitch. *Nature*, **458**, 233-7.
89. Dann, C.E., 3rd, Wakeman, C.A., Sieling, C.L., Baker, S.C., Irnov, I., Winkler, W.C. (2007) Structure and mechanism of a metal-sensing regulatory RNA. *Cell*, **130**, 878-92.
90. McDaniel, B.A., Grundy, F.J., Kurlekar, V.P., Tomsic, J., Henkin, T.M. (2006) Identification of a mutation in the *Bacillus subtilis* S-adenosylmethionine synthetase gene that results in derepression of S-box gene expression. *J. Bacteriol.*, **188**, 3674-81.
91. Blouin, S., Lafontaine, D.A. (2007) A loop loop interaction and a K-turn motif located in the lysine aptamer domain are important for the riboswitch gene regulation control. *RNA*, **13**, 1256-67.

92. Noeske, J., Buck, J., Fürtig, B., Nasiri, H.R., Schwalbe, H., Wöhnert, J. (2007) Interplay of 'induced fit' and preorganization in the ligand induced folding of the aptamer domain of the guanine binding riboswitch. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 572-83.
93. Muhlbacher, J., Lafontaine, D.A. (2007) Ligand recognition determinants of guanine riboswitches. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 5568-80.
94. Kim, J.N., Blount, K.F., Puskarz, I., Lim, J., Link, K.H., Breaker, R.R. (2009) Design and antimicrobial action of purine analogues that bind guanine riboswitches. *ACS Chem. Biol.*, **4**, 915-27.
95. Christiansen, L.C., Schou, S., Nygaard, P., Saxild, H.H. (1997) Xanthine metabolism in *Bacillus subtilis*: characterization of the xpt-pbuX operon and evidence for purine- and nitrogen-controlled expression of genes involved in xanthine salvage and catabolism. *J. Bacteriol.*, **179**, 2540-50.
96. De la Pena, M., Dufour, D., Gallego, J. (2009) Three-way RNA junctions with remote tertiary contacts: A recurrent and highly versatile fold. *RNA*, **15**, 1949-64.
97. Noeske, J., Richter, C., Grundl, M.A., Nasiri, H.R., Schwalbe, H., Wöhnert, J. (2005) An intermolecular base triple as the basis of ligand specificity and affinity in the guanine- and adenine-sensing riboswitch RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 1372-7.
98. Gilbert, S.D., Stoddard, C.D., Wise, S.J., Batey, R.T. (2006) Thermodynamic and kinetic characterization of ligand binding to the purine riboswitch aptamer domain. *J. Mol. Biol.*, **359**, 754-68.
99. Garst, A.D., Batey, R.T. (2009) A switch in time: detailing the life of a riboswitch. *Biochim. Biophys. Acta*, **1789**, 584-91.
100. Kim, J.N., Breaker, R.R. (2008) Purine sensing by riboswitches. *Biol. Cell*, **100**, 1-11.
101. Artsimovitch, I., Landick, R. (2000) Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7090-5.
102. Gusarov, I., Nudler, E. (2001) Control of intrinsic transcription termination by N and NusA: the basic mechanisms. *Cell*, **107**, 437-49.
103. Wickiser, J.K., Winkler, W.C., Breaker, R.R., Crothers, D.M. (2005) The speed of RNA transcription and metabolite binding kinetics operate an FMN riboswitch. *Mol. Cell*, **18**, 49-60.
104. Lang, K., Rieder, R., Micura, R. (2007) Ligand-induced folding of the thiM TPP riboswitch investigated by a structure-based fluorescence spectroscopic approach. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 5370-8.
105. Greenleaf, W.J., Frieda, K.L., Foster, D.A., Woodside, M.T., Block, S.M. (2008) Direct observation of hierarchical folding in single riboswitch aptamers. *Science*, **319**, 630-3.
106. Rieder, R., Lang, K., Graber, D., Micura, R. (2007) Ligand-induced folding of the adenosine deaminase A-riboswitch and implications on riboswitch translational control. *Chembiochem*, **8**, 896-902.

107. Wickiser, J.K., Cheah, M.T., Breaker, R.R., Crothers, D.M. (2005) The kinetics of ligand binding by an adenine-sensing riboswitch. *Biochemistry*, **44**, 13404-14.
108. Prychyna, O., Dahabieh, M.S., Chao, J., O'Neill, M.A. (2009) Sequence-dependent folding and unfolding of ligand-bound purine riboswitches. *Biopolymers*, **91**, 953-65.
109. Lemay, J.F., Penedo, J.C., Tremblay, R., Lilley, D.M., Lafontaine, D.A. (2006) Folding of the adenine riboswitch. *Chem. Biol.*, **13**, 857-68.
110. Buck, J., Fürtig, B., Noeske, J., Wöhnert, J., Schwalbe, H. (2007) Time-resolved NMR methods resolving ligand-induced RNA folding at atomic resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 15699-704.



# **KAPITEL 2**

ALLGEMEINE EXPERIMENTELLE METHODEN

# RNA-SYNTHESE UND -AUFREINIGUNG

## Chemisch synthetisierte RNA-Konstrukte

Nicht-isotopenmarkierte, chemisch synthetisierte Modell-RNA-Konstrukte wurden von Dharmacon (Boulder) bezogen und nach Vorschrift des Herstellers entschützt. Die entschützten RNA-Konstrukte wurden dann mittels präparativer RP- (*reversed phase*) Ionenpaarchromatographie (Vydac-RP18, 10x250 mm, 60°C) aufgereinigt. Das Abtrennen der Salze und Aufkonzentrieren der RNA-Lösungen erfolgte mit Hilfe von Konzentratoren (Vivaspin, Sartorius, Göttingen). Durch Faltung der RNA-Konstrukte (5 min auf 95°C erhitzen, 1:10 mit eisgekühltem Wasser verdünnen und 1 h auf Eis kühlen) konnten homogene, monomere Konformationen erhalten werden.

## RNA-Synthese durch *in vitro* Transkription

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten RNA-Konstrukte wurden, sofern nicht anders angegeben, enzymatisch durch *in vitro* Transkription von linearisierter Plasmid-DNA mittels T7-RNA-Polymerase synthetisiert. Die allgemeinen Arbeitsschritte der DNA-Präparation, deren Isolierung und der RNA-Synthese und deren anschließenden Aufreinigungen sind im Folgenden aufgeführt.

## DNA-Präparation

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Templat-Sequenzen wurden mittels PCR synthetisiert und in pUC19 Plasmide kloniert. Die Plasmide wurden in *E. coli* exprimiert und anschließend isoliert. Die eingesetzten DNA-Templates weisen zusätzlich einen spezifischen Erkennungsbereich für die T7-RNA-Polymerase (1) auf, um eine effiziente *in vitro* Transkription zu gewährleisten. Der Transkriptionsabbruch wurde durch ein definiertes Ende der jeweiligen Templat-Sequenz hervorgerufen, das durch eine enzymatische Linearisierung der Plasmid-DNA erzeugt wurde. Die PCR-basierte Synthese und Klonierung der entsprechenden DNA-Sequenzen, die für die RNA-Sequenz der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne (Gsw<sup>apt</sup>) des *xpt-pbuX* Operons aus *B. subtilis*, eine G37A/C61U-Mutante (Gsw<sup>loop</sup>) und die RNA-Sequenz der Aptamerdomäne (Asw<sup>apt</sup>) der *pbuE* Adenin Riboswitch-RNA aus *B. subtilis* kodieren, wurde von Jonas Noeske (AK Schwalbe) durchgeführt (2).

Für die Transformation wurden kompetente Zellen (10  $\mu$ l, *E. coli* DH5 $\alpha$ -T1, Invitrogen, Karlsruhe) mit dem jeweiligen DNA-Templat (0.5  $\mu$ l) versetzt und 30 min auf Eis gekühlt. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock (45 s, 42°C), dann wurde der Reaktionsansatz 2 min eisgekühlt, und es folgte die Zugabe von S.O.C.-Medium (125  $\mu$ l, Invitrogen, Karlsruhe). Nach Inkubation (1 h, 37°C) wurden die Zellen auf einer Ampicillin-haltigen (0.1 mg/ml) LB-Agarplatte ausgestrichen. Diese wurde anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einem jeweils bei der Transformation erhaltenen Klon wurde eine Vorkultur angesetzt (50 ml LB-Medium mit 0.1 mg/ml Ampicillin, bei 37°C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> ~0.5 schütteln). Das Zellpellet der Vorkultur wurde zum Animpfen der 1l-LB-Kultur (0.1 mg/ml Ampicillin) verwendet, die dann bei 180 rpm und 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> ~1.7-2.1 geschüttelt wurde. Das durch Zentrifugation (6000 g, 10 min) erhaltene Zellpellet wurde zur Isolierung der Plasmid-DNA einer alkalischen Lyse unterzogen (*Plasmid Mega Kit*, QIAGEN, Hilden) und anschließend in Wasser aufgenommen. Die Konzentration der DNA kann unter der Annahme, dass 1 OD<sub>260</sub> ~50  $\mu$ g doppelsträngiger DNA entspricht (3), photometrisch bestimmt werden.

Die enzymatische Linearisierung der Plasmid-DNA wurde durch Zugabe des Restriktionsenzym *Sma*I (180 Einheiten/mg DNA, New England Biolabs, Frankfurt) erreicht (Inkubation bei 25°C über Nacht). Der Verlauf der Linearisierung wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (0.8%) analysiert, wobei unverdaute Plasmid-DNA als Referenz diente. Die Isolierung der linearisierten DNA erfolgte über eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Hierfür wurde der Linearisierungsansatz mit 1/2 Volumen einer Lösung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (25:24:1, Rotiphorese, Roth, Karlsruhe) extrahiert und anschließend zentrifugiert (8000 g, 4°C, 10 min). Die wässrige Phase wurde abgetrennt, erneut mit 1/2 Volumen des Rotiphorese-Gemisches extrahiert und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde anschließend dreimal mit je einem Volumen Chloroform extrahiert und zentrifugiert (8000 g, 4°C, 5 min). Zur Ausfällung der DNA wurde ein Volumen Isopropanol zu der wässrigen Phase gegeben und das Gemisch für 2 h auf -20°C gekühlt. Nach Zentrifugation (8000 g, 30 min) wurde das Zellpellet in Wasser aufgenommen. Die somit erhaltene linearisierte DNA diente als Matrize für die im Folgenden beschriebene RNA-Synthese.

### ***In vitro* Transkription**

Die für die *in vitro* Transkription benötigte T7-RNA-Polymerase wurde von Matthias Görlach (IMB Jena) und Elke Stirnal (AK Schwalbe) zur Verfügung gestellt. Die in dieser Arbeit

durchgeführten *in vitro* Transkriptionsansätze wurden mit einem Gesamtvolumen von 10-40 ml bei 37°C unter den in Tabelle 2.1 genannten experimentellen Bedingungen durchgeführt. Für eine Optimierung der RNA-Ausbeute wurden die eingesetzten Konzentrationen an Magnesiumacetat, des linearisierten DNA-Templats und der Nukleotidtriphosphate (rNTPs) für jede Zielsequenz jeweils zuvor in analytischen Ansätzen (50 µl Gesamtvolumen) in den in Tabelle 2.1 angegebenen Konzentrationsbereichen optimiert. Der zeitliche Reaktionsverlauf und die entsprechenden Ausbeuten wurden mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und HPLC analysiert.

<b>definierte Parameter</b>	<b>Konzentration</b>
Tris-Glutamat-Puffer (pH~8.1)	200 mM
Spermidin	2 mM
Dithiothreitol	20 mM
T7-RNA-Polymerase	~0.07 mg/ml
<b>zu optimierende Parameter</b>	<b>Konzentrationsbereich</b>
Magnesiumacetat	5-30 mM
linearisiertes DNA-Templat	20-200 nM
rNTP-Konzentration	10-40 mM

**Tabelle 2.1:** Experimentelle Bedingungen der *in vitro* Transkription.

Die prozentuale Zusammensetzung der verschiedenen Nukleotidtriphosphate im Reaktionsansatz wurde dabei entsprechend dem Anteil der einzelnen Nukleotide in der jeweiligen RNA-Sequenz angepasst. Die nicht-isotopenmarkierten rNTPs wurden von SigmaAldrich, die isotopenmarkierten (<sup>15</sup>N- oder <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N-markiert) rNTPs wurden von Silantes (München) bezogen.

### **RNA-Aufreinigung**

Die Isolierung der RNA wurde über verschiedene säulenchromatographische Aufreinigungsschritte vorgenommen. Zuerst wurde der während der *in vitro* Transkription entstandene Magnesiumpyrophosphat-Niederschlag abzentrifugiert (8000 g, 4°C, 20 min). Zur Abtrennung von DNA-Templat, rNTPs und T7-RNA-Polymerase aus dem Reaktionsansatz

erfolgte zuerst die Aufreinigung mittels einer DEAE-Sepharose FF-Anionenaustauschersäule (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala). Hierfür wurde die Säule mit einer 0.1 M Natriumacetatlösung (pH~5.5) equilibriert. Der Transkriptionsansatz wurde mit einem Stufengradienten aus Natriumacetatlösungen (0.6-3 M, pH~5.5) eluiert und fraktioniert aufgefangen. Der RNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen wurde mittels UV-Spektroskopie und denaturierender PAGE analysiert. Die RNA enthaltenden Fraktionen wurden durch Zugabe des 10-fachen Volumens an gekühltem (-80°C) Ethanol über Nacht bei -20°C ausgefällt. Durch Zentrifugation (1 h, 8000 g, 4°C) wurde die RNA abgetrennt und anschließend in Wasser aufgenommen (~100-150 OD<sub>260</sub>/ml). Die weitere Aufreinigung erfolgte über präparative RP-Ionenpaarchromatographie (Vydac-RP18, 10x250 mm, 60°C) mit einem Lösungsmittelgradienten (Lösungen A und B, Flussrate 5 ml/min), wie beispielhaft für die Guanin Riboswitch-RNA in Tabelle 2.2 angegeben. Die RNA wurde über die UV-Absorption bei 260 nm detektiert und entsprechend fraktioniert aufgefangen. Diese Fraktionen wurden gefriergetrocknet und anschließend in Wasser aufgenommen.

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

**Tabelle 2.2:** Lösungsmittelgradient der HPLC-Aufreinigung der Guanin Riboswitch-RNA, für die sich eine Retentionszeit von ~23 min ergibt (Lösung A: 50 mM Kaliumphosphat, pH~5.9, 2 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat, Lösung B: Lösung A und 60% Acetonitril (v/v)).

Das Abtrennen der Salze erfolgte zuerst mit Hilfe von Konzentratoren (Centriprep, Millipore, Billerica und Vivaspin, Sartorius, Göttingen) den Vorschriften des Herstellers folgend. Durch Zugabe des fünffachen Volumens einer 2%igen (w/v) LiClO<sub>4</sub>-Lösung in Aceton wurde die RNA anschließend über Nacht bei -20°C präzipitiert und das RNA-Pellet nach Zentrifugation dann in Wasser aufgenommen.

Um eine homogene, monomere RNA-Konformation zu erhalten, wurde die RNA einem Faltungsprotokoll unterzogen. Hierfür wurde die wässrige RNA-Lösung zunächst für 5 min auf 95°C erhitzt, anschließend im Verhältnis 1:10 mit eisgekühltem Wasser verdünnt und eine Stunde auf Eis gekühlt. Die Konformationsanalyse erfolgte mittels nativer PAGE.

Für die weiteren spektroskopischen Untersuchungen wurde die RNA über Konzentratoren in NMR-Puffer (25 mM Kaliumphosphat (83%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 17%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), pH~6.2, 50 mM Kaliumchlorid) umgepuffert und anschließend aufkonzentriert.

## GELELEKTROPHORETISCHE METHODEN

### **Agarose-Gelelektrophorese**

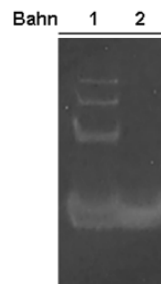
Die Analyse von DNA-Fragmentgrößen bzw. -Konformationen erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Zur optimalen Auftrennung der in dieser Arbeit untersuchten DNA-Fragmente wurden Agarose-Konzentrationen von 0.8% verwendet. Es wurden je ca. 100 ng DNA in einem Volumen bis 15  $\mu\text{l}$  mit 5  $\mu\text{l}$  Auftragspuffer (0.1% Bromphenolblau in 50%iger Glycerinlösung) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Elektrophorese-Laufpuffer wurde TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, pH~7.5, 1 mM EDTA) verwendet und eine Spannung von 120 V angelegt. Die UV-Visualisierung und Dokumentation erfolgte nach Anfärben der DNA mit einer Ethidiumbromid-Lösung über eine Kodak DC-40 Digitalkamera mit UV-Filter.

### **Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Es wurden je 5  $\mu\text{l}$  RNA ( $\sim 0.01 \text{ OD}_{260}$ ) in 10  $\mu\text{l}$  Auftragspuffer (99.2% Formamid, 0.1% Bromphenolblau, 0.1% Xylencyanol FF) für 5 min bei 95°C denaturiert, anschließend auf ein 15%iges denaturierendes Gel (Zusammensetzung: 10 ml Polyacrylamid in TBE-Puffer/8 M Harnstoff, 100  $\mu\text{l}$  10%ige Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 10  $\mu\text{l}$  Tetramethyldiamin; Größe: 111x70x0.75 mm) aufgetragen und eine Stromstärke von 25 mA angelegt. Als Elektrophorese-Laufpuffer diente TBE-Puffer (134 mM Tris, 45 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA). Durch Anfärben mit einer Ethidiumbromid-Lösung konnte die RNA unter UV-Licht analysiert und mittels einer Kodak DC-40 Digitalkamera mit UV-Filter dokumentiert werden.

## Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um das Vorliegen von homogenen, monomeren RNA-Konformationen zu überprüfen, wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen durchgeführt, wie beispielhaft für die Gsw<sup>apt</sup>-RNA in Abbildung 2.1 dargestellt. Es wurden 10 µl der RNA (~0.05 OD<sub>260</sub>) mit 3.5 µl Auftragspuffer (99.8% Glycerin, 0.1% Bromphenolblau, 0.1% Xylencyanol FF) auf ein 10%iges Gel aufgetragen (Zusammensetzung: 10% Polyacrylamid in 50 mM Tris-Acetat, 100 mM Natriumacetat, pH~8.0, 100 µl 10%ige Ammoniumperoxodisulfat-Lösung und 10 µl Tetramethyldiamin; Größe: 111x70x0.75 mm). Als Elektrophorese-Laufpuffer diente RNA-Puffer (50 mM Tris-Acetat, 100 mM Natriumacetat, pH~8.0). An das Gel wurde unter Wasserkühlung eine Leistung von ~3 W angelegt. Nach Anfärben mit einer Ethidiumbromid-Lösung erfolgte die UV-Visualisierung und Analyse der RNA, welche mittels einer Kodak DC-40 Digitalkamera mit UV-Filter dokumentiert wurde.



**Abbildung 2.1:** Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Überprüfung einer homogenen monomeren RNA-Konformation; Bahn 1: ungefaltete Gsw<sup>apt</sup>-RNA, neben der monomeren RNA sind auch das Dimer und weitere Oligomere zu beobachten, Bahn 2: Gsw<sup>apt</sup>-RNA weist nach der Faltung ausschließlich eine monomere RNA-Konformation auf.

## LIGAND-SYNTHESEN

Die nicht-isotopenmarkierten Nukleobasen Hypoxanthin und Adenin wurden von SigmaAldrich bezogen. Das in den NMR-spektroskopischen Untersuchungen eingesetzte <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N-markierte Adenin wurde nach bekannter Synthese durch die Umsetzung von <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N-markiertem ATP mit Salzsäure erhalten, neutralisiert und mittels präparativer HPLC aufgereinigt (4). <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N-markiertes Hypoxanthin wurde von Hamid Nasiri (AK Schwalbe) zur Verfügung gestellt (4). Die Konzentrationsbestimmungen der Ligand-Lösungen erfolgten UV-spektroskopisch.

Der photogeschützte Ligand Hypoxanthin, Hyp\*DMNPE ( $O^6$ -[4,5-Dimethoxy-(2-nitrophenyl)ethyl]-hypoxanthin), wurde analog der in der vorangegangenen Diplomarbeit beschriebenen Vorgehensweise synthetisiert, mittels präparativer HPLC aufgereinigt und analytisch charakterisiert (5, 6). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte sowohl photometrisch als auch NMR-spektroskopisch mit Hilfe des ERETIC-Experimentes (5, 7). Die Synthese, Aufreinigung und analytische Charakterisierung der photoaktiven Substanz wurde dabei möglichst unter Lichtausschluss durchgeführt.

## UV-SPEKTROSKOPIE

Die Konzentrationsbestimmungen der DNA-, RNA- und Purinligand-Lösungen sowie des photogeschützten Hypoxanthin (Hyp\*DMNPE) erfolgten photometrisch (Tabelle 2.3). Dabei wurde die charakteristische Absorption der Purin- bzw. Pyrimidin-Nukleobasenteile der Nucleinsäuren bzw. der freien Nucleobasen selbst im UV-Bereich ausgenutzt. Die Aufnahme der UV-Spektren erfolgte an den UV-Spektrometern Varian Cary50 und Perkin Elmer Lambda25. Es wurden Quarzküvetten mit einer Weglänge von 1 cm und einem Volumen von 600  $\mu$ l bzw. 1000  $\mu$ l verwendet.

Die DNA-Konzentration kann über die Messung der optischen Dichte unter der Annahme bestimmt werden, dass 1 OD<sub>260</sub>  $\sim$  50  $\mu$ g Plasmid-DNA entsprechen (3). Zur Bestimmung der RNA-Konzentrationen wurde, ebenfalls basierend auf der Absorption der Nucleinsäuren bei 260 nm, für die verschiedenen RNA-Konstrukte ein molarer Extinktionskoeffizient aus der entsprechenden Zusammensetzung der jeweiligen Nucleotide berechnet.

Verbindung	Extinktionskoeffizient [l <sup>*</sup> mol <sup>-1</sup> *cm <sup>-1</sup> ]	Wellenlänge [nm]
Hypoxanthin	10 500	250 <sup>(8)</sup>
Adenin	14 900	260 <sup>(9)</sup>
Hyp*DMNPE	4 795	365 <sup>(10)</sup>

**Tabelle 2.3:** Molare Extinktionskoeffizienten [l<sup>\*</sup>mol<sup>-1</sup>\*cm<sup>-1</sup>] der Liganden bei jeweils angegebener Wellenlänge.



## CD-SPEKTROSKOPIE

Die RNA-Schmelzkurven (8, 9) wurden an einem CD-Spektrometer des Typs Jasco J-810 aufgenommen. Die verwendete Quarzküvette hatte eine Weglänge von 1 mm. Es wurde innerhalb eines Temperaturbereichs von 4-94°C gemessen, wobei die Temperatur in Intervallen von 1°C/min erhöht bzw. reduziert wurde. Die Temperatur wurde mittels eines Peltier-Elementes des Typs Jasco PTC-423S/L kontrolliert. Die RNA-Proben wurden in NMR-Puffer gemessen und hatten in einem Probenvolumen von 220 µl eine Konzentration von 10-15 µM. Die Schmelzkurven der Guanin Riboswitch-RNAs wurden bei einer Wellenlänge von 264 nm aufgenommen. Die Entfaltungsübergänge [°C] wurden über die Ableitung des temperaturabhängigen CD-Signals ermittelt. Die Entfaltungs- bzw. Faltungsübergänge der RNA-Konstrukte zeigten dabei übereinstimmende Verläufe, was jeweils die Reversibilität der Faltung bestätigte.

## NMR-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN

### Allgemeine Bedingungen

Die <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-editierten NMR-Experimente wurden an NMR-Spektrometern AV900 MHz, AV800 MHz, AV700 MHz und AV600 MHz der Firma Bruker durchgeführt, die jeweils mit 5 mm TXI-HCN Cryo-Probenköpfen und z-Gradienten ausgestattet waren und an einem DRX600 MHz NMR-Spektrometer, das mit einem 5 mm TXI-HCN-RT Probenkopf und x,y,z-Gradienten ausgestattet war. <sup>31</sup>P-NMR-Experimente wurden an einem AV600 MHz NMR-Spektrometer mit 5 mm TXI-HCP Cryo-Probenkopf und einem AV300 MHz NMR-Spektrometer mit BBO-RT Probenkopf aufgenommen, die jeweils mit z-Gradienten ausgestattet waren.

Die Aufnahme und Prozessierung der Daten erfolgte mit der Software TopSpin 2.1 (Bruker, Karlsruhe). Die Datenanalyse erfolgte mit der Software TopSpin 2.1 und dem Programm SPARKY (11). Die Referenzierung der chemischen Verschiebungen von <sup>1</sup>H-Resonanzen erfolgte relativ zu einer externen DSS Standardprobe (2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure) unter entsprechenden Puffer- und Aufnahmebedingungen. Die <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-Referenzfrequenzen wurden darauf basierend nach Wishart et al. (12) bestimmt.

## Allgemeine Strategie zur NMR-Resonanzzuordnung der RNA-Konstrukte

Zur NMR-spektroskopischen Charakterisierung der RNA-Konstrukte und RNA-Ligand Komplexe wurden folgende Experimente durchgeführt: eindimensionale NMR-Experimente,  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC (13),  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC, 2D- $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY (in  $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$  (9:1) oder  $\text{D}_2\text{O}$ ), HNN-COSY (14) und 3D- $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC (15). Zur Aufnahme der Spektren wurden Standardpulsprogramme der Firma Bruker verwendet. Die Unterdrückung des Wassersignals wurde mittels der WATERGATE-Methode (16, 17) oder *jump-return-echo* Sequenzen (18) erreicht und für die  $^{13}\text{C}$ - bzw.  $^{15}\text{N}$ -Breitbandentkopplung wurden GARP-Sequenzen (19) angewandt.

$^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren wurden allgemein mit 2048 Punkten in der  $^1\text{H}$ - und 128-512 Punkten (Angaben entsprechen jeweils der Bruker-Nomenklatur) in der  $^{15}\text{N}$ -Dimension aufgenommen, wobei die Stickstoffträgerfrequenz mit einem Wert von 153 ppm zwischen die Resonanzfrequenzen der Guanosin (N1) und Uridin (N3) Stickstoffkerne gesetzt wurde. Die Spektren wurden mit einer spektralen Breite von 24 ppm sowohl für die  $^1\text{H}$ - als auch für die  $^{15}\text{N}$ -Dimension aufgenommen. Die Zeitspanne der Relaxationswartezeit betrug 1-1.5 s. Für die  $^1\text{J}_{\text{N,H}}$ -Kopplung wurde allgemein ein Wert von  $\sim 90$  Hz eingesetzt.

2D- $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY Experimente wurden generell mit 2048 oder 4096 Punkten in der direkten und 256-1024 Punkten in der indirekten  $^1\text{H}$ -Dimension aufgenommen. Die aufgenommene spektrale Breite betrug 24 ppm für die Detektion der Imino-Imino NOE-Konnektivitäten und 14 ppm für NOESY-Spektren zur Aufnahme der Konnektivitäten der aromatischen und Ribose-Protonenresonanzen. Für die Mischzeit wurden je nach RNA-Konstruktgröße Werte von 50-300 ms eingesetzt, und die Zeitspanne der Relaxationswartezeit betrug 1-2 s.

3D- $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC Spektren wurden mit 2048 Punkten in der direkten  $^1\text{H}$ -Dimension, 128-256 Punkten in der indirekten  $^1\text{H}$ -Dimension und 32-80 Punkten in der  $^{15}\text{N}$ -Dimension aufgenommen. Die Stickstoffträgerfrequenz wurde mit 153 ppm auf die Mitte der Iminoprotonenfrequenzen gesetzt und eine spektrale Breite von 24 ppm aufgenommen. Für die  $^{15}\text{N}$ -Trägerfrequenz zur  $^{15}\text{N}$ -Breitbandentkopplung wurde mit 120 ppm ein Wert in der Mitte aller zu entkoppelnden stickstoffgebundenen Protonen gewählt. Für die NOESY-Mischzeit wurden 80-150 ms eingesetzt, und die Zeitspanne der Relaxationswartezeit betrug 1.2-1.8 s.

Für die Aufnahme der HNN-COSY Experimente wurden allgemein 2048 Punkte in der  $^1\text{H}$ - und 128-256 Punkte in der  $^{15}\text{N}$ -Dimension eingesetzt. Die Stickstoffträgerfrequenz wurde für den INEPT-Transfer mit 153 ppm auf die Mitte der Iminoprotonenfrequenzen gesetzt. Für den NN-Transfer wurde die Stickstoffträgerfrequenz mit einem Wert von 187.5 ppm zwischen die Akzeptor- (Adenosin/ Cytidin) bzw. Donor-Stickstoffresonanzen (Guanosin/ Uridin) gesetzt. Die Spektren wurden mit einer spektralen Breite von 24 ppm in der  $^1\text{H}$ -Dimension und

105 ppm in der  $^{15}\text{N}$ -Dimension aufgenommen. Für den NN-Transfer wurden Mischzeiten von 10-15 ms gewählt, und die Zeitspanne der Relaxationswartezeit betrug 1.2-1.8 s.

Die strukturelle Charakterisierung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten RNA-Konstrukte basierte vorwiegend auf der NMR-spektroskopischen Resonanzzuordnung der jeweiligen RNA-Iminoprotonensignale, die im spektralen Bereich von 10-15 ppm ( $^1\text{H}$  chemische Verschiebung) zur Resonanz kommen. Die Resonanzzuordnungen der verschiedenen RNA-Konstrukte, welche jeweils in der Größenordnung von 70-80 Nukleotiden (nt) lagen, erfolgten im Wesentlichen über Standardverfahren (15, 20-22). Die Analyse der Spektren wurde allerdings auf Grund der Größe der Moleküle häufig durch Resonanzüberlagerungen oder Linienverbreiterungen beeinträchtigt. Die Zuordnung der homonuklearen NMR-Spektren wurde aus diesem Grund durch die Aufnahme von heteronuklearen NMR-Experimenten von vollständig oder selektiv  $^{15}\text{N}$ -markierten RNA-Konstrukten ergänzt (23). Das somit erweiterte Spektrum durchführbarer NMR-Experimente und die mögliche Aufnahme von  $^{15}\text{N}$ -editierten NMR-Experimenten konnten zur Verringerung von Signalüberlagerungen beitragen und so ergänzende Informationen liefern. Aufgrund der Größe der Moleküle und deren intrinsischer Eigenschaften, wie beispielsweise das Vorliegen unstrukturierter Bereiche oder das Auftreten von Austauschprozessen, konnte die Resonanzzuordnung teilweise dennoch nicht vervollständigt werden.

Die in dieser Arbeit angewandte Strategie zum Erhalt einer vollständigen Resonanzzuordnung basiert darauf, dass die chemische Verschiebung der individuellen Resonanzen wesentlich vom sequentiellen bzw. strukturellen Kontext beeinflusst wird. Die für NMR-Untersuchungen als groß zu bezeichnenden RNA-Konstrukte (70-80nt) wurden deshalb in kleinere strukturell definierte Elemente unterteilt (12-21nt). Diese kleineren helikalen Strukturelemente wurden dann als Modell-RNA-Konstrukte separat analysiert (*divide-and-conquer* Strategie). Der Vergleich der NMR-Spektren der Gesamt-RNA mit den jeweiligen Modell-RNA-Konstrukten ergab eine gute Übereinstimmung sowohl der chemischen Verschiebungen als auch der NOE-Konnektivitäten der entsprechenden Iminoprotonen (Kapitel 4 und Kapitel 6). Die Modell-RNA-Konstrukte bildeten dabei allerdings vorwiegend dann die spektralen Eigenschaften der Gesamt-RNA ab, wenn die entsprechenden isolierten strukturellen Bereiche auch in der Gesamt-RNA eine vergleichbare Konformation einnahmen und nicht in zusätzliche Tertiärstrukturinteraktionen involviert waren. Mit Hilfe der Modell-RNA-Konstrukte konnte so die Resonanzzuordnung der Gesamt-RNA-Konstrukte (Kapitel 4 und Kapitel 6) vervollständigt und zusätzlich verifiziert werden.

## Charakterisierung von Kationen-induzierten strukturellen Effekten mittels NMR-spektroskopischer Methoden

Die Charakterisierung von durch die Assoziation von Kationen hervorgerufenen strukturellen Effekten in RNA kann mittels NMR-spektroskopischer Methoden vorgenommen werden (24). Da im Rahmen dieser Arbeit die Charakterisierung der Auswirkungen multivalenter Kationen auf die Struktur und Funktion der RNA-Konstrukte mittels NMR-spektroskopischer Methoden durchgeführt wurde, wird im Folgenden deren Analyse beschrieben. Die multivalenten Kationen  $Mg^{2+}$ , Spermidin $^{3+}$  und  $[Co(NH_3)_6]^{3+}$  wurden dabei für diese Untersuchungen eingesetzt.

Die Analyse von chemischen Verschiebungsänderungen (*chemical shift perturbation*, CSP) durch  $Mg^{2+}$ -Titrationen kann Aufschluss darüber geben, welche RNA-Signale an der Bindung der Kationen beteiligt sind oder sich in unmittelbarer Umgebung einer Bindungsstelle befinden. Zusätzlich zur Lokalisierung der Bindungsstelle kann auch deren Affinität bestimmt werden. Hierfür wurde in der hier vorliegenden Arbeit das  $[RNA]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnis durch die Zugabe von  $MgCl_2$  schrittweise erhöht. Es wurden die chemischen Verschiebungsänderungen  $\Delta\delta$  [Hz] der Iminoprotonensignale einer  $^{15}N$ -markierten RNA in  $^1H,^{15}N$ -HSQC Spektren nach Gleichung 2.1 ermittelt (25).

$$\Delta\delta = \sqrt{\frac{(\Delta H_N)^2 + (\Delta N/5)^2}{2}} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

Durch die Korrelation der CSP mit dem Quotient aus  $[Mg^{2+}]$  und  $[RNA]$  kann mittels nicht-linearer Regression eine Bindungskonstante ( $K_D$ ) ermittelt werden. Mit Hilfe der Software SigmaPlot 11.0 wurden die Daten mit der in Gleichung 2.2 dargestellten Funktion gefittet.

$$f(x) = \frac{b}{2} * \left( (x+1+a) - \sqrt{(x+1+a)^2 - 4x} \right) \quad (\text{Gl. 2.2})$$

Dabei stellt  $f(x)$  die CSP bei entsprechendem  $x$  dar,  $x$  ist der Quotient aus  $[Mg^{2+}]$  und  $[RNA]$ ,  $a$  entspricht dem Quotient aus der Dissoziationskonstante und der RNA-Konzentration und  $b$  entspricht der chemischen Verschiebungsänderung bei unendlicher  $Mg^{2+}$ -Konzentration (25).

Außer dem Einfluss der  $Mg^{2+}$ -Ionen auf die CSP können auch  $Mg^{2+}$ -induzierte konformationelle Veränderungen von Sekundär- bzw. Tertiärstrukturinteraktionen zu neu auftretenden oder verschwindenden Signalen führen. Dies kann zum einen die RNA-Signale

selbst betreffen und zum anderen auf den strukturelle Konnektivitäten reflektierenden NOE-Kreuzsignalen zu detektieren sein. Ein möglicher  $\text{Mg}^{2+}$ -induzierter Effekt besteht auch in der Beeinflussung von Austauschprozessen der involvierten Resonanzen auf der entsprechenden Zeitskala der jeweiligen NMR-Parameter (z.B. chemische Verschiebung oder Relaxationsraten). Zur Untersuchung dieser möglichen Kationen-induzierten Effekte wurden sowohl  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC als auch  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY Spektren der RNA-Konstrukte in den jeweilig verschiedenen  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängigen Konformationen analysiert.

Die Verwendung von  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  ermöglicht neben der Identifizierung von Bindungsstellen selbst eine Spezifizierung der Kationen-RNA-Wechselwirkungen.  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  ähnelt hexahydratisierten  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen  $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  in der Geometrie, besitzt aber im Gegensatz zu  $\text{Mg}^{2+}$  eine stabile Koordinationssphäre. Diese schließt eine direkte Metallkoordination zu funktionellen Gruppen der RNA aus (26). Die Bindung von  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ -Ionen kann zum einen analog zur Charakterisierung der  $\text{Mg}^{2+}$ -induzierten Effekte anhand von chemischen Verschiebungsänderungen analysiert werden, zum anderen können intermolekulare NOE-Signale der  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ -Protonen zu den RNA-Signalen detektiert werden (27). Eine mögliche Assoziation von  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  und die dadurch hervorgerufenen strukturellen Effekte auf die RNA wurden entsprechend in  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC und  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY Experimenten analysiert.

### Bestimmung von NMR-Linienbreiten

Die NMR-Experimente zur Bestimmung der Ligand-Linienbreiten wurden mit nicht-isotopenmarkierter RNA und jeweils  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markiertem Ligand durchgeführt. Die Ligand-Linienbreiten ( $\Gamma^{1/2}$  [Hz]) wurden aus  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC oder  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren extrahiert und mittels Dekonvolution unter Verwendung der Software TopSpin 2.1 analysiert.

Die Linienbreiten ( $\Gamma^{1/2}$  ( $^1\text{H}$ ) [Hz]) der RNA-Iminoprotonenresonanzen wurden aus  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren von  $^{15}\text{N}$ -markierter RNA in den entsprechenden Konformationen bestimmt und mittels Dekonvolution, wie im Programm TopSpin 2.1 implementiert, analysiert.

### Zeitaufgelöste NMR-Methoden

Die NMR-spektroskopischen Methoden zur zeitaufgelösten Untersuchung von RNA-Faltung *in situ* setzen die schnelle Initiierung der Faltungsreaktion und deren anschließende Detektion mit hinreichender Zeitauflösung auf der entsprechenden Zeitskala der Reaktion und einer spektralen Auflösung voraus, die die Analyse von individuellen Signalen ermöglicht.

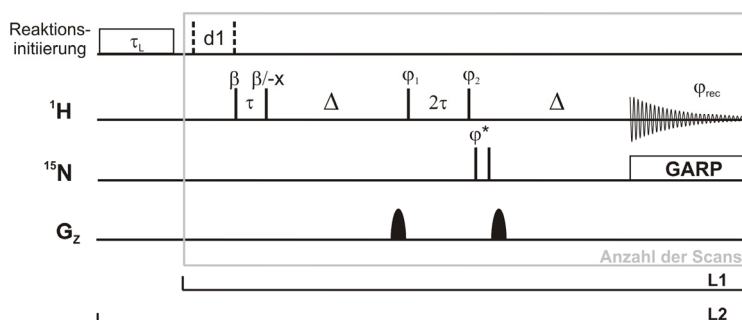
Die Initiierung der Faltungsreaktionen wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die Licht-induzierte Aktivierung einer photogeschützten Verbindung und durch Verwendung einer Mischapparatur erreicht (siehe folgende Abschnitte).

Die Detektion der anschließenden RNA-Faltung wurde für nicht-isotopenmarkierte und selektiv isotopenmarkierte RNA-Konstrukte mit Hilfe unterschiedlicher NMR-spektroskopischer Methoden vorgenommen. Die eindimensionalen zeitaufgelösten NMR-Experimente für nicht-isotopenmarkierte RNA-Konstrukte wurden unter Verwendung der *jump-return-echo* Wasserunterdrückung für die Iminprotonenresonanzen optimiert. Damit konnte die zeitliche Auflösung der hier untersuchten Kinetiken auf einer Zeitskala von Sekunden gewährleistet werden. Die spektrale Dispersion ermöglichte dagegen bei der Größe der RNA-Konstrukte nur die Analyse weniger Nukleotid-spezifisch aufgelöster Signale.

Die Kombination von *X-filter* NMR-Methoden (28) und selektiver Isotopenmarkierung der RNA ermöglichte wahlweise die Editierung von  $^{15}\text{N}$ - bzw.  $^{14}\text{N}$ -gebundenen Protonen und resultierte damit in einer verbesserten spektralen Auflösung der individuellen Spinsysteme (Abbildung 2.2). Damit konnte beispielsweise für eine selektiv  $^{15}\text{N}$ -Uridin markierte RNA die separierte Detektion der Uridin-( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) und Guanosin-( $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$ ) Signale erreicht und somit die Auflösung des spektralen Bereichs der Iminprotonenresonanzen in den individuellen Nukleotid-spezifischen Spektren verbessert werden. Die in Abbildung 2.2 dargestellte Pulssequenz ermöglichte zusätzlich die kombinierte Aufnahme der individuellen Spektren in nur einem kinetischen Datensatz. Dabei wurden die verschiedenen Spinsysteme ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  bzw.  $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$ ) wechselweise (jeweils variierend in geraden und ungeraden Datenpunkten) editiert. Damit wurde die Analyse des zeitlichen Verlaufs individueller Signale auch für größere RNA-Konstrukte ermöglicht.

Das bei der Größe der in dieser Arbeit untersuchten RNA-Konstrukte kritische *Signal-zu-Rausch* Verhältnis wurde durch die selektive Anregung der Iminprotonenspinmagnetisierung unter Ernst-Winkel-Bedingungen optimiert (29). Zur wechselweisen Editierung der unterschiedlichen Spinsysteme in den geraden bzw. ungeraden Datenpunkten des Experimentes wurden zwei  $^{15}\text{N}$ - $90^\circ$ -Pulse angewandt, von welchen die Phase des Ersten ( $\varphi^*$ : x,-x) abwechselnd in den zeitlich aufeinander folgenden 1D NMR-Experimenten inkrementiert wurde. Dadurch wiesen die verschiedenen Spinsysteme in geraden Datenpunkten ein entgegengesetztes Vorzeichen auf, während sie in ungeraden Datenpunkten das gleiche Vorzeichen aufwiesen. Die  $^1\text{H}$ , $^{14}\text{N}$ -editierte Kinetik konnte so durch Summierung von geraden und ungeraden Datenpunkten extrahiert werden, während die  $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -editierte Kinetik durch die Differenz von geraden und ungeraden Datenpunkten erhalten wurde. Damit reduzierte sich die Anzahl der im gesamten Spektrum

aufgenommenen 1D NMR-Experimente in den individuell editierten Kinetiken um die Hälfte und jeweils zwei aufeinander folgende Datenpunkte definierten den jeweils ersten Datenpunkt der separierten Kinetiken (30).

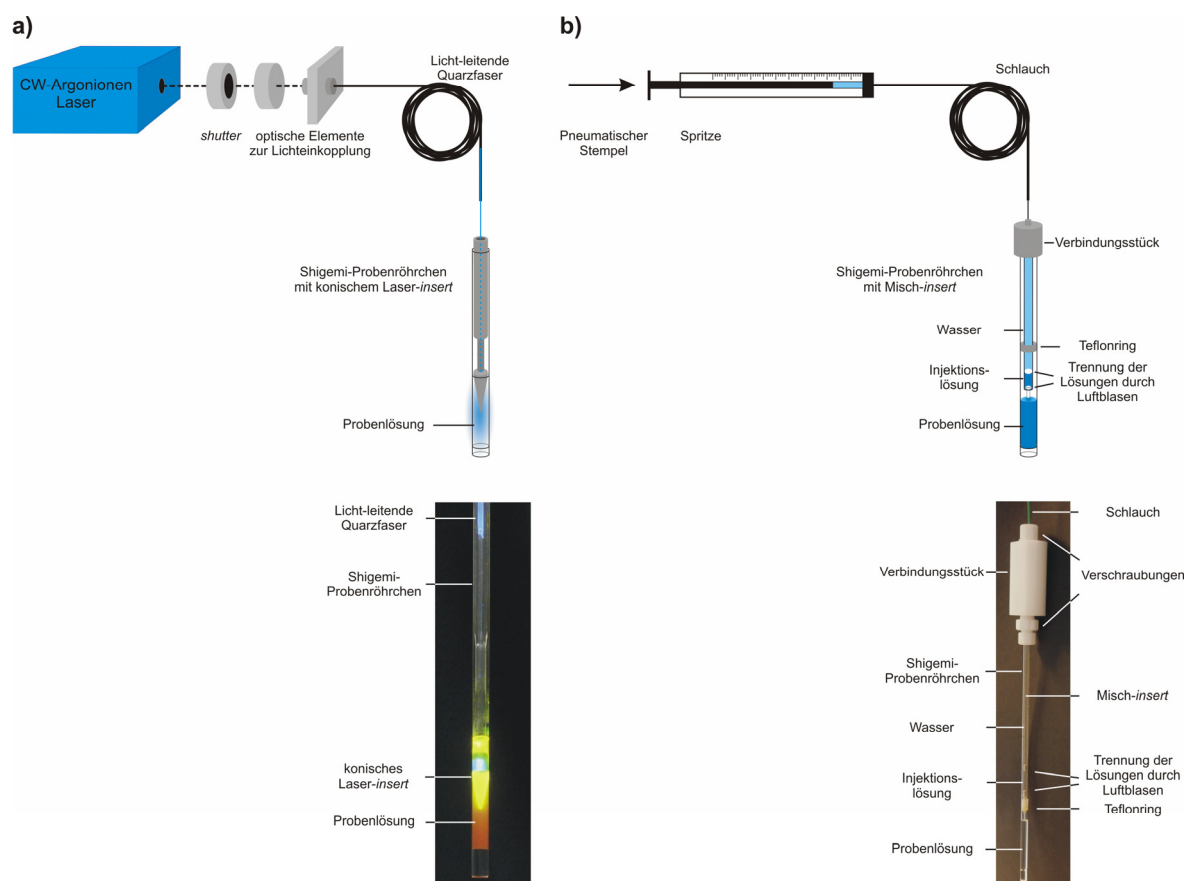


**Abbildung 2.2:** NMR-Pulsprogramm zur Aufnahme der zeitaufgelösten *X-filter* Experimente; 90°-Pulse werden durch schmale Rechtecke symbolisiert, deren Phase  $x$  entspricht, sofern nicht anders angegeben; Phasenzyklus:  $\varphi_1$ :  $x, x, y, y, -x, -x, -y, -y$ ;  $\varphi_2$ :  $-x, -x, -y, -y, x, x, y, y$ ;  $\varphi^*$ :  $x, -x$  (abwechselnd inkrementiert in L1);  $\varphi_{rec}$ :  $x, x, -x, -x$ ; L1: Anzahl der zeitlich aufeinander folgenden 1D NMR-Experimente; L2: Häufigkeit der Reaktionsinitierungssignale durch Lasereinstrahlung bzw. Mischung;  $\cos\beta = \exp(-T/T_1^{Imino})$ ;  $\Delta = 1/2J_{NH}$  mit  $J_{NH} \sim 90$  Hz;  $\tau$ : *jump-return* Zeitkonstante;  $\tau_L$ : Zeitspanne des Signals zur Reaktionsinitierung; Die Addition bzw. Subtraktion von jeweils zwei aufeinanderfolgenden 1D-Spektren resultiert dann in den entsprechend Nukleotid-spezifisch separierten Kinetiken.

Die zeitaufgelösten NMR-Experimente wurden als pseudo-3D Datensatz mit jeweils zeitlich aufeinander folgenden eindimensionalen Spektren aufgenommen. Dabei entsprachen die Dimensionen des pseudo-3D Datensatzes der chemischen Verschiebung und der zeitlichen Abfolge der Spektren, wobei eine Ebene vor (Grundzustand) und eine beliebige Anzahl von Ebenen nach der Initiierung der Kinetik aufgenommen werden konnte. Die individuellen Zeitkonstanten  $k$  [ $s^{-1}$ ] der verschiedenen Signale wurden aus dem zeitlichen Verlauf der spektralen Parameter, Intensität bzw. Integral, des jeweiligen Signals ermittelt. Die Analyse der kinetischen Daten erfolgte mittels der Software TopSpin 2.1, felix2000 (Accelrys, San Diego) und SigmaPlot 11.0 (siehe Anhang).

## Experimentelle Bedingungen zur Aufnahme der Licht-induzierten NMR-Kinetiken

Die Licht-induzierte Aktivierung der photogeschützten Verbindung *in situ* innerhalb des NMR-Spektrometers erfolgte mit Hilfe eines speziellen Laseraufbaus (31). Dabei wurde der Strahl eines CW-Argonionen Lasers (BeamLok 2060, Spectra Physics, Darmstadt) mit einer Emission bei 340-365 nm in eine Licht-leitende Quarzfaser (CeramOptec, Bonn) und darüber anschließend in die Probe eingekoppelt. Hier sorgte ein speziell gefertigtes, konisch angespitztes *insert* eines Shigemi-Probenröhrchens für eine optimale Belichtung der Probe. Die Strahlungsleistung (Laserleistung  $\sim 7-9$  W) beim Probeneintritt entsprach dabei  $\sim 4$  W. Die Dauer der Belichtungszeit der NMR-Probe wurde über ein zusätzliches Element, den so genannten *shutter*, kontrolliert, der über eine Befehlssequenz im NMR-Pulsprogramm gesteuert werden konnte (Abbildung 2.3).



**Abbildung 2.3:** Schematischer Aufbau (oben) und Fotografie (unten) der Apparaturen zur *in situ* Initiierung von Faltungsprozessen im NMR-Probenröhrchen innerhalb des NMR-Spektrometers; **a)** Initiierung durch Lichteinstrahlung; **b)** Initiierung unter Verwendung einer Mischapparatur.



## Experimentelle Bedingungen zur Aufnahme von NMR-Kinetiken unter Verwendung einer Mischapparatur

Die *in situ* Initiierung einer Reaktion kann auch durch Injektion einer Lösung zur Probenlösung selbst erreicht werden. Die Verwendung einer für zeitaufgelöste NMR-Untersuchungen von P.J. Hore et al. entwickelten Mischapparatur (32, 33) ermöglicht die Mischung zweier Lösungen im NMR-Probenvolumen selbst.

Die in dieser Arbeit verwendete Mischapparatur (Abbildung 2.3) basierte auf einer leicht modifizierten Variante der von P.J. Hore et al. entwickelten Apparatur. Mit Hilfe einer Befehlssequenz im NMR-Pulsprogramm wurde die durch gasförmigen Stickstoff (~7 bar) induzierte Auslösung eines pneumatischen Stempels gesteuert, der als Folge den Stempel einer Glasspritze (1 ml, SGE Analytical Science, Griesheim) bewegte. Die elektronische Aktivierung des Signals benötigte dabei eine minimale Zeit von ~10 ms. Durch die Bewegung des Stempels wurde die zuvor im *insert* der Mischapparatur aufgezogene Injektionslösung in die Probenlösung injiziert. Die pneumatische Apparatur und die Spritze selbst befanden sich außerhalb des NMR-Spektrometers und waren über einen Schlauch mit dem *insert* im Shigemi-Probenröhrchen verbunden. Der Schlauch endete dabei in einem Verbindungsstück, mit welchem sowohl das *insert* selbst als auch das Shigemi-Probenröhrchen durch Verschraubungen befestigt waren. Zur Vermeidung von Lösungsdiffusionen wurden bei der Probenpräparation zwischen den verschiedenen Lösungskomponenten jeweils kleine Luftblasen aufgezo-gen. Die Stabilisierung des Misch-*inserts* innerhalb des Shigemi-Probenröhrchens zur Minimierung von Druckvermittelten Inhomogenitäten wurde über zusätzliche Teflonringe gewährleistet. Das *insert* selbst schloss mit einer Glaskapillare ab, welche zur Minimierung von Turbulenzen während dem Mischvorgang gerade an die Oberfläche der Probenlösung angrenzte. Um eine bestmögliche magnetische Feldhomogenität zu gewährleisten, wurde das Shigemi-Probenröhrchen so positioniert, dass die Glaskapillare außerhalb des NMR-aktiven Probenvolumens lag (Abbildung 2.3).

## LITERATUR

1. Davanloo, P., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Studier, F.W. (1984) Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2035-9.
2. Noeske, J. (2007) Strukturelle Untersuchungen an Metabolit-bindenden Riboswitch-RNAs mittels NMR. Dissertation, J.W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

3. Sambrook, J., Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
4. Noeske, J., Richter, C., Grundl, M.A., Nasiri, H.R., Schwalbe, H., Wöhnert, J. (2005) An intermolecular base triple as the basis of ligand specificity and affinity in the guanine- and adenine-sensing riboswitch RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 1372-7.
5. Buck, J. (2005) Chemische, biochemische und NMR-spektroskopische Untersuchungen der Kinetik der ligandinduzierten Umfaltung von Riboswitch-RNA. Diplomarbeit, J.W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
6. Buck, J., Fürtig, B., Noeske, J., Wöhnert, J., Schwalbe, H. (2007) Time-resolved NMR methods resolving ligand-induced RNA folding at atomic resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 15699-704.
7. Akoka, S., Barantin, L., Trierweiler, M. (1999) Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method. *Anal. Chem.*, **71**, 2554-7.
8. Schulman, M.P., Buchanan, J.M. (1952) Biosynthesis of the purines. Metabolism of 4-amino-5-imidazolecarboxamide in pigeon liver. *J. Biol. Chem.*, **196**, 513-26.
9. Sprecher, C.A., Johnson, W.C., Jr. (1977) Circular dichroism of the nucleic acid monomers. *Biopolymers*, **16**, 2243-64.
10. Ghosn, B., Haselton, F.R., Gee, K.R., Monroe, W.T. (2005) Control of DNA hybridization with photocleavable adducts. *Photochem. Photobiol.*, **81**, 953-9.
11. Goddard, T.D., Kneller, D.G. SPARKY 3. University of California, San Francisco.
12. Wishart, D.S., Bigam, C.G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H.J., Oldfield, E., Markley, J.L., Sykes, B.D. (1995)  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR*, **6**, 135-40.
13. Bodenhausen, G., Ruben, D.J. (1980) Natural abundance Nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, **69**, 185-9.
14. Dingley, A.J., Grzesiek, S. (1998) Direct observation of hydrogen bonds in nucleic acid base pairs by internucleotide  $^2\text{J}_{\text{NN}}$  couplings. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 8293-7.
15. Fürtig, B., Richter, C., Wöhnert, J., Schwalbe, H. (2003) NMR spectroscopy of RNA. *Chembiochem*, **4**, 936-62.
16. Liu, M., Mao, X., Ye, C., Huang, H., Nicholson, J.K., Lindon, J.C. (1998) Improved WATERGATE pulse sequences for solvent suppression in NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, **132**, 125-9.
17. Piotto, M., Saudek, V., Sklenar, V. (1992) Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR*, **2**, 661-5.
18. Sklenar, V., Bax, A. (1987) A new water suppression technique for generating pure-phase spectra with equal excitation over a wide bandwidth. *J. Magn. Reson.*, **75**, 378-83.

19. Shaka, A.J., Barker, P.B., Freeman, R. (1987) 3-Spin effects in broad-band decoupling. *J. Magn. Reson.*, **71**, 520-31.
20. Flinders, J., Dieckmann, T. (2006) NMR spectroscopy of ribonucleic acids. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spec.*, **48**, 137-59.
21. Wijmenga, S.S., van Buuren, B.N.M. (1998) The use of NMR methods for conformational studies of nucleic acids. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spec.*, **32**, 287-387.
22. Varani, G., Aboul-ela, F., Allain, F.H.T. (1996) NMR investigation of RNA structure. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spec.*, **29**, 51-127.
23. Cromsig, J., van Buuren, B., Schleucher, J., Wijmenga, S. (2001) Resonance assignment and structure determination for RNA. *Methods Enzymol.*, **338**, 371-99.
24. Feigon, J., Butcher, S.E., Finger, L.D., Hud, N.V. (2001) Solution nuclear magnetic resonance probing of cation binding sites on nucleic acids. *Methods Enzymol.*, **338**, 400-20.
25. Kang, R.S., Daniels, C.M., Francis, S.A., Shih, S.C., Salerno, W.J., Hicke, L., Radhakrishnan, I. (2003) Solution structure of a CUE-ubiquitin complex reveals a conserved mode of ubiquitin binding. *Cell*, **113**, 621-30.
26. Cowan, J.A. (1993) Metallobiochemistry of RNA.  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  as a probe for  $\text{Mg}^{2+}(\text{aq})$  binding sites. *J. Inorg. Biochem.*, **49**, 171-5.
27. Gonzalez, R.L., Jr., Tinoco, I., Jr. (2001) Identification and characterization of metal ion binding sites in RNA. *Methods Enzymol.*, **338**, 421-43.
28. Otting, G., Wüthrich, K. (1989) Extended heteronuclear editing of 2D  $^1\text{H}$  NMR spectra of isotope-labeled proteins, using the X ( $\omega_1, \omega_2$ ) double half filter. *J. Magn. Reson.*, **85**, 586-94.
29. Ernst, R.R., Bodenhausen, G., Wokaun, A. (1994) Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions. Oxford University Press.
30. Buck, J., Fürtig, B., Noeske, J., Wöhnert, J., Schwalbe, H. (2009) Time-resolved NMR-spectroscopy: ligand-induced refolding of riboswitches. *Methods of Molecular Biology (Riboswitches, A. Serganov (ed.))*, **540**, 161-71.
31. Kühn, T., Schwalbe, H. (2000) Monitoring the kinetics of ion-dependent protein folding by time-resolved NMR spectroscopy at atomic resolution. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 6169-74.
32. Mok, K.H., Kuhn, L.T., Goetz, M., Day, I.J., Lin, J.C., Andersen, N.H., Hore, P.J. (2007) A pre-existing hydrophobic collapse in the unfolded state of an ultrafast folding protein. *Nature*, **447**, 106-9.
33. Mok, K.H., Nagashima, T., Day, I.J., Jones, J.A., Jones, C.J., Dobson, C.M., Hore, P.J. (2003) Rapid sample-mixing technique for transient NMR and photo-CIDNP spectroscopy: applications to real-time protein folding. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 12484-92.



# **KAPITEL 3**

CHARAKTERISIERUNG DER LIGAND-INDUZIERTEN  
FALTUNG DER GUANIN RIBOSWITCH-RNA

## EINLEITUNG

Das Verständnis zellulärer Mechanismen erfordert neben der Aufklärung der auftretenden Konformationen der entsprechenden Biomakromoleküle auch die Analyse der möglicherweise mit der Funktion gekoppelten konformationellen Übergänge. Konformationelle Übergänge können für RNAs beispielsweise in Folge der Bindung von Proteinen (1), Ionen (2) oder niedermolekularen Metaboliten (3-5), von pH- (6) oder Temperaturveränderungen (7) oder durch strukturelle Modifikationen (8) auftreten.

Die NMR-Spektroskopie ermöglicht die Charakterisierung sowohl struktureller Zustände in Lösung als auch dynamischer Prozesse auf unterschiedlichsten Zeitskalen mit atomarer Auflösung. Mit dem Begriff Zustand wird hier zum einen das Ensemble von Konformationen definiert, welches je nach Bedingungen mehr oder weniger stark um eine gemittelte Konformation fluktuiert. Zum anderen können aber auch zwei oder mehrere signifikant unterschiedliche, durch hohe energetische Barrieren getrennte Konformationen betrachtet werden. Zur Untersuchung von RNA-Dynamik, die auf unterschiedlichen Zeitskalen verlaufen kann, wurden verschiedenste NMR-spektroskopische Methoden, unter anderem auch im Rahmen dieser Arbeit, entwickelt (9). Die Dynamik von Basenpaarungsinteraktionen kann beispielsweise anhand von Iminoprotonen-Austauschraten ermittelt werden (10), skalare Kopplungen geben Aufschluss über Fluktuationen in Dihedralwinkeln (11) und schnelle interne Dynamiken im Bereich von Piko- bis Nanosekunden können durch die Analyse von Spin-Spin-Relaxationsraten (12) erhalten werden. Die Untersuchung von RNA-Faltungsprozessen auf einer Zeitskala von Millisekunden bis Stunden kann mittels zeitaufgelöster NMR-Methoden in Echtzeit (*real time*) charakterisiert werden (13).

Für die Aufnahme von biomakromolekularen Faltungsprozessen mittels zeitaufgelöster *real time* NMR-Spektroskopie sind aus methodischer Sicht verschiedene Voraussetzungen zu erfüllen.

Zum einen muss die Initiierung des Faltungsprozesses *in situ* erfolgen, mit einer möglichst kurzen Reaktionszeit verbunden und reproduzierbar sein. Diese Voraussetzungen können mittels verschiedener Methoden wie beispielsweise (i) dem Einsatz von photogeschützten (*caged*) Verbindungen in Kombination mit deren Licht-induzierter Aktivierung oder (ii) der schnellen Mischung zweier Lösungen jeweils *in situ* innerhalb des NMR-Spektrometers erreicht werden. Das Prinzip des *caging* von Molekülen, d. h. das Blockieren einer funktionellen Gruppe mit einer photolabilen Schutzgruppe, wurde für verschiedene biologische Systeme angewandt (14). Der Einsatz von photogeschützten Verbindungen wurde in Kombination mit einem

speziellen Laseraufbau in der Arbeitsgruppe bereits in zeitaufgelösten NMR-Experimenten zur Untersuchung von Protein- (15) und RNA-Faltungen (16, 17) eingesetzt. Eine Apparatur zur schnellen Mischung zweier Lösungen im aktiven NMR-Probenvolumen wurde in der Gruppe von P.J. Hore entwickelt und erfolgreich in zeitaufgelösten NMR-Proteinfaltungsstudien eingesetzt (18, 19).

Zum anderen setzt die Nukleotid-spezifische Analyse der kinetischen NMR-Experimente eine entsprechende Auflösung im jeweilig untersuchten spektralen Bereich voraus, für die gegebenenfalls die Molekülgröße limitierend sein kann. Entsprechend muss die NMR-spektroskopische Detektionsmethodik optimiert werden (13).

Im Falle der NMR-spektroskopischen Untersuchungen von RNA-Faltungsprozessen eignen sich speziell die Iminoprotonenresonanzen für eine kinetische Analyse. Vorteilhaft ist hierbei zum einen die Auflösung der Signale in diesem spektralen Bereich (20, 21). Zum anderen sind diese Protonen in schnelle Austauschprozesse mit dem Lösungsmittel involviert und so in NMR-Spektren nur detektierbar, sobald diese Prozesse verhindert sind. Damit gibt die Detektierbarkeit von Iminoprotonen in NMR-Spektren direkten Aufschluss über Nukleotide, deren entsprechende Proton in Sekundär- oder Tertiärstrukturinteraktionen involviert und somit austauschgeschützt ist (21).

Das postulierte Regulationsprinzip, das Riboswitch-RNA Elementen zu Grunde liegt, stellt ein wichtiges Beispiel für einen konformationellen Übergang dar, der in Folge einer spezifischen Ligandbindung auftritt. Basierend auf diesem Modell führen die in Abhängigkeit der Ligandkonzentration jeweils alternativ stabilisierten RNA-Konformationen zur Regulation der Genexpression (22) (siehe Kapitel 1). Neben der Aufklärung der Kristallstrukturen zahlreicher RNA-Ligand Komplexe (23-25) wurden verschiedene kinetische und thermodynamische Untersuchungen der Ligand-induzierten RNA-Faltungsprozesse durchgeführt. Die bisher kinetisch untersuchten Systeme schließen die durch FMN- (26), TPP- (27), zyklisches di-GMP- (28) und Purin-vermittelten (29-32) Riboswitch-RNA Elemente ein und zeigen übereinstimmend langsame Ligand-induzierte RNA-Faltungsprozesse, die auf einer Zeitskala von Sekunden stattfinden.

## MATERIAL UND METHODEN

### RNA-Konstrukte

Die in *B. subtilis* identifizierte Wildtyp Sequenz der *xpt-pbuX* Guanin Riboswitch Aptamerdomäne (33) wurde an drei Sequenzpositionen mutiert ( $Gsw^{apt}$ ), um für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen eine stabilere RNA-Struktur zu erhalten (34, 35). Die Mutationen betreffen die Sequenz-Positionen U14→C, C15→U und A34→G und sind in der sich daraus ergebenden RNA-Sequenz schwarz hervorgehoben:

5'-GGGACUCAUUAUAAC**CUGCGUGGAUAUGGCACGCAGGUUUCUACCGGGCACCG**  
UAAAUGUCCGACUAUGGGUCCC-3'

In vorangegangenen NMR-spektroskopischen Untersuchungen von Noeske et al. (34, 35) konnte die Vergleichbarkeit dieses RNA-Konstruktes mit der Wildtyp RNA-Sequenz gezeigt werden.

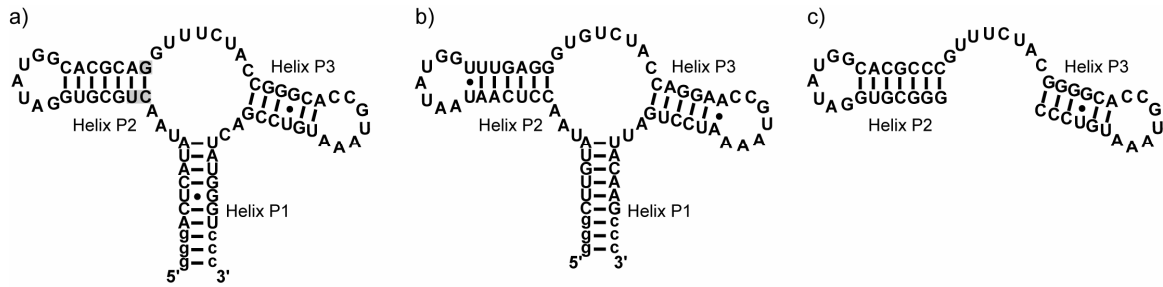
Die RNA-Sequenz der Adenin-abhängigen Riboswitch Aptamerdomäne ( $Asw^{apt}$ ), die in den NMR-Untersuchungen eingesetzt wurde, entspricht der *pbuE* mRNA aus *B. subtilis* (36):

5'-GGGCUUGUAUAACCUCAAUAAUAUGGUUUGAGGGUGUCUACCAGGAACCGU  
AAAAUCCUGAUUACAAGCCC-3'

Die *in vitro* Synthese und anschließende Aufreinigung der Riboswitch-RNA-Konstrukte erfolgte wie in Kapitel 2 beschrieben. Die für die Effizienz der *in vitro* Transkription zusätzlich eingeführten Nukleotide in Helix P1 sind in den RNA-Sequenzen der beiden RNA-Konstrukte grau gekennzeichnet.

Das für die Analyse der NMR-Ligand-Linienbreiten als Kontrolle eingesetzte Modell-RNA-Konstrukt 'Helix P2-P3' wurde von Dharmacon (Boulder) bezogen. Für die Untersuchungen wurde dieses Modell-RNA-Konstrukt gewählt, da hierfür in vorangegangenen NMR-Experimenten trotz fehlender Strukturbereiche im Vergleich zu  $Gsw^{apt}$  bereits die Ausbildung einer interhelikalen Schlaufenwechselwirkung detektiert werden konnte (37). Die Sekundärstrukturen der in diesem Kapitel eingesetzten RNA-Konstrukte sind in Abbildung 3.1 dargestellt.





**Abbildung 3.1:** Sekundärstrukturen der RNA-Konstrukte; **a)** Guanin Riboswitch Aptamerdomäne ( $Gsw^{ap}$ ); Mutationen im Vergleich zur Wildtyp RNA-Sequenz (33) sind grau hinterlegt; **b)** Adenin Riboswitch Aptamerdomäne (36) ( $Asw^{ap}$ ); die für die Effizienz der *in vitro* Transkription zusätzlich eingeführten Nucleotide in Helix P1 sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet; **c)** Modell-RNA-Konstrukt 'Helix P2-P3' (die Sekundärstrukturbestimmung erfolgte mittels *Mfold* (38)).

### Zeitaufgelöste NMR-Experimente

Die zeitaufgelösten NMR-Experimente wurden an einem Bruker AV800 MHz NMR-Spektrometer in NMR-Puffer mit  $H_2O:D_2O \sim 9:1$  bei einer Temperatur von 283 K aufgenommen. Die Initiierung der RNA-Faltungsreaktion wurde durch die Licht-induzierte Aktivierung des photogeschützten Liganden Hypoxanthin ( $Hyp^*DMNPE$ ) erreicht. Die experimentellen Bedingungen der Ligand-Synthese und der Laser-induzierten *in situ* Initiierung der NMR-Kinetiken sind in Kapitel 2 beschrieben.

Die Effizienz der Licht-induzierten Aktivierung der photogeschützten Verbindung wurde in einer separaten Probe unter den experimentellen Bedingungen (Konzentration, Temperatur, Puffer, Optimierung der Lasereffizienz) der anschließenden Kinetik optimiert. Es wurde eine optimale Freisetzung des Liganden von 80% bei einer Lasereinstrahlung von  $\sim 1.5$  s für eine Konzentration der photogeschützten Verbindung von  $\sim 250 \mu M$  erreicht.

Die Detektion der zeitaufgelösten Kinetiken erfolgte für die Faltung der  $Gsw^{ap}$ -RNA mittels der in Kapitel 2 beschriebenen NMR-Methode für selektiv isotoopenmarkierte RNA-Konstrukte. Hierfür wurde die RNA selektiv  $^{15}N$ -Uridin isotoopenmarkiert und die Ligand-induzierte Kinetik mit Hilfe der zeitaufgelösten NMR-Filtermethode (Abbildung 2.2) unter den im Folgenden aufgeführten experimentellen Bedingungen durchgeführt. Zur Aufnahme des Grundzustandes der Reaktion wurden 128 Datenpunkte (jeweils 8 Scans/Datenpunkt in einem Zeitintervall von 2.1 s) vor der Belichtung aufgenommen. Die Freisetzung des Liganden Hypoxanthin erfolgte durch eine Lasereinstrahlung von  $\sim 1.5$  s, worauf die Aufnahme der zeitaufgelösten

Bindungskinetik in weiteren 128 Datenpunkten erfolgte. Nach Prozessierung des daraus resultierenden pseudo-3D Datensatzes und Fourier-Transformation (exponentielle Multiplikation des FID mit Linienverbreiterungsfaktor von  $\sim 20$  Hz), Phasenkorrektur und Basislinienkorrektur wurden 5 Kinetiken, die unter identischen Bedingungen aufgenommen wurden, summiert, um eine verbesserte Empfindlichkeit der Spektren zu erhalten (*Signal-zu-Rausch* Verhältnis (*signal-to-noise*, S/N) der Spektren wurde in einem spektralen Bereich von  $S/N \sim 12.9-13.4$  ppm/ $15.0-16.5$  ppm ermittelt und zeigte Verhältnisse von  $S/N_{\text{Einzelspektrum}} \sim 1:5.8$  und von  $S/N_{\text{Summe 5 Kinetiken}} \sim 1:12.9$ ; damit entspricht die Verbesserung der Empfindlichkeit dem theoretisch erwarteten Faktor von  $\sim \sqrt{n}$ , mit  $n \sim$  Anzahl der aufsummierten Spektren).

Die separierten Nukleotid-spezifischen kinetischen Datensätze (Kinetik der Guanosin- bzw. Uridin-Signale) wurden, wie in Kapitel 2 beschrieben, erhalten. Die zeitabhängige Analyse der Signale wurde über die Integration der Signal-Halbwertsbreiten vorgenommen. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden über den zeitlichen Verlauf der Kinetik von 250 s ermittelt. Die Analyse erfolgte nach Nullwertkorrektur und Normierung der ermittelten Werte anhand des Mittelwertes der 20 letzten Datenpunkte. Der zeitliche Verlauf der individuellen Signale konnte mittels einer monoexponentiellen Funktion analysiert werden. Für die Analyse der Iminoprotonensignale von G31 und Hypoxanthin (N9-H9) wurde der zusätzliche Fit-Parameter  $y_0$  eingesetzt (Funktion:  $f(x)=y_0+a*[1-\exp(-b*x)]$ ). Hierdurch wurde berücksichtigt, dass der erste Datenpunkt für diese beiden Signale kleiner war als der Nullpunkt der entsprechenden individuellen Kinetik. Diese Beobachtung wurde auf Laser-induzierte Effekte zurückgeführt. Die Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  [s] wurden mittels der Gleichung für einen Prozess erster Ordnung erhalten ( $t_{1/2}=\ln 2/k$ ). Der für  $k$  angegebene Fehler entspricht dem Fehler der Fit-Funktion. Die für  $t_{1/2}$  angegebenen Fehlerwerte wurden über die entsprechende Fehlerfortpflanzung ermittelt.

### **Bestimmung von NMR-Linienbreiten**

Die NMR-Experimente zur Bestimmung der Ligand-Linienbreiten wurden an einem Bruker DRX600 MHz NMR-Spektrometer durchgeführt. Es wurden  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC Experimente mit  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Entkopplung während der Datenaufnahme aufgenommen. Die NMR-Proben wurden jeweils bei einem [RNA]:[Ligand]-Verhältnis von  $\sim 5:1$  und einer Temperatur von 283 K in NMR-Puffer mit  $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O} \sim 9:1$  aufgenommen, dabei diente DSS als Referenz. Die 2D Spektren wurden jeweils mit 4096 Punkten in der  $^1\text{H}$ -Dimension aufgenommen und 8192 Punkten prozessiert. Die  $^{13}\text{C}$ -Trägerfrequenz wurde auf 142 ppm gesetzt und eine spektrale

Breite von 10 ppm in der  $^1\text{H}$ -Dimension und von 12 ppm in der  $^{13}\text{C}$ -Dimension aufgenommen. Die eingesetzte Relaxationswartezeit betrug 2.5 s. Die Probenzusammensetzung entsprach jeweils  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markiertem Ligand (Hypoxanthin oder Adenin) und nicht-isotopenmarkierter RNA. Die Linienbreiten ( $\Gamma^{1/2}$  ( $^1\text{H}$ ) [Hz]) der Signale C2-H2 und C8-H8 des jeweiligen Liganden wurden aus den 2D Spektren extrahiert und mittels Dekonvolution analysiert.

## MD-Simulationen

Die MD-Simulationen wurden in Zusammenarbeit mit Boris Fürtig (AK Schwalbe) durchgeführt und sollen somit hier nur kurz dargestellt werden. Ausgehend von einer vollständig unstrukturierten RNA wurden die Einschränkungen der MD-Simulationen basierend auf statischen und kinetischen NMR-Experimenten für drei Strukturesembles vorgenommen. Dabei wurden die Nukleotide und Strukturelemente entsprechend ihrer Detektierbarkeit in den NMR-Spektren eingeschränkt. Die Einschränkungen entsprechen den im Folgenden aufgeführten Eingaben und den in der Kristallstruktur des RNA-Ligand Komplexes (39) identifizierten nativen Kontakten. Für Wechselwirkungen der helikalen Strukturelemente und der interhelikalen Schlaufenwechselwirkung wurden die beteiligten Basenpaarungen eingeschränkt und Pseudo-Distanz Einschränkungen für CC-Distanzen bis zu 8 Å eingesetzt. Analoge Einschränkungen der jeweils involvierten Strukturbereiche wurden auch für die weiteren Strukturesembles vorgenommen. Die Torsionswinkel des RNA-Rückgrates wurden basierend auf den strukturell ermittelten Werten mit  $\pm 60^\circ$  in den Schlaufenregionen schwach eingeschränkt. Es wurde jeweils ein Ensemble von 100 Strukturen mittels eines Minimierungsalgorithmus (*simulated annealing*) berechnet, und die jeweils 20 energieärmsten Strukturen wurden analysiert. Das Protokoll entsprach folgenden Simulationsschritten (TAD-MD, *torsion angle dynamics-molecular dynamics*) (i) Startphase mit  $T_{\text{max}} \sim 20000$ , 4000 Schritte in Zeitintervallen von 0.01 ps, (ii) erste langsame *annealing* Phase mit Beginn bei  $T_{\text{max}} \sim 20000$ , 20000 Schritte in Zeitintervallen von 0.01 ps, (iii) zweite langsame *annealing* Phase mit Beginn bei  $T_{\text{max}} \sim 2000$ , 3000 Schritte in Zeitintervallen von 0.005 ps und (iv) eine darauf folgende Energieminimierung in acht Zyklen mit jeweils 1000 Minimierungsschritten. Die Simulationen wurden mittels der Software CNX2005 (Accelrys) durchgeführt.

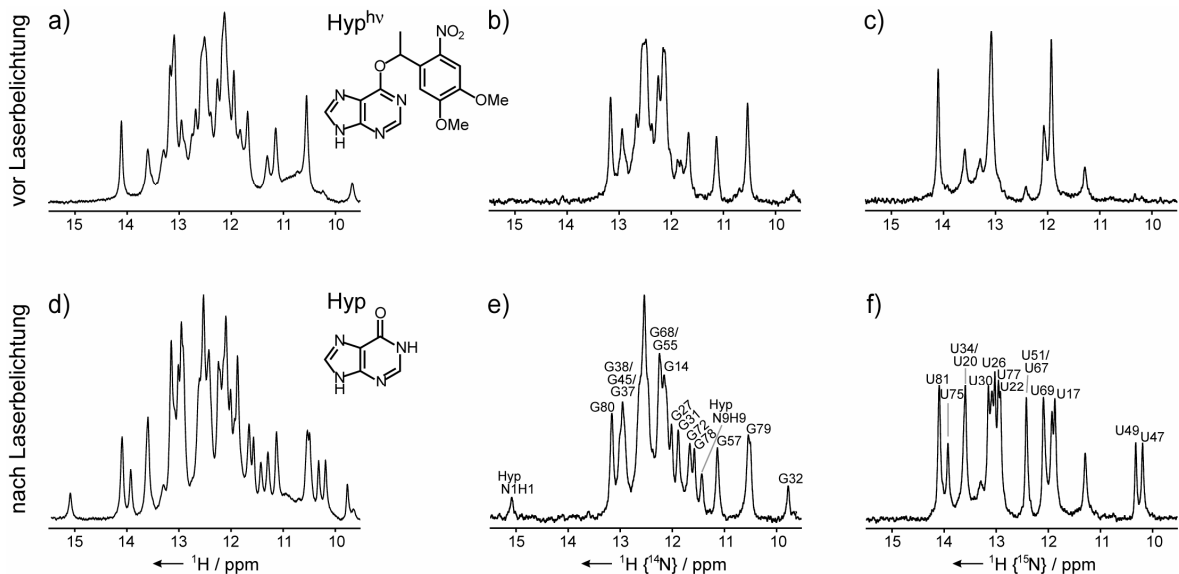
## ERGEBNISSE

### **Kinetik der spezifischen Ligandbindung an die Guanin Riboswitch-RNA Aptamerdomäne**

Im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die Kinetik der Ligandbindung an die Guanin Riboswitch Aptamerdomäne und die dadurch hervorgerufenen Strukturänderungen der RNA auf einer Zeitskala von Sekunden stattfinden und somit mittels zeitaufgelöster *real time* NMR-Methoden auflösbar sind. Um eine Licht-induzierte Initiierung der Ligandbindungsstudien der Gsw<sup>apt</sup>-RNA und deren Aufnahme mittels zeitaufgelöster NMR-Methoden zu ermöglichen, wurde der Ligand Hypoxanthin durch chemische Synthese mit einer Photoschutzgruppe substituiert (Hyp\*DMNPE). Diese Photoschutzgruppe blockiert dabei im photogeschützten Zustand die Watson-Crick Seite der Nucleobase Hypoxanthin, von der eine essentielle Beteiligung an der Erkennung und Bindung durch die RNA ermittelt werden konnte (34, 39, 40) (siehe Abbildung 1.4). Der Vergleich der NMR-Spektren dieser Riboswitch-RNA in der Ligand-freien und -gebundenen Konformation zeigte charakteristische Signalveränderungen im Falle der Ausbildung des RNA-Ligand Komplexes. Die Iminoprotonen der Nucleotide der Ligand-Bindungsregion stellen dabei repräsentative Reportersignale der Komplexbildung dar, da sie ausschließlich im Falle der Ausbildung des Komplexes durch die zusätzliche Strukturierung der Ligand-Bindungstasche austauschgeschützt und damit detektierbar werden. Basierend auf der NMR-Resonanzzuordnung des Gsw<sup>apt</sup>-Hypoxanthin Komplexes (37) konnte somit gezeigt werden, dass eine Ligandbindung in Gegenwart des photogeschützten Liganden nicht stattfindet. Die Aktivierung der photogeschützten Verbindung durch Lasereinstrahlung bei einer Wellenlänge von 350 nm führte dann zu der Abspaltung der Photoschutzgruppe und somit zur Freisetzung des biologisch aktiven Liganden und dessen Bindung an die RNA (41, 42). Im Rahmen der Diplomarbeit wurden NMR-spektroskopische Faltungsstudien an nicht-isotopenmarkierter RNA durchgeführt, in denen verschiedene Geschwindigkeitskonstanten für unterschiedliche Signale der Riboswitch-RNA beobachtet werden konnten. Auf dieser Basis wurde ein erstes vorläufiges Faltungsmodell der Gsw<sup>apt</sup>-RNA infolge der Ligandbindung vorgestellt.

Aufbauend auf diesen Vorarbeiten wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit der Ligand-induzierte Faltungsmechanismus der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne mit Hilfe weiterentwickelter NMR-Methoden detailliert untersucht, um neben den bereits bekannten Strukturen der finalen RNA-Ligand Komplexe (34, 39, 40) Aufschlüsse über den dynamischen

Strukturbildungsprozess zu erzielen. Die  $Gsw^{apt}$ -RNA weist durch ihre Größe von 73 Nukleotiden in den 1D NMR-Spektren im Bereich der Iminprotonenresonanzen nur wenige aufgelöste Signale auf, wodurch die Nukleotid-spezifische Analyse der zeitaufgelösten NMR-spektroskopischen Untersuchungen limitiert war (Abbildung 3.2a,d).



**Abbildung 3.2:** Iminprotonen NMR-Spektren der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne; **a)** nicht-isotopenmarkierte RNA vor Laserbelichtung mit Strukturformel des photogeschützten Hypoxanthin ( $Hyp^{hv}$ ); **b)**  $^{15}N$ -Uridin markierte RNA,  $^{15}N$ -gefiltertes Spektrum zeigt die Guanosin-Signale vor Laserbelichtung; **c)**  $^{15}N$ -Uridin markierte RNA,  $^{15}N$ -ediertes Spektrum zeigt die Uridin-Signale vor Laserbelichtung; **d)** nicht-isotopenmarkierte RNA nach Laserbelichtung mit Strukturformel des freigesetzten Liganden Hypoxanthin (Hyp); **e)**  $^{15}N$ -Uridin markierte RNA,  $^{15}N$ -gefiltertes Spektrum zeigt die Guanosin-Signale nach Laserbelichtung mit annotierter NMR-Resonanzzuordnung (37) der aufgelösten Signale; **f)**  $^{15}N$ -Uridin markierte RNA,  $^{15}N$ -ediertes Spektrum zeigt die Uridin-Signale nach Laserbelichtung mit annotierter NMR-Resonanzzuordnung (37) der aufgelösten Signale.

Durch die Kombination von selektiver Isotopenmarkierung der RNA und NMR-Filterexperimenten konnte auch für eine RNA dieser Größe die kinetische Analyse von individuellen Signalen und damit eine detaillierte Interpretation des Strukturbildungsprozesses erreicht werden. Die zeitaufgelösten Untersuchungen konzentrierten sich auf die RNA-Iminprotonensignale, die im spektralen Bereich von 10-15 ppm ( $^1H$  chemische Verschiebung) zur Resonanz kommen. Die alternierende Editierung von  $^{14}N$ - bzw.  $^{15}N$ -gebundenen

Iminoprotonen einer selektiv  $^{15}\text{N}$ -Uridin markierten RNA mit Hilfe von NMR-Filtermethoden resultierte in der Nukleotid-spezifischen Detektion der NMR-Resonanzen (Uridin- bzw. Guanosin-Signale) und damit einer Verbesserung der spektralen Auflösung der jeweilig daraus resultierenden Einzelspektren (Abbildung 3.2).

RNA-Iminoprotonen zeigen auch in gefalteten RNA-Konformationen intrinsische Austauschprozesse mit dem Lösungsmittel (10). Diese Dynamik der Basenpaarungsinteraktionen könnten möglicherweise die hier beobachteten kinetischen Prozesse, d. h. die Signalaufbauzeiten der Iminoprotonen beeinflussen. Die Analyse der Wasseraustauschraten der Iminoprotonensignale der freien  $\text{Gsw}^{\text{apt}}$ -RNA und des RNA-Ligand Komplexes ergab übereinstimmende Werte für die in stabile Strukturelemente involvierten Nukleotide in einem Bereich von  $k [\text{s}^{-1}] \sim 3.1\text{-}6.7 \text{ s}^{-1}$  (42, 43). Als einzige Ausnahme wurde eine hohe Wasseraustauschrate für das Nukleotid G32 in beiden RNA-Konformationen detektiert ( $23.6 \pm 2.2 \text{ s}^{-1}$  in der Ligand-freien und  $18.4 \pm 1.3 \text{ s}^{-1}$  in der Ligand-gebundenen Konformation). Das Nukleotid G32 ist im Gegensatz zu den anderen Nukleotiden durch Stapelwechselwirkungen und nicht durch Wasserstoffbrückenbindungen austauschgeschützt. Die beobachteten stark abweichenden Wasseraustauschraten dieses Iminoprotonensignals erlaubten damit keine Interpretation der beobachteten Geschwindigkeitskonstante und reflektierten die hohe Flexibilität der involvierten Tertiärstruktur. Die ansonsten vergleichbaren Werte aller weiteren Nukleotide lassen hingegen eine Interpretation der zeitaufgelösten NMR-Experimente im Sinne einer globalen RNA-Faltung zu.

Die Kristallstruktur der Ligand-gebundenen Aptamerdomäne der Guanin-abhängigen Riboswitch-RNA zeigt den Aufbau einer kompakten Struktur, die neben den helikalen Strukturelementen auch zwei Bereiche komplexer Tertiärstrukturwechselwirkungen einschließt (39, 40). Zum einen wird die Ausbildung der Ligand-Bindungstasche durch zahlreiche Tertiärwechselwirkungen stabilisiert und zum anderen sind interhelikale Tertiärinteraktionen der apikalen Schlaufen zu beobachten (Abbildung 1.4).

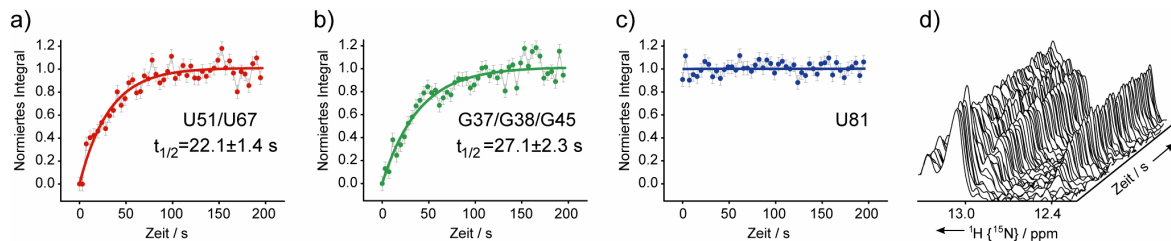
Die Analyse der zeitaufgelösten NMR-Experimente ergab, dass die kinetischen Aufbauzeiten der individuellen Signale in zwei Zeitbereiche fallen (Tabelle 3.1). Basierend auf der Kristallstruktur der Ligand-gebundenen RNA (39) konnte beobachtet werden, dass die Nukleotide, deren kinetische Werte jeweils den zwei Zeitbereichen zugeordnet werden konnten, auch strukturell unterschiedlichen Bereichen entsprechen (Abbildungen 3.3 und 3.4).

Nukleotid	$k$ [ $s^{-1}$ ]	$t_{1/2}$ [s]
U20/U34	$0.034 \pm 0.004$	$20.3 \pm 2.1$
U22/U77	$0.037 \pm 0.003$	$18.9 \pm 1.3$
U26	$0.023 \pm 0.002$	$30.6 \pm 3.0$
G31	$0.024 \pm 0.004$	$28.8 \pm 4.8$
G37/G38/G45	$0.026 \pm 0.002$	$27.1 \pm 2.3$
U47	$0.033 \pm 0.003$	$21.2 \pm 1.9$
U49	$0.029 \pm 0.002$	$23.5 \pm 1.9$
U51/U67	$0.031 \pm 0.002$	$22.1 \pm 1.4$
U75	$0.030 \pm 0.004$	$23.2 \pm 2.7$
Hypoxanthin (N9-H9)	$0.030 \pm 0.005$	$23.1 \pm 3.9$

**Tabelle 3.1:** Kinetische Daten des Licht-induzierten Bindungsprozesses von Hypoxanthin an die Guanin Riboswitch Aptamerdomäne Gsw<sup>apt</sup>.

Ein etwas schnellerer zeitlicher Verlauf mit Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$  [s]) im Bereich von 18.9-23.6 s wurde für die Nukleotide beobachtet, die in die Ausbildung der Ligand-Bindungstasche involviert sind (Abbildung 1.4). Dies beinhaltet die Signale der Nukleotide U51, U47 und U22 mit  $t_{1/2}$ -Werten von  $22.1 \pm 1.4$  s,  $21.2 \pm 1.9$  s und  $18.9 \pm 1.3$  s, welche jeweils direkte Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Ligand ausbilden. Zusätzlich beinhaltet die Bindungstasche mehrere Basentripel, die das Hypoxanthin einschließende Basenquadrupel flankieren. Die Iminoprotonensignale U75, U20 und U49 der beiden unterhalb ausgebildeten Basentripel (A21-U75-C50 und U20-A76-U49) zeigten  $t_{1/2}$ -Werte von  $23.2 \pm 2.7$  s,  $20.3 \pm 2.1$  s und  $23.5 \pm 1.9$  s. Oberhalb des den Ligand einschließenden Basenquadrupels wird in Folge der Ligandbindung ein Wasser-vermitteltes Basentripel gebildet (U22-A52-A73). Zusätzlich vervollständigt ein weiteres Basentripel der Nukleotide A23-G46-C53 die Struktur der Ligand-Bindungstasche. Die NMR-Resonanzen der Nukleotide U20, U22 und U51 sind in den 1D NMR-Spektren nicht aufgelöst, sondern jeweils mit denjenigen der Nukleotide U34, U77 und U67 überlagert. Die kinetische Interpretation wurde unter der Annahme vorgenommen, dass die schnelleren Kinetiken der in der Ligand-Bindungsregion angeordneten Nukleotide das kinetische Verhalten der Nukleotide U34, U77 oder U67 dominieren, welche den Schlaufenregionen und Helices der RNA angehören. Für den Ligand selbst konnte die Halbwertszeit des Signals N9-H9 mit  $23.1 \pm 3.9$  s bestimmt werden, während das *Signal-zu-Rausch* Verhältnis des Iminoprotonensignals N1-H1 keine kinetische Analyse ermöglichte. Daher wird

angenommen, dass das kinetische Verhalten des Liganden dem der RNA-Signale, die in dessen Erkennung und Bindung involviert sind, entspricht (Abbildungen 3.3 und 3.4).



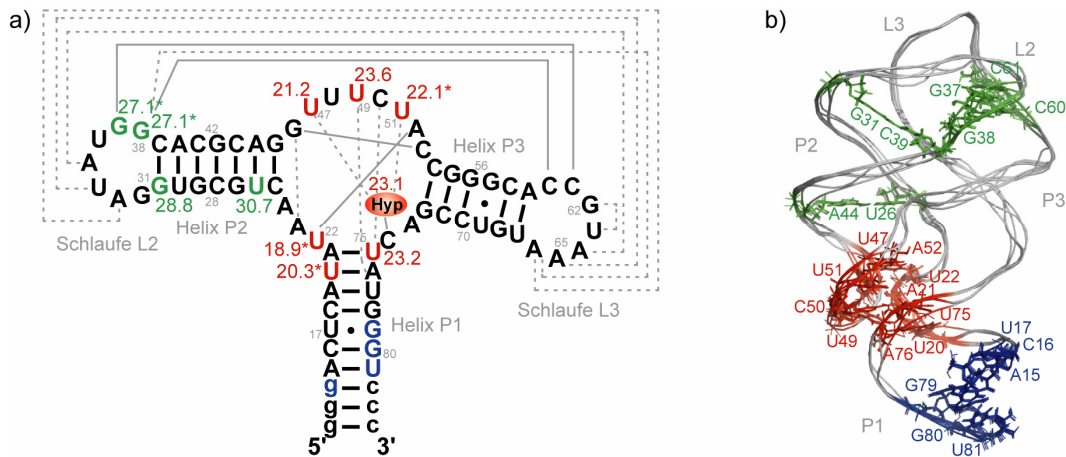
**Abbildung 3.3:** Zeitlicher Verlauf exemplarischer Iminoprotonensignale infolge der Ligand-induzierten RNA-Faltung; **a-c)** Normierte Integrale **a)** des Signals der Nukleotide U51/U67 der Ligand-Bindungsregion, **b)** des Signals der Nukleotide G37/G38/G45 der Schlaufenregion und **c)** des Signals des Nukleotids U81 aus Helix P1, jeweils als Funktion der Zeit mit monoexponentieller Fit-Funktion für die Signale U51/U67 und G37/G38/G45 und linearer Fit-Funktion für das Signal U81 (durchgezogene Linie); die Farbgebung entspricht den jeweiligen strukturellen Bereichen und ist analog der Darstellung in den Abbildungen 3.4 und 3.5; **d)** Darstellung der zeitlich aufeinander folgenden  $^{15}\text{N}$ -editierten 1D NMR-Spektren des zeitaufgelösten NMR-Experimentes (spektraler Bereich 12.2-13.4 ppm).

Im Gegensatz dazu konnte ein etwas langsamerer kinetischer Prozess mit Halbwertszeiten in einem Bereich von 27.1-30.7 s für Nukleotide der Helices P2 und P3 und der Schlaufenregionen (L2 und L3) der RNA beobachtet werden. Die Nukleotide der Schlaufenregionen L2 und L3 bilden zwei interhelikale Basenquadrupel aus (G38-C60 und A33-A66; G37-C61 und U34-A65), welche die parallele Anordnung der beiden Helices induziert (Abbildung 1.4) (39, 40). Die Analyse der zeitaufgelösten NMR-Experimente ergab für G38 und G37 (überlagertes Signal G37/G38/G45, wobei sich alle entsprechenden Nukleotide in der Schlaufenregion L2 oder der Helix P2 befinden) eine Halbwertszeit von  $27.1 \pm 2.3$  s. Das Iminoprotonensignal des Nukleotids U34 konnte aufgrund von Signalüberlagerungen nicht analysiert werden. Zusätzlich zu den durch Wasserstoffbrückenbindungen direkt in die interhelikale Wechselwirkung involvierten Nukleotiden konnte auch für Signale der Nukleotide G31 und U26 eine Halbwertszeit in diesem Zeitbereich beobachtet werden. Diese Nukleotide sind in Basenpaarungsinteraktionen der Helix P2 involviert. Für die Signale von G31 und U26 konnten Halbwertszeiten von  $28.8 \pm 4.8$  s und  $30.6 \pm 3.0$  s bestimmt werden.

Für einige RNA-Iminoprotonenresonanzen konnten keine signifikanten Unterschiede in der chemischen Verschiebung zwischen der Ligand-freien und -gebundenen Konformation der



RNA beobachtet werden. Dies gilt beispielsweise für die aufgelösten Signale der Nukleotide G79, G80, U81 und G14, welche der Bindungsregion entfernt lokalisierten Basenpaarungsinteraktionen der Helix P1 entsprechen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die strukturelle Umgebung dieser Helix unbeeinflusst von den Ligand-induzierten strukturellen Konformationsänderungen der RNA bleibt (Abbildungen 3.3 und 3.4).



**Abbildung 3.4:** Ergebnisse der zeitaufgelösten NMR-Untersuchungen des Hypoxanthin-induzierten Faltungsprozesses von Gsw<sup>apt</sup>; **a)** Sekundärstruktur und **b)** Strukturensemble des finalen RNA-Ligand Komplexes (erhalten aus der MD-Simulation, Abbildung 3.5) der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne jeweils einschließlich der kinetischen Ergebnisse ( $t_{1/2}$ -Werte [s] im Bereich von 18,9–23,6 s sind rot gekennzeichnet, Werte im Bereich von 27,1–30,7 s sind grün dargestellt, Signale der blau hervorgehobenen Nukleotide bleiben unbeeinflusst von dem Ligand-induzierten Faltungsprozess; *Stern:* überlagertes Signal; Hyp: Hypoxanthin; die Nomenklatur der Helices P1, P2 und P3 und der Schleifenregionen L2 und L3 gehen auf Mandal et al. (33) zurück; durchgezogene graue Linien repräsentieren Watson-Crick Basenpaarungsinteraktionen; gestrichelte graue Linien stellen nicht-kanonische Basenpaarungsinteraktionen dar.

### Charakterisierung eines nicht-spezifischen Bindungsprozesses

Neben der Beobachtung der spezifischen Bindungskinetik der Gsw<sup>apt</sup>-RNA wurden mögliche, zeitlich vorgelagerte nicht-spezifische Ligand-Bindungsprozesse basierend auf der Analyse von NMR-Linienbreiten untersucht. Es wurden die Linienbreiten der nicht-austauschenden Protonensignale C2-H2 und C8-H8 eines jeweils isotopenmarkierten Liganden (Hypoxanthin oder Adenin) in An- oder Abwesenheit von nicht-isotopenmarkierter RNA analysiert. Diese

NMR-Experimente wurden für freies Hypoxanthin und spezifisch gebundenes Hypoxanthin im Komplex mit Gsw<sup>apt</sup> durchgeführt. Zusätzlich wurden die Linienbreiten der Signale für Hypoxanthin in Gegenwart der Adenin Riboswitch Aptamerdomäne der *B. subtilis pbuE*-mRNA (Asw<sup>apb</sup>) analysiert. Die Adenin Riboswitch Aptamerdomäne ähnelt derjenigen der Guanin Riboswitch-RNA sowohl in der Sekundär- als auch der Tertiärstruktur der Ligand-gebundenen Konformation (36, 40). Der wesentliche Unterschied, der für die Erkennung und die ausschließliche Bindung des jeweilig entsprechend spezifischen Liganden bedeutend ist, ist das Nukleotid an der Sequenzposition 74, das in Asw<sup>apt</sup> durch ein Uridin und in Gsw<sup>apt</sup> durch ein Cytosin eingenommen wird. Dadurch wird jeweils die Bildung einer intermolekularen Watson-Crick-Interaktion zwischen der RNA und dem entsprechend komplementären Liganden ermöglicht. Asw<sup>apt</sup> bindet somit spezifisch und hochaffin den Ligand Adenin ( $K_D \sim 300$  nM), zeigt aber eine signifikant geringere Affinität für die Nukleobase Hypoxanthin ( $K_D > 300$   $\mu$ M) (36).

Die Linienbreite für freies Hypoxanthin konnte mit  $7.5 \pm 1.0$  Hz bestimmt werden, wohingegen für den Ligand in Gegenwart der Gsw<sup>apt</sup>-RNA eine Linienbreite von  $31.5 \pm 0.6$  Hz ermittelt wurde. Eine Linienbreite in dieser Größenordnung wird für einen spezifischen RNA-Ligand Komplex mit langsamen Austauschprozessen erwartet. In Gegenwart von Asw<sup>apt</sup> wurden keine chemischen Verschiebungsänderungen, dagegen aber Linienverbreiterungen der Hypoxanthin-Signale beobachtet. Der Wert der ermittelten Linienbreite liegt dabei mit  $11.5 \pm 0.5$  Hz zwischen dem des freien Liganden und Hypoxanthin im spezifischen Komplex mit Gsw<sup>apt</sup> (Tabelle 3.2). Dieses Ergebnis deutet auf eine schwach affine Bindung des Liganden an Asw<sup>apt</sup> hin, übereinstimmend mit Dissoziationsraten zwischen dem freien und dem gebundenen Zustand im Millisekundenbereich und damit einem schnellen Prozess auf der NMR-Zeitskala (Abbildung 3.5).

Die Analyse der entsprechenden NMR-Experimente mit der Nukleobase Adenin ergab vergleichbare Linienverbreiterungseffekte, sowohl für die spezifische Bindung an die Asw<sup>apt</sup>-RNA als auch für eine mögliche nicht-spezifische Ligandbindung in Gegenwart der Guanin Riboswitch-RNA Gsw<sup>apt</sup> (Tabelle 3.2). In Kontrollexperimenten mit einem RNA-Konstrukt, das zwar die Helices P2 und P3 mit den jeweiligen apikalen Schlaufenregionen von Gsw<sup>apt</sup> aufweist, aber durch das Fehlen von essentiellen Nukleotiden in der Ligand-Bindungsregion charakterisiert ist ('Helix P2-P3', Abbildung 3.2), wurde nur eine geringe Linienverbreiterung der Ligand-Signale beobachtet. Ein Kontrollexperiment mit diesem RNA-Konstrukt wurde für beide Liganden durchgeführt und ergab Linienbreiten von  $9.6 \pm 1.3$  Hz für Hypoxanthin und

10.3±0.6 Hz für Adenin. Zusammenfassend konnte durch diese Experimente gezeigt werden, dass Linienverbreiterungen durch eine generelle transiente Bindung an zufällige RNA-Sequenzen vernachlässigt werden kann, wohingegen die Linienverbreiterungen der Ligand-Signale in Gegenwart der jeweils entsprechenden Riboswitch-RNA die Annahme eines schwach affinen, nicht-spezifischen Ligand-Bindungsprozesses bestätigten.

RNA	Ligand ( <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N- markiert)	Mg <sup>2+</sup>	RNA- Charakteristika	Δσ [Hz]	ΔΓ <sup>1/2</sup> (Ligand) [Hz]	ΔΓ <sup>1/2</sup> <sub>rel</sub> [Hz]
--	Hypoxanthin	--	--	0.11	7.5 ± 1.0	--
Gsw <sup>apt</sup>	Hypoxanthin	--	spezifische Bindung von Hypoxanthin	0.13	31.5 ± 0.6	24
Gsw <sup>apt</sup>	Hypoxanthin	5 mM	spezifische Bindung von Hypoxanthin	0.12	30.5 ± 0.4	23
Asw <sup>apt</sup>	Hypoxanthin	--	keine spezifische Bindung von Hypoxanthin	0.06	11.5 ± 0.5	4
Helix P2-P3	Hypoxanthin	--	keine spezifische Bindung von Hypoxanthin	0.20	9.6 ± 1.3	2.1
--	Adenin	--	--	0.16	7.8 ± 0.1	--
Asw <sup>apt</sup>	Adenin	5 mM	spezifische Bindung von Adenin	0.04	27.8 ± 0.4	20
Gsw <sup>apt</sup>	Adenin	--	keine spezifische Bindung von Adenin	0.03	12.1 ± 0.1	4.3
Helix P2-P3	Adenin	--	keine spezifische Bindung von Adenin	0.07	10.3 ± 0.6	2.5

**Tabelle 3.2:** NMR-Linienbreiten der <sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N-markierten Liganden in Gegenwart der verschiedenen nicht-isotopenmarkierten RNA-Konstrukte (Δσ: Abweichung der NMR-Linienbreite des jeweiligen DSS-Referenzsignals vom Mittelwert der DSS-Linienbreiten; ΔΓ<sup>1/2</sup> (Ligand), Ligand-Linienbreite: Mittelwert der Linienbreiten der Signale C2-H2 und C8-H8 des jeweiligen Liganden; ΔΓ<sup>1/2</sup><sub>rel</sub>: Abweichung der NMR-Linienbreite relativ zur Linienbreite des jeweiligen freien Liganden).

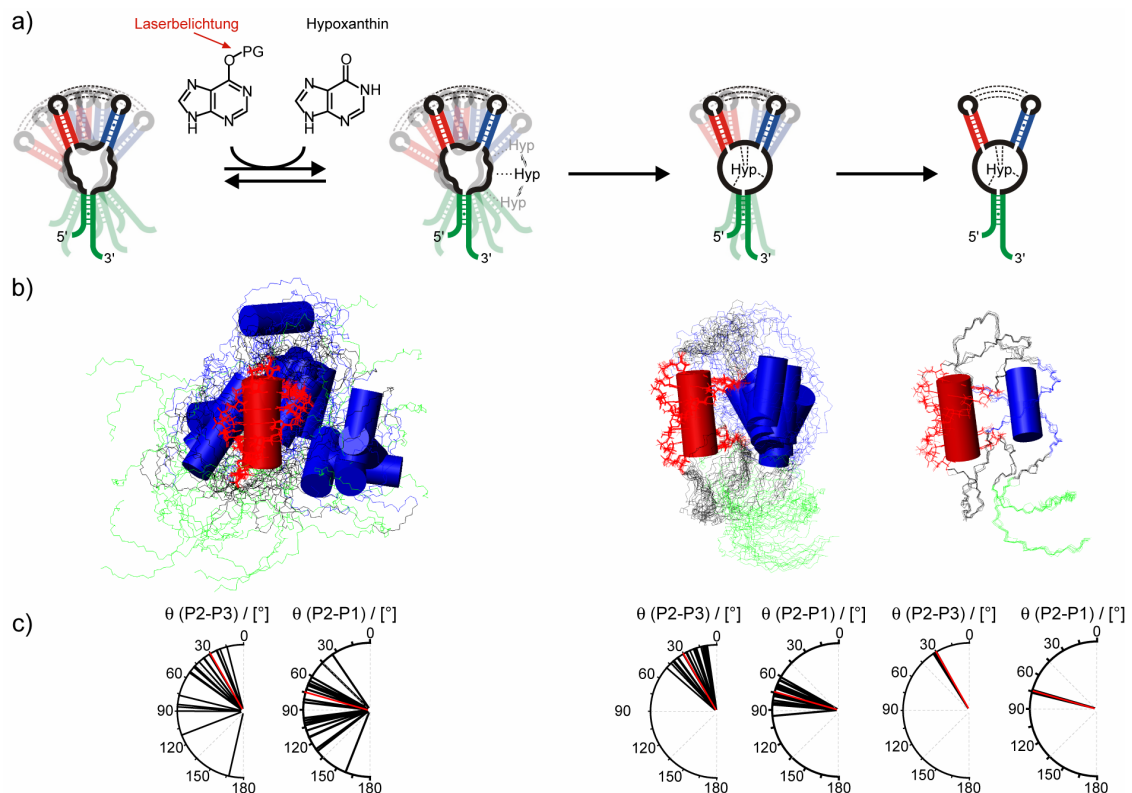
## Übersetzung der kinetischen Daten in ein strukturelles Modell des RNA-Faltungsprozesses

In statischen NMR-spektroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Helices P1, P2 und P3 bereits in der freien Konformation von Gsw<sup>apt</sup> ausgebildet sind (37). Zusätzlich dazu konnten Signale des in den Kristallstrukturen der RNA-Ligand Komplexe (39, 40) identifizierten Strukturelementes, der interhelikalen Schlaufeninteraktion, bereits in den NMR-Spektren der RNA in Abwesenheit des Liganden beobachtet werden. In Folge der Ligandbindung wurden allerdings für die Signale der interhelikalen Schlaufeninteraktion chemische Verschiebungsänderungen beobachtet, die auf konformationelle Unterschiede dieses Tertiärstrukturelementes in den verschiedenen Zuständen hinweisen (42). Im Gegensatz dazu waren für die Nukleotide der Ligand-Bindungsregion die entsprechenden Iminoprotonen nur im RNA-Ligand Komplex detektierbar (37).

Die Ergebnisse der kinetischen NMR-spektroskopischen Untersuchungen schlagen einen dreistufigen Prozess für den Ligand-Bindungsprozess der Gsw<sup>apt</sup>-RNA vor. Dabei geht ein schneller, schwach affiner Bindungsprozess der spezifischen Bindung des Liganden und der Ausbildung der Ligand-Bindungstasche der RNA voraus, gefolgt von einem langsameren Prozess, welcher Nukleotide der Helices P2 und P3 und der Schlaufenregionen L2 und L3 beinhaltet. Um anhand der kinetischen Ergebnisse strukturelle Informationen des Bindungsprozesses zu erhalten, wurden die experimentell erhaltenen NMR-Daten als Einschränkungen in Molekuldynamik- (MD) Simulationen eingesetzt. Basierend auf den statischen und kinetischen NMR-Ergebnissen wurden MD-Simulationen von drei Strukturensambles der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne durchgeführt (Abbildung 3.5).

Unter der Annahme, dass die Detektierbarkeit eines Iminoprotonensignals die Ausbildung einer beständigen Wasserstoffbrücke darstellt, wurde von einer unstrukturierten RNA ausgegangen und die native Wasserstoffbrückenbindung der jeweiligen Nukleotide als Einschränkung in der MD-Simulation eingefügt, sofern das entsprechende Iminoprotonensignal für den jeweiligen Zustand NMR-spektroskopisch detektiert werden konnte. Die Einschränkungen, die für das Strukturensamble der freien RNA eingefügt wurden, beinhalten neben den helikalen Strukturelementen alle Nukleotide, die in die interhelikale Tertiärwechselwirkung involviert sind. Für das zweite Strukturensamble wurden zusätzliche native Distanzen als Einschränkungen von denjenigen Nukleotiden integriert, die in den zeitaufgelösten NMR-Experimenten eine schnellere Kinetik zeigten (Nukleotide U22, U47, U49, U51 und alle Nukleotide, die in der Kristallstruktur in direkter Umgebung des Liganden zu beobachten sind). Um das dritte Strukturensamble zu erhalten, wurde die Einschränkung aller Nukleotide analog ihrer

Konformation in der nativen Struktur und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der NMR-Experimente vorgenommen. Dies diente gleichzeitig als Kontrolle der durchgeführten MD-Simulationen und resultierte erwartungsgemäß in einem Strukturensemble, welches die native Struktur des RNA-Ligand Komplexes (39) darstellt.



**Abbildung 3.5:** Strukturelle Interpretation der Ligand-induzierten Faltung von  $Gsw^{apt}$ ; **a)** Schematische Darstellung des vorgeschlagenen Faltungsmodells der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne als Folge der Ligandbindung. Der erste Schritt repräsentiert dabei die nicht-spezifische, schwach affine Bindung, der zweite den Ligand-Bindungsprozess und der dritte die konformationelle Einschränkung der Tertiärstruktur; **b)** Strukturensemble der verschiedenen Zustände, deren Simulation auf den jeweils ermittelten NMR-Daten basiert. Die Strukturenssembles sind jeweils durch Fixierung der Helix P2 (rot) angeordnet. Die Nukleotide der Helices P3 (blau) und P1 (grün) sind jeweils farblich gekennzeichnet; *links:* Ligand-freier Zustand der  $Gsw^{apt}$ -RNA, für welche die Parameter der interhelikalen Schlaufeninteraktion und der drei Helices eingeschränkt wurden, *mitte:* RNA-Konformation, für welche die Faltung der Ligand-Bindungsregion bereits der nativen Struktur entspricht, *rechts:* native Struktur; **c)** Verteilung des Helix-Helix-Projektionswinkels  $[\circ]$  zwischen den Helices P2 und P3 ( $\theta$  (P2-P3)) und zwischen den Helices P2 und P1 ( $\theta$  (P2-P1)). Die in der Kristallstruktur (39) beobachteten interhelikalen Winkel sind dabei in rot dargestellt, während diejenigen des jeweilig simulierten Strukturensamples (Abbildung 3.5, b) in schwarz dargestellt sind.

Die Analyse der verschiedenen Stukturensembles ergab unterschiedliche Fluktuationen des interhelikalen Projektionswinkels ( $\theta$  (P2-P3)) um den aus der Kristallstruktur erhaltenen Wert von  $30.1^\circ$ . Für das Strukturensemble des freien Zustandes der RNA konnten Winkel zwischen  $15^\circ$  und  $166^\circ$  beobachtet werden. Die Ligandbindung im zweiten Strukturensemble führte bereits zu einer geringeren Fluktuation der relativen Orientierung der Helices mit Projektionswinkeln zwischen  $10^\circ$  und  $50^\circ$ . Die MD-Simulation des finalen RNA-Ligand Komplexes zeigte sehr geringe Fluktuationen des interhelikalen Projektionswinkels und entsprach damit Konformationen, welche nahezu die RNA-Kristallstruktur (39) widerspiegeln. Die experimentell basierten MD-Simulationen zeigen ein Modell, in dem die relative Orientierung der Helices (P2 und P3) während der Ligand-induzierten Faltung in einem zweistufigen Prozess strukturell definiert wird. Die interhelikale Schlaufeninteraktion im freien Zustand der RNA ist demzufolge nicht ausreichend für die Stabilisierung einer vollständig beständig orientierten Konformation. Der freie Zustand von  $Gsw^{apt}$  konnte durch ein Strukturensemble mit fluktuierender relativer Orientierung der Helices zueinander und daher einer breiten konformationellen Verteilung beschrieben werden. Obwohl die interhelikale Schlaufeninteraktion bereits im freien Zustand ausgebildet war, reichte diese Wechselwirkung nicht aus, um die Position der Helices in einer definierten Orientierung zu fixieren. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Nukleotide der Schlaufenregionen, die nicht direkt an der interhelikalen Wechselwirkung beteiligt sind, diese konformationelle Flexibilität zulassen. Eine konformationelle Flexibilität wurde auch durch die Linienverbreiterungen der NMR-Signale der freien RNA-Konformation im Vergleich zu denjenigen des RNA-Ligand Komplexes reflektiert.

## DISKUSSION

Die Initiierung des Ligand-Bindungsprozesses der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne konnte über die Licht-induzierte Freisetzung des photogeschützten Liganden Hypoxanthin erreicht werden. Dieser Ansatz ermöglichte eine Untersuchung des entsprechenden Faltungsprozesses selbst unter Vermeidung von strukturellen Modifikationen der RNA oder der Zugabe zusätzlicher, beispielsweise in *trans*-agierender Komponenten. Die Reproduzierbarkeit der Freisetzung ermöglichte die Aufnahme von mehreren Kinetiken unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen und erlaubte so die Addition der resultierenden Spektren zur Verbesserung der spektralen Sensitivität.

Die Verbesserung der spektralen Auflösung zur Analyse des zeitlichen Verlaufs individueller Signale und damit die Nukleotid-spezifische Interpretation der Kinetiken konnte durch die Anwendung von selektiver Isotopenmarkierung der RNA in Kombination mit entsprechenden NMR-Filtermethoden erreicht werden. Somit konnten trotz der Größe des RNA-Konstruktes (73nt) 30 der 35 Iminoprotonensignale des RNA-Ligand Komplexes in den entsprechend separierten selektiv editierten 1D NMR-Spektren aufgelöst werden. Aufgrund des *Signal-zu-Rausch* Verhältnisses der Kinetiken und der Tatsache, dass einige Signale infolge des Ligand-Bindungsprozesses unbeeinflusst bleiben, konnte der kinetische Verlauf von 11 Iminoprotonenresonanzen analysiert werden. Die in dieser Arbeit durchgeführte Nukleotid-spezifische zeitaufgelöste NMR-Methode ermöglichte damit die differenzierte Beschreibung der RNA-Faltung und der damit verbundenen strukturellen Aspekte. Die NMR-Daten des finalen Ligand-gebundenen Zustandes der RNA in den Kinetiken sind dabei in Übereinstimmung mit strukturellen Daten des RNA-Ligand Komplexes (39).

Die erhaltene Zeitskala des Ligand-Bindungsprozesses der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne entsprach der Größenordnung der in Fluoreszenzstudien beobachteten Raten für die Adenin-vermittelten Riboswitch-RNAs in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  (31, 32). Im Gegensatz zu der Guanin-abhängigen Riboswitch Aptamerdomäne wurde für die Adenin-abhängigen Riboswitch Aptamerdomänen konformationelle Heterogenität im Ligand-freien Zustand detektiert. Die Zugabe von  $Mg^{2+}$  führte hier zu der Detektion der RNA-Strukturierung in Fluoreszenzuntersuchungen der translationalen Adenin Riboswitch-RNA (31) oder der Stabilisierung des Tertiärstrukturelementes in NMR-Untersuchungen der transkriptionalen Adenin Riboswitch Aptamerdomäne (44). Diese strukturellen Unterschiede der Ligand-freien RNA-Konformationen lassen vermuten, dass die detaillierten Faltungsprozesse der Purin-vermittelten Riboswitch-RNAs infolge der Ligandbindung und deren  $Mg^{2+}$ -Abhängigkeit sich möglicherweise unterscheiden.

Zusätzlich zu der spezifischen Bindung des Liganden konnte ein nicht-spezifischer Ligand-Bindungsprozess an die Riboswitch-RNA identifiziert werden. Hierbei fungierte die Aptamerdomäne der Adenin Riboswitch-RNA als Modell-Konstrukt, an welches Hypoxanthin schwach affin bindet. Die chemischen Verschiebungen der Ligand NMR-Resonanzen in Gegenwart der  $Asw^{apt}$ -RNA zeigten dabei im Vergleich zu freiem Hypoxanthin keine Veränderungen. Zusätzlich dazu entsprach das Iminoprotonen NMR-Spektrum von  $Asw^{apt}$  in Gegenwart von Hypoxanthin demjenigen der RNA im Ligand-freien Zustand. Diese NMR-Daten unterstützen somit die beobachtete geringe Affinität der  $Asw^{apt}$ -RNA für den Liganden Hypoxanthin (36). Stattdessen wurden aber Linienverbreiterungen der Ligand NMR-

Resonanzen beobachtet, was auf ein Modell hindeutet, in welchem Hypoxanthin schwach affin mit der RNA interagiert. Zusätzliche Kontrollexperimente mit einem RNA-Konstrukt, bei welchem die für die spezifische Liganderkennung verantwortlichen Nukleotide fehlten, bestätigten die Annahme einer schwachen und transienten Wechselwirkung des Liganden mit Nukleotiden der Ligand-Bindungsregion der freien Purin Riboswitch Aptamerdomänen. Eine spezifische Ligandbindung und die darauf folgende strukturelle Konformationsänderung konnte allerdings ausschließlich im Falle des jeweils entsprechend spezifischen Liganden beobachtet werden.

Hinsichtlich RNA-Faltung konnte im Rahmen dieser Arbeit eine generell anwendbare Methode vorgestellt werden, um kinetische Informationen in eine strukturell aufgeschlüsselte Beschreibung des Faltungsprozesses zu übersetzen. Die Detektierbarkeit eines Iminoprotonensignals im NMR-Spektrum reflektiert ein Nukleotid, dessen Iminoproton austauschgeschützt ist. Demzufolge kann angenommen werden, dass dieses Nukleotid in die entsprechende native Wasserstoffbrückenbindung involviert ist. Der Bildung eines ersten, schwach affinen und kurzlebigen Komplexes folgt die spezifische Bindung des Liganden an die Gsw<sup>apt</sup>-RNA in einem zweistufigen Prozess. In einem schnelleren Prozess wird die Ligand-Bindungstasche ausgebildet, was zu einer lokalen Stabilisierung der Drei-Wege-Kreuzung führt und basierend auf den MD-Simulationen des Weiteren eine Fixierung der interhelikalen Wechselwirkungen zur Folge hat. Das daraus hervorgehende Modell ist konsistent mit einem kinetischen Faltungsmodell, für welches die Ausbildung der Ligand-Bindungstasche vermutlich enthalpisch basiert ist und daraufhin den finalen Faltungsschritt, die Stabilisierung der Helix-Helix-Orientierung, ermöglicht.

## LITERATUR

1. Williamson, J.R. (2000) Induced fit in RNA-protein recognition. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 834-7.
2. Draper, D.E., Grilley, D., Soto, A.M. (2005) Ions and RNA folding. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **34**, 221-43.
3. Miranda-Rios, J., Navarro, M., Soberon, M. (2001) A conserved RNA structure (thi box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9736-41.



4. Winkler, W., Nahvi, A., Breaker, R.R. (2002) Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature*, **419**, 952-6.
5. Winkler, W.C., Breaker, R.R. (2003) Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *ChemBiochem*, **4**, 1024-32.
6. Snoussi, K., Nonin-Lecomte, S., Leroy, J.L. (2001) The RNA i-motif. *J. Mol. Biol.*, **309**, 139-53.
7. Narberhaus, F., Waldminghaus, T., Chowdhury, S. (2006) RNA thermometers. *FEMS Microbiol. Rev.*, **30**, 3-16.
8. Helm, M. (2006) Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 721-33.
9. Al-Hashimi, H.M. (2005) Dynamics-based amplification of RNA function and its characterization by using NMR spectroscopy. *ChemBiochem*, **6**, 1506-19.
10. Gueron, M., Leroy, J.L. (1995) Studies of base pair kinetics by NMR measurement of proton exchange. *Methods Enzymol.*, **261**, 383-413.
11. Varani, G., Aboul-ela, F., Allain, F.H.T. (1996) NMR investigation of RNA structure. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spec.*, **29**, 51-127.
12. Wijmenga, S.S., van Buuren, B.N.M. (1998) The use of NMR methods for conformational studies of nucleic acids. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spec.*, **32**, 287-387.
13. Fürtig, B., Buck, J., Manoharan, V., Bermel, W., Jaschke, A., Wenter, P., Pitsch, S., Schwalbe, H. (2007) Time-resolved NMR studies of RNA folding. *Biopolymers*, **86**, 360-83.
14. Mayer, G., Heckel, A. (2006) Biologically active molecules with a 'light switch'. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **45**, 4900-21.
15. Kühn, T., Schwalbe, H. (2000) Monitoring the kinetics of ion-dependent protein folding by time-resolved NMR spectroscopy at atomic resolution. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 6169-74.
16. Wenter, P., Fürtig, B., Hainard, A., Schwalbe, H., Pitsch, S. (2005) Kinetics of photoinduced RNA refolding by real-time NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **44**, 2600-3.
17. Wenter, P., Fürtig, B., Hainard, A., Schwalbe, H., Pitsch, S. (2006) A caged uridine for the selective preparation of an RNA fold and determination of its refolding kinetics by real-time NMR. *ChemBiochem*, **7**, 417-20.
18. Mok, K.H., Kuhn, L.T., Goetz, M., Day, I.J., Lin, J.C., Andersen, N.H., Hore, P.J. (2007) A pre-existing hydrophobic collapse in the unfolded state of an ultrafast folding protein. *Nature*, **447**, 106-9.
19. Mok, K.H., Nagashima, T., Day, I.J., Jones, J.A., Jones, C.J., Dobson, C.M., Hore, P.J. (2003) Rapid sample-mixing technique for transient NMR and photo-CIDNP spectroscopy: applications to real-time protein folding. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 12484-92.

20. Flinders, J., Dieckmann, T. (2006) NMR spectroscopy of ribonucleic acids. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spec.*, **48**, 137-59.
21. Fürtig, B., Richter, C., Wöhnert, J., Schwalbe, H. (2003) NMR spectroscopy of RNA. *Chembiochem*, **4**, 936-62.
22. Mandal, M., Breaker, R.R. (2004) Gene regulation by riboswitches. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 451-63.
23. Edwards, T.E., Klein, D.J., Ferre-D'Amaré, A.R. (2007) Riboswitches: small-molecule recognition by gene regulatory RNAs. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **17**, 273-9.
24. Schwalbe, H., Buck, J., Fürtig, B., Noeske, J., Wöhnert, J. (2007) Structures of RNA switches: insight into molecular recognition and tertiary structure. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **46**, 1212-9.
25. Serganov, A. (2009) The long and the short of riboswitches. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **19**, 251-9.
26. Wickiser, J.K., Winkler, W.C., Breaker, R.R., Crothers, D.M. (2005) The speed of RNA transcription and metabolite binding kinetics operate an FMN riboswitch. *Mol. Cell*, **18**, 49-60.
27. Lang, K., Rieder, R., Micura, R. (2007) Ligand-induced folding of the thiM TPP riboswitch investigated by a structure-based fluorescence spectroscopic approach. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 5370-8.
28. Smith, K.D., Lipchock, S.V., Ames, T.D., Wang, J., Breaker, R.R., Strobel, S.A. (2009) Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 1218-23.
29. Gilbert, S.D., Stoddard, C.D., Wise, S.J., Batey, R.T. (2006) Thermodynamic and kinetic characterization of ligand binding to the purine riboswitch aptamer domain. *J. Mol. Biol.*, **359**, 754-68.
30. Greenleaf, W.J., Frieda, K.L., Foster, D.A., Woodside, M.T., Block, S.M. (2008) Direct observation of hierarchical folding in single riboswitch aptamers. *Science*, **319**, 630-3.
31. Rieder, R., Lang, K., Graber, D., Micura, R. (2007) Ligand-induced folding of the adenosine deaminase A-riboswitch and implications on riboswitch translational control. *Chembiochem*, **8**, 896-902.
32. Wickiser, J.K., Cheah, M.T., Breaker, R.R., Crothers, D.M. (2005) The kinetics of ligand binding by an adenine-sensing riboswitch. *Biochemistry*, **44**, 13404-14.
33. Mandal, M., Boese, B., Barrick, J.E., Winkler, W.C., Breaker, R.R. (2003) Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell*, **113**, 577-86.
34. Noeske, J., Richter, C., Grundl, M.A., Nasiri, H.R., Schwalbe, H., Wöhnert, J. (2005) An intermolecular base triple as the basis of ligand specificity and affinity in the guanine- and adenine-sensing riboswitch RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 1372-7.

35. Noeske, J. (2007) Strukturelle Untersuchungen an Metabolit-bindenden Riboswitch-RNAs mittels NMR. Dissertation, J.W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
36. Mandal, M., Breaker, R.R. (2004) Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 29-35.
37. Noeske, J., Buck, J., Fürtig, B., Nasiri, H.R., Schwalbe, H., Wöhnert, J. (2007) Interplay of 'induced fit' and preorganization in the ligand induced folding of the aptamer domain of the guanine binding riboswitch. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 572-83.
38. Zucker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3406-15.
39. Batey, R.T., Gilbert, S.D., Montange, R.K. (2004) Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine. *Nature*, **432**, 411-5.
40. Serganov, A., Yuan, Y.R., Pikovskaya, O., Polonskaia, A., Malinina, L., Phan, A.T., Hobartner, C., Micura, R., Breaker, R.R., Patel, D.J. (2004) Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs. *Chem. Biol.*, **11**, 1729-41.
41. Buck, J. (2005) Chemische, biochemische und NMR-spektroskopische Untersuchungen der Kinetik der ligandinduzierten Umfaltung von Riboswitch-RNA. Diplomarbeit, J.W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
42. Buck, J., Fürtig, B., Noeske, J., Wöhnert, J., Schwalbe, H. (2007) Time-resolved NMR methods resolving ligand-induced RNA folding at atomic resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 15699-704.
43. Fürtig, B. (2007) NMR-Study of Dynamic Structural Transitions in RNA-Molecules. Dissertation, J.W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
44. Noeske, J., Schwalbe, H., Wöhnert, J. (2007) Metal-ion binding and metal-ion induced folding of the adenine-sensing riboswitch aptamer domain. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 5262-73.



# KAPITEL 4

EINFLUSS VON  $Mg^{2+}$  AUF STRUKTUR,  
LIGANDBINDUNG UND FUNKTIONALE STABILITÄT  
VON GUANIN RIBOSWITCH-RNAS  
( $GSW^{APT}$  UND  $GSW^{LOOP}$ )

## EINLEITUNG

Eine Vielzahl von Sekundär- und Tertiärstrukturmotiven ermöglicht die Ausbildung von RNA-Strukturen mit komplexer dreidimensionaler Architektur. Besonders Tertiärstruktur motive sind sehr vielfältig und können sowohl zur Ausbildung lokaler RNA-Struktur motive beitragen als auch sequentiell entfernt lokalisierte Nukleotide verbinden und somit globale RNA-Konformationen bestimmen. Die dreidimensionalen Strukturen von RNAs sind zudem oft eng mit der zellulären Funktion der RNA verknüpft. Neben der funktionalen Bedeutung möglicher aktiver Zentren selbst wurden auch Tertiärkontakte zwischen entfernt lokalisierten Strukturelementen als essentiell für biologische Funktionen von RNAs identifiziert (1). Neben den intrinsischen Eigenschaften der RNAs können auch verschiedenste Cofaktoren wie beispielsweise Proteine, Liganden oder Ionen die Ausbildung von RNA-Strukturen vermitteln und somit zelluläre Funktionen induzieren bzw. modulieren.  $Mg^{2+}$ -Ionen spielen hierbei eine besonders wichtige Rolle, da sie bevorzugt zu der Ausbildung und funktionellen Stabilisierung kompakter RNA-Strukturen beitragen (2).

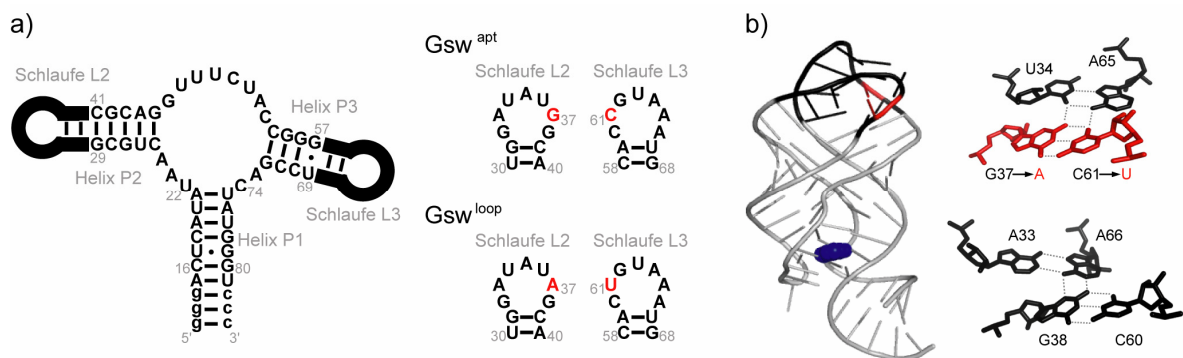
Die zelluläre Funktion einer RNA kann auch durch eine konformationelle Umstrukturierung verschiedener Sekundär- oder Tertiärstrukturelemente hervorgerufen werden. Die Stabilisierung alternativer RNA-Konformationen und -Strukturelemente als Folge einer spezifischen Ligandbindung wird etwa als die strukturelle Basis für die durch Riboswitch-RNA Elemente vermittelte Regulation der Genexpression angenommen (3). Basierend auf diesem Modell wird angenommen, dass die spezifische Ligandbindung eine allosterische Umstrukturierung der RNA induziert. In Abhängigkeit der Ligandkonzentration wird eine alternative Konformation der Ligand-Bindungsdomäne (Aptamerdomäne) stabilisiert, welche in Folge die Ausbildung oder Destabilisierung eines 3'-nachgelagerten Strukturelementes beeinflusst (3). Verschiedenste, jeweils spezifische niedermolekulare Liganden dieser regulatorischen RNA-Elemente, die sich von Nukleobasen bis Aminosäuren erstrecken, konnten bereits identifiziert werden (4). Die hohe Affinität und Spezifität der Aptamerdomänen für den jeweils entsprechend spezifisch erkannten Liganden ist mit der Ausbildung komplexer inter- und intramolekularer Tertiärstrukturen gekoppelt (siehe Kapitel 1).

Es wurden zahlreiche sehr unterschiedliche Strategien der Liganderkennung und der konformationellen Anpassung nachgewiesen, die sich die unterschiedlichen Riboswitch-RNA Elemente zu Nutze machen, um ihre jeweilige Funktion zu erzielen. Die RNA-Ligand Komplexbildung kann beispielsweise zusätzlich essentiell von der Gegenwart von Kationen

abhängen, wie beispielsweise für FMN- (5) oder TPP-abhängige (6, 7) Riboswitch-RNA Elemente beobachtet. Eine Mutation in der Ligand-Bindungsregion der Guanin-abhängigen Riboswitch Aptamerdomäne (C74U) konvertiert die Spezifität der RNA und ermöglicht nun die Bindung des eigentlich nicht spezifisch erkannten Purinliganden Adenin, wohingegen die Affinität für den eigentlich spezifisch erkannten Liganden Guanin stark abnimmt (8). Im Falle des Metaboliten S-Adenosylmethionin (SAM) wurden bisher allein fünf strukturell verschiedene Klassen von Riboswitch-Elementen mit unterschiedlichen Strategien der Liganderkennung identifiziert (9-15). Neben den Nukleotiden der Ligand-Bindungsregion wurden für zahlreiche Riboswitch-RNAs weitere Nukleotide entfernt lokalisierter Strukturelemente als essentiell für die Ligandbindung und regulatorische Funktion identifiziert (16). Diese Nukleotide sind in diverse weitreichende Tertiärinteraktionen involviert und ermöglichen damit die Ausbildung kompakter RNA-Strukturen (17) (siehe Kapitel 1). Für einige Riboswitch-RNAs konnte die strukturelle Ausbildung dieser weitreichenden Tertiärinteraktionen bereits im Ligand-freien Zustand beobachtet werden. Das Ausmaß der Strukturierung von Sekundär- und Tertiärinteraktionen im Ligand-freien Zustand und deren  $Mg^{2+}$ -Abhängigkeit variiert allerdings stark in den verschiedenen Riboswitch-Elementen und hat zudem unterschiedlichste Auswirkungen auf die Funktionen der Riboswitch-RNAs (18-20).

Innerhalb der Klasse der Purin-abhängigen Riboswitch-RNAs, welcher die Guanin- und die Adenin-abhängige Riboswitch-RNA Elemente angehören, sind die Zusammenhänge von Struktur und Funktion besonders vielseitig. Die Sekundärstrukturen der beiden Aptamerdomänen (3, 21) und die Faltungscharakteristika der RNA-Ligand Komplexe (22, 23) sind sehr ähnlich. Die Sekundärstrukturen weisen jeweils drei helikale Elemente (P1, P2 und P3) auf, die um eine Drei-Wege-Kreuzung angeordnet sind (21, 24) (Abbildung 4.1). Helices P2 und P3 schließen jeweils mit einer apikalen Schlaufe ab (L2 und L3). Basierend auf den Modellen der den Purin-abhängigen Riboswitch-RNAs zu Grunde liegenden Genregulation ist die dritte Helix P1 im Kontext der vollständigen Riboswitch-RNA-Sequenz an der entsprechenden Konformationsänderung beteiligt und somit in jeweils alternative Strukturelemente involviert (21, 24, 25). Die dreidimensionalen Architekturen der Aptamerdomänen sind in der Ligand-gebundenen Konformation durch jeweils zwei Bereiche komplexer Tertiärinteraktionen charakterisiert. Zum einen wurden die Nukleotide der zentralen Drei-Wege-Kreuzung als die Hauptfaktoren der Liganderkennung, Spezifität und Ausbildung der Ligand-Bindungstasche identifiziert (22, 23). Anhand verschiedener Untersuchungen konnten essentielle Beiträge individueller Nukleotide für die grundlegende Fähigkeit und die Effizienz der Ligandbindung der Purin-abhängigen Riboswitch-RNA Elemente identifiziert werden (8, 21, 24, 26).

Zum anderen sind die meisten Nukleotide der apikalen Schlaufenregionen (L2 und L3) hoch konserviert (24). Die Kristallstrukturen der RNA-Ligand Komplexe der Aptamerdomänen der Adenin- und der Guanin-vermittelten Riboswitch-RNAs (22, 23) bestätigen die Signifikanz dieser Schlaufenregionen für die Organisation der globalen RNA-Architektur. Interhelikale Wechselwirkungen verbinden die beiden apikalen Schlaufenregionen in einer Schlaufen-Schlaufen-Interaktion (nachfolgend als interhelikale Schlaufeninteraktion bezeichnet) miteinander und führen so zu einer kompakten, parallelen Anordnung der Helices P2 und P3. Dieses Strukturmotiv, die interhelikale Schlaufeninteraktion, wird wesentlich durch die Ausbildung zweier interhelikaler Basenquadrupel bestimmt, welche durch zwei interhelikale Watson-Crick GC-Basenpaarungsinteraktionen (G37-C61 und G38-C60), eine interhelikale AU-Basenpaarungsinteraktion (U34-A65) und eine interhelikale AA-Basenpaarungsinteraktion (A33-A66) aufgebaut sind (Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1:** a) Sekundärstrukturen der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne (Gsw<sup>apt</sup>) des *B. subtilis* *xpt-pbuX* Operons (24) und der G37A/C61U-Mutante (Gsw<sup>loop</sup>). Die sich in den beiden RNA-Konstrukten unterscheidenden Nukleotide in den Schlaufenregionen sind in rot hervorgehoben; b) Kristallstruktur der Hypoxanthin-gebundenen Aptamerdomäne der Guanin Riboswitch-RNA (pdb: 1U8D) (22); die Schlaufenregionen sind in schwarz, die in Gsw<sup>loop</sup> mutierten Nukleotide an den Sequenzpositionen 37 und 61 sind in rot hervorgehoben; der Ligand Hypoxanthin ist blau gekennzeichnet. Die beiden Basenquadrupel der interhelikalen Schlaufeninteraktion sind zusätzlich detailliert dargestellt.

Trotz der hier aufgeführten Ähnlichkeiten zeigen die Purin-abhängigen Riboswitch-RNA Elemente diese hohe Spezifität und Affinität ausschließlich für den jeweils spezifisch erkannten Purinliganden. Des Weiteren liegen ihrer regulatorischen Funktion jeweils sehr unterschiedliche Mechanismen zu Grunde (3, 21). Während die Ligandbindung in der *xpt-pbuX* Guanin-



abhängigen Riboswitch-RNA einen Transkriptionsabbruch induziert, führt diese in den bisher bekannten Adenin-vermittelten Riboswitch-RNAs zu einer Aktivierung der Genexpression. Für die Adenin-vermittelte Regulation wurden wiederum bereits Riboswitch-RNA Elemente identifiziert, die sowohl auf der Ebene der Transkription (*pbuE*) als auch der Translation (*add*) regulatorisch eingreifen.

Zusätzlich dazu unterscheiden sich auch die strukturellen Eigenschaften der Ligand-freien Konformationen der Purin-abhängigen Riboswitch Aptamerdomänen und deren  $Mg^{2+}$ -induzierte Strukturausbildung (25-28). NMR-Experimente (28) und biochemische Untersuchungen (26) zeigen konformationelle Heterogenität im Falle der Adenin-vermittelten Aptamerdomäne im Ligand-freien Zustand. Die Zugabe von  $Mg^{2+}$  oder stabilisierende Sequenzvariationen in Helix P2 führen dann zu einer homogen gefalteten RNA mit einer stabilisierten interhelikalen Schlaufeninteraktion (28). Die Ergebnisse dieser NMR-Untersuchungen stehen in Einklang mit Fluoreszenzstudien, die eine strukturelle Organisation der interhelikalen Schlaufeninteraktion als Folge der  $Mg^{2+}$ -Zugabe ermittelten (25, 26). Im Gegensatz dazu ergeben NMR-Untersuchungen der Guanin-abhängigen Riboswitch Aptamerdomäne bereits im Ligand-freien Zustand (bei einer Temperatur von 10°C) eine strukturelle Organisation der interhelikalen Schlaufeninteraktion, die  $Mg^{2+}$ -unabhängig ist (27).

Trotz der Unterschiede im Ausmaß der strukturellen Organisation des interhelikalen Tertiärstrukturelementes im Ligand-freien Zustand, das für die Adenin-vermittelte Riboswitch-RNA unter diesen Bedingungen nur partiell strukturiert vorliegt (28), kann eine Ligandbindung für beide Purin-vermittelten Riboswitch-RNAs in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  beobachtet werden. Zusammengefasst unterscheiden sich trotz der stark ausgeprägten strukturellen Ähnlichkeit der finalen RNA-Ligand Komplexe sowohl die Eigenschaften des konformationellen RNA-Ensembles im Ligand-freien Zustand als auch deren  $Mg^{2+}$ -Abhängigkeit für die Guanin- und die Adenin-abhängige Riboswitch-RNA. Die Vielfältigkeit der Struktur-Funktions-Beziehungen der Purin-abhängigen Riboswitch-RNA-Elemente unterstreicht damit die Signifikanz einer detaillierten Charakterisierung der Ligand-freien Konformationen der RNA-Elemente, deren  $Mg^{2+}$ - und temperaturabhängigen Stabilitäten in Lösung und des Zusammenhanges ihrer strukturellen Eigenschaften mit den Ligand-Bindungscharakteristika für ein umfassendes Verständnis der Funktion der Riboswitch-RNA-Elemente.



Um diese Fragestellungen zu behandeln, wurden NMR-spektroskopische und biophysikalische Untersuchungen an der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne ( $Gsw^{apb}$ ) des *xpt-pbuX* Operons aus *B. subtilis* und einer G37A/C61U-Mutante dieser RNA ( $Gsw^{loop}$ ) durchgeführt und der Einfluss von RNA- $Mg^{2+}$ -Interaktionen auf die RNA-Faltung, die Fähigkeit der Ligandbindung

und der funktionalen Stabilität analysiert. Die Anwendung von NMR-spektroskopischen Methoden in Lösung ermöglichte hierbei die Untersuchung der konformationellen Veränderungen und der Ausbildung von RNA-Ligand Komplexen mit Nukleotid-spezifischer Auflösung unter verschiedensten Bedingungen wie beispielsweise Ionen-Konzentrationen oder Temperaturen. Die in den Schlaufenregionen der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne eingeführten Mutationen (G37A/C61U) wurden so gewählt, dass die Möglichkeit der Basenpaarungsinteraktionen der Nukleotide in L2 und L3 erhalten bleibt und somit die Ausbildung potentieller interhelikaler Tertiärinteraktionen ermöglicht (29). Die Ausbildung des interhelikalen Tertiärstrukturelementes ist allerdings im Gegensatz zu der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne  $Gsw^{apt}$  formal durch den Verlust von zwei Wasserstoffbrückenbindungen destabilisiert. Erste NMR-spektroskopische Untersuchungen der G37A/C61U-Mutante  $Gsw^{loop}$  zeigten, dass die Strukturausbildung und die Ligand-Bindungscharakteristika wesentlich von den Eigenschaften der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne  $Gsw^{apt}$  abweichen (27). Während  $Mg^{2+}$ -Ionen für die  $Gsw^{apt}$ -RNA bei tieferen Temperaturen keine essentielle Rolle für die Ligandbindung zukommt, sind diese im Falle der  $Gsw^{loop}$ -RNA für eine mögliche Ligandbindung essentiell ausschlaggebend.

## MATERIAL UND METHODEN

### RNA-Konstrukte

Das in diesem Kapitel analysierte RNA-Konstrukt  $Gsw^{apt}$  entspricht der in Kapitel 3 beschriebenen RNA-Sequenz und -Sekundärstruktur der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne (24).

RNA-Sequenz	Extinktionskoeffizient [ $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ]	Sekundärstrukturvorhersage nach <i>Mfold</i>
'Helix 2': 5'-CUGCGUGGAUAUAGGCACGCAG-3'	203 700	
'Helix 3': 5'-CGGGCACUGUAAAUGUCCG-3'	184 100	

**Tabelle 4.1:** Modell-RNA-Konstrukte 'Helix 2' und 'Helix 3'.

In diesem Kapitel wurde zusätzlich eine G37A/C61U-Mutante dieser Riboswitch-RNA ( $Gsw^{loop}$ ) untersucht. Die *in vitro* Synthese und anschließende Aufreinigung der Riboswitch-RNA-Konstrukte erfolgte wie in Kapitel 2 beschrieben. Die Modell-RNA-Konstrukte 'Helix 2' und 'Helix 3' wurden von Dharmacon (Boulder) bezogen und aufgereinigt wie in Kapitel 2 beschrieben. Die Sekundärstrukturen dieser RNA-Sequenzen wurden mit dem Programm *Mfold* (30) analysiert (Tabelle 4.1).

### Charakterisierung von Kationen-induzierten strukturellen Effekten mittels NMR-spektroskopischer Methoden

Die Analyse der durch die Assoziation der Kationen,  $Mg^{2+}$  oder  $[Co(NH_3)_6]^{3+}$ , induzierten strukturellen Effekte erfolgte wie in Kapitel 2 beschrieben. Die chemischen Verschiebungsänderungen der Iminoprotonen der  $Gsw^{loop}$ -RNA als Folge der  $Mg^{2+}$ -Titration wurden in  $^1H, ^{15}N$ -HSQC Spektren bei einer Temperatur von 283 K analysiert. Hierfür wurde das  $[RNA]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnis in der NMR-Probe, ausgehend von einer RNA-Konzentration von  $\sim 0.15$  mM, durch die Zugabe einer  $MgCl_2$ -Lösung schrittweise erhöht. Die  $Mg^{2+}$ -Konzentration wurde in einem Bereich von 0-33 Äquivalenten (eq) (entsprechend absoluten  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen von  $\sim 0-5$  mM) relativ zu der Konzentration der RNA oder des RNA-Ligand

Komplexes erhöht. Die strukturellen Effekte von  $[Co(NH_3)_6]^{3+}$  auf die Konformation von  $Gsw^{loop}$  im Ligand-freien Zustand wurden ebenfalls in  $^1H,^{15}N$ -HSQC Spektren bei einer Temperatur von 283 K verfolgt, eine Analyse erfolgte hierbei qualitativ.

### **Bestimmung von NMR-Linienbreiten**

Die NMR-Experimente zur Bestimmung der Ligand-Linienbreiten wurden entsprechend den in Kapitel 3 beschriebenen experimentellen Bedingungen durchgeführt und analysiert. Es wurden  $^1H,^{13}C$ -HSQC Spektren mit jeweils  $^{13}C,^{15}N$ -markiertem Ligand, Hypoxanthin oder Adenin, in Gegenwart von nicht-isotopenmarkierter  $Gsw^{loop}$ -RNA im Verhältnis  $\sim 1:5$  und bei einer Temperatur von 283 K in NMR-Puffer mit  $H_2O:D_2O \sim 9:1$  und DSS als Referenz aufgenommen.

## ERGEBNISSE

### **NMR-spektroskopische Charakterisierung der freien G37A/C61U-Mutante der Guanin Riboswitch-RNA Aptamerdomäne**

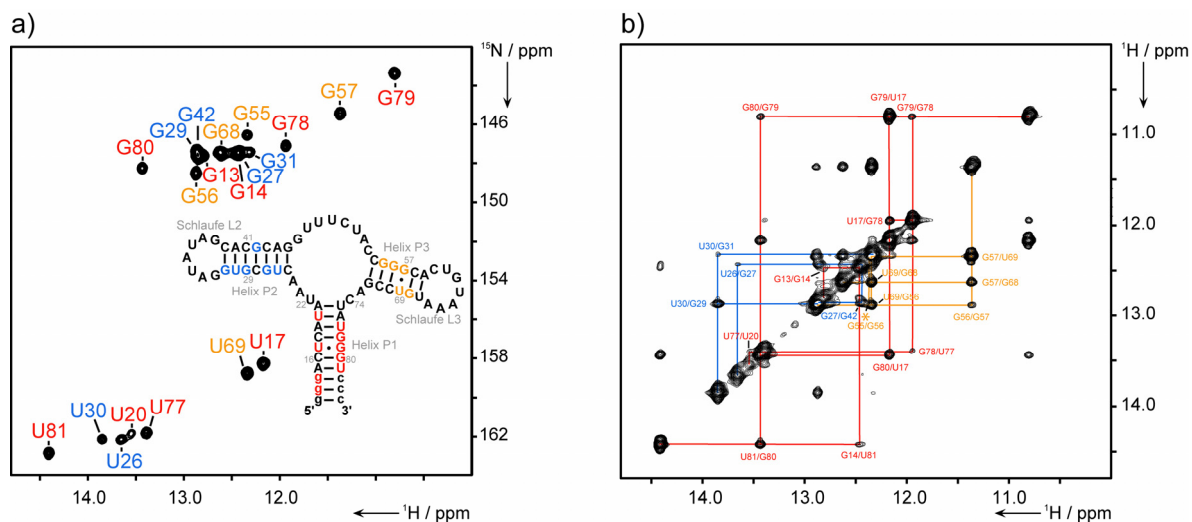
Als Grundlage der detaillierten strukturellen Untersuchung der RNA-Konformationen und deren  $Mg^{2+}$ -abhängiger Ausbildung wurde die NMR-Resonanzzuordnung für die Iminoprotonen der 73nt  $Gsw^{loop}$ -RNA durchgeführt und anschließend mit den NMR-Charakteristika der Guanin Riboswitch-RNA  $Gsw^{apt}$  (27) verglichen. Die Ausbildung der Tertiärstrukturelemente, der interhelikalen Schlaufeninteraktion und der Ligand-Bindungstasche, konnten für beide RNA-Konstrukte,  $Gsw^{apt}$  und  $Gsw^{loop}$ , anhand jeweils charakteristischer NMR-Reportersignale im Bereich der Iminoprotonenresonanzen verfolgt werden und ermöglichten so eine detaillierte strukturelle Analyse der unterschiedlichen RNA-Charakteristika.

Die Ausbildung der interhelikalen Schlaufeninteraktion konnte für beide Guanin Riboswitch-RNA-Konstrukte anhand von jeweils vier Iminoprotonenresonanzen verfolgt werden, die ausschließlich im Falle deren Ausbildung detektiert werden konnten. Für  $Gsw^{apt}$  konnten die Signale der Nukleotide U34, G38 und G37 detektiert werden, und für  $Gsw^{loop}$  sind aufgrund der Mutationen (G37A/C61U) die Signale der Nukleotide U34, G38 und U61 in Folge der Tertiärstrukturausbildung zu beobachten. Diese Iminoprotonen sind jeweils in Basenpaarungsinteraktionen zur Ausbildung der interhelikalen Basenquadrupel involviert (Abbildung 4.1). Zusätzlich dazu war ein Iminoprotonensignal des Nukleotids G32 für beide RNA-Konstrukte zu beobachten. Dieses Signal ist nicht über Wasserstoffbrückenbindungen, sondern, wie auf der Basis der Kristallstruktur des RNA-Ligand Komplexes ermittelt werden konnte (22, 23), durch Stapelwechselwirkungen austauschgeschützt und ausschließlich im Falle einer ausgebildeten interhelikalen Schlaufeninteraktion in den NMR-Spektren detektierbar.

Die Positionen des gebundenen Liganden und der RNA-Nukleotide, die an der Ausbildung der Ligand-Bindungstasche beteiligt sind, werden durch eine Vielzahl sehr unterschiedlicher Interaktionen fixiert. Als Folge davon konnten zahlreiche zusätzliche Iminoprotonensignale detektiert werden (Kapitel 3), die zu signifikanten Unterschieden in den NMR-Spektren im Vergleich zur Ligand-freien RNA führten (27).

Das  $^1H,^{15}N$ -HSQC-Spektrum der  $^{15}N$ -markierten  $Gsw^{loop}$ -RNA zeigte im freien Zustand eine homogen gefaltete RNA mit auf der NMR-Zeitskala schnellen konformationellen Dynamiken. Diese schnellen Dynamiken führten zu Linienverbreiterungen der RNA-Signale im Vergleich zu

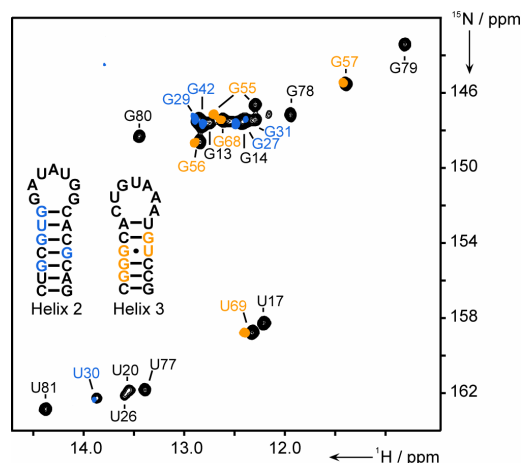
den Signalen der Ligand-gebundenen RNA-Konformationen. Weitere RNA-Signale, die für eine zweite RNA-Konformation mit langsamen Austauschprozessen sprechen würden, konnten dagegen nicht beobachtet werden.



**Abbildung 4.2:** NMR-spektroskopische Resonanzzuordnung der  $Gsw^{loop}$ -RNA ( $[RNA]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnis  $\sim 1:7$ ,  $T \sim 283$  K); **a)**  $^1H,^{15}N$ -HSQC-Spektrum und Sekundärstruktur (farblich hervorgehoben sind Nukleotide mit unter diesen Bedingungen detektierbaren Iminprotonen) und **b)**  $^1H,^1H$ -NOESY Spektrum (700 MHz, Mischzeit: 100 ms, *Stern*: dieses NOE-Kreuzsignal konnte in einem 3D- $^1H,^1H,^{15}N$ -NOESY-HSQC-Spektrum aufgelöst werden) mit jeweils farblich annotierter Iminprotonen NMR-Resonanzzuordnung.

In der freien RNA-Konformation können 20 aufgelöste Iminprotonensignale beobachtet werden (Abbildung 4.2), die aufgrund ihrer charakteristischen chemischen Verschiebungen in der  $^{15}N$ -Dimension eindeutig 7 Uridin- und 13 Guanosin-Signalen zugeordnet werden konnten. Die NMR-spektroskopische Identifizierung der Basenpaarungsmuster und der sequentiellen Konnektivitäten der Signale konnten mittels HNN-COSY (31) und 2D- und  $^{15}N$ -editierten 3D-NOESY Experimenten (32) erhalten werden (Abbildung 4.2). Die Analyse des HNN-COSY NMR-Spektrums von  $Gsw^{loop}$  zeigte, dass 5 Uridin- und 11 Guanosin-Signale jeweils in Watson-Crick-Basenpaarungsinteraktionen involviert sind. Zusätzlich dazu konnten anhand der charakteristisch hochfeld-vershobenen Signale und deren intensiven inter-catenaren Imino-Iminoprotonen NOE-Kreuzsignalen zwei GU-Basenpaarungsinteraktionen nachgewiesen werden. Die Analyse der sequentiellen Konnektivitäten in den 2D- und 3D-NOESY Spektren ergab drei jeweils über NOE-Konnektivitäten zusammenhängende Signalabfolgen, die den

Iminoprotonensignalen der Nukleotide der drei Helices (P1, P2 und P3) zugeordnet werden konnten (Abbildung 4.2b). Für die NMR-Resonanzzuordnung wurden in Fällen, für die die Analyse der sequentiellen Konnektivitäten aufgrund limitierter spektraler Dispersion nicht vervollständigt werden konnte, Modell-RNA-Konstrukte eingesetzt (Tabelle 4.1). Der Vergleich der chemischen Verschiebungen und NOE-Konnektivitäten der Modell-RNA-Konstrukte konnte nach der in Kapitel 2 beschriebenen *'divide-and-conquer'* Strategie aufgrund guter Übereinstimmungen der spektralen Eigenschaften zur Resonanzzuordnung der Gesamt-RNA  $Gsw^{loop}$  herangezogen werden. Für die Resonanzzuordnung von  $Gsw^{loop}$  wurden die Modell-RNA-Konstrukte 'Helix 2' und 'Helix 3' eingesetzt, die jeweils die helikalen Strukturelemente Helix P2 und Helix P3 der Gesamt-RNA repräsentierten (Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.3:** Überlagerung der  $^1H,^{15}N$ -HSQC Spektren von  $Gsw^{loop}$  (ohne  $Mg^{2+}$ , schwarz) und den Modell-RNA-Konstrukten 'Helix 2' (blau) und 'Helix 3' (orange). Die farblich hervorgehobenen Nukleotide der Sekundärstrukturen der Modell-RNA-Konstrukte entsprechen den jeweils in den  $^1H,^{15}N$ -HSQC Spektren detektierbaren Signalen. Die Resonanzzuordnung von  $Gsw^{loop}$  ist entsprechend der Übereinstimmung mit den Modell-RNA-Konstrukten farblich annotiert.

Außer den Resonanzen der helikalen Strukturelemente konnten in den  $^1H,^{15}N$ -HSQC Spektren der  $Gsw^{loop}$ -RNA (in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$ ) keine weiteren Iminoprotonensignale beobachtet werden. Die weiteren Iminoprotonen der RNA sind demzufolge nicht in stabile Wasserstoffbrückenbindungen oder Strukturelemente involviert, sondern vermutlich durch Wasser-vermittelte Austauschprozesse in den NMR-Spektren nicht detektierbar. Dies gilt für

Iminoprotonen der Nukleotide der Ligand-Bindungsregion, der Schlaufenregionen und der endständigen Basenpaarungen der Helices (G12, G45, U67, G72 und U75).

Damit konnte anhand der NMR-spektroskopischen Charakterisierung die vorgeschlagene Sekundärstruktur der  $Gsw^{loop}$ -RNA bestätigt werden (Abbildung 4.1). Zusätzlich dazu ergab die Analyse der NMR-Spektren von  $Gsw^{loop}$ , dass für diese RNA in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  die interhelikale Schlaufenwechselwirkung nicht ausgebildet ist. Vielmehr entsprechen die NMR-Charakteristika der helikalen Strukturelemente (P2 und P3) von  $Gsw^{loop}$  denjenigen der Modell-RNA-Konstrukte, was zusätzlich die ausschließliche Ausbildung von Sekundärstrukturmotiven impliziert. Diese Beobachtungen stehen in klarem Gegensatz zur Situation der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne  $Gsw^{apt}$ , für welche die interhelikale Tertiärinteraktion bereits im Ligand-freien Zustand und auch in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  detektiert werden konnte (27). Die NMR-Spektren der  $Gsw^{loop}$ -RNA belegen damit, dass die Doppelmutation (G37A/C61U) dieses interhelikale Tertiärstrukturelement destabilisiert, jedoch nicht zu alternativen Tertiärinteraktionen der RNA oder konformationeller Heterogenität auf der NMR-Zeitskala führt.

### **$Mg^{2+}$ -Abhängigkeit der konformationellen Dynamik von $Gsw^{loop}$ im Ligand-freien Zustand**

$Mg^{2+}$ -Ionen stellen oft essentielle Cofaktoren für die Strukturausbildung und die Funktion verschiedenster komplexer RNAs dar. Insbesondere für die Ausbildung stabiler Tertiärstruktur motive sind  $Mg^{2+}$ -Ionen häufig erforderlich (1, 33).

Spektrale Veränderungen in den  $^1H, ^{15}N$ -HSQC Spektren von  $Gsw^{loop}$  in Folge einer  $Mg^{2+}$ -Titration zeigten deutliche  $Mg^{2+}$ -induzierte Effekte auf die Strukturausbildung dieser RNA. Basierend auf den Iminoprotonen-Reportersignalen wurden die NMR-spektroskopischen Charakteristika von  $Gsw^{loop}$  nach  $Mg^{2+}$ -Zugabe analysiert, um daraus resultierende konformationelle Unterschiede der RNA zu identifizieren und zu charakterisieren. Diese Analyse der NMR-Charakteristika beinhaltet dabei zum einen die Untersuchung möglicher chemischer Verschiebungsänderungen (*chemical shift perturbation*, CSP) der NMR-Resonanzen. Diese können auftreten, wenn die jeweiligen Nukleotide an einer  $Mg^{2+}$ -Bindungsstelle beteiligt oder in deren direkter Umgebung lokalisiert sind, und ermöglichen somit die Lokalisierung der Bindungsstellen und die Bestimmung der entsprechenden Bindungsaffinitäten. Zusätzlich können CSPs auch durch konformationelle Umstrukturierungen der RNA hervorgerufen werden. Zum anderen kann die  $Mg^{2+}$ -induzierte Ausbildung von zusätzlichen oder sich verändernden Sekundär- oder Tertiärstrukturelementen zum Auftreten oder Verschwinden von

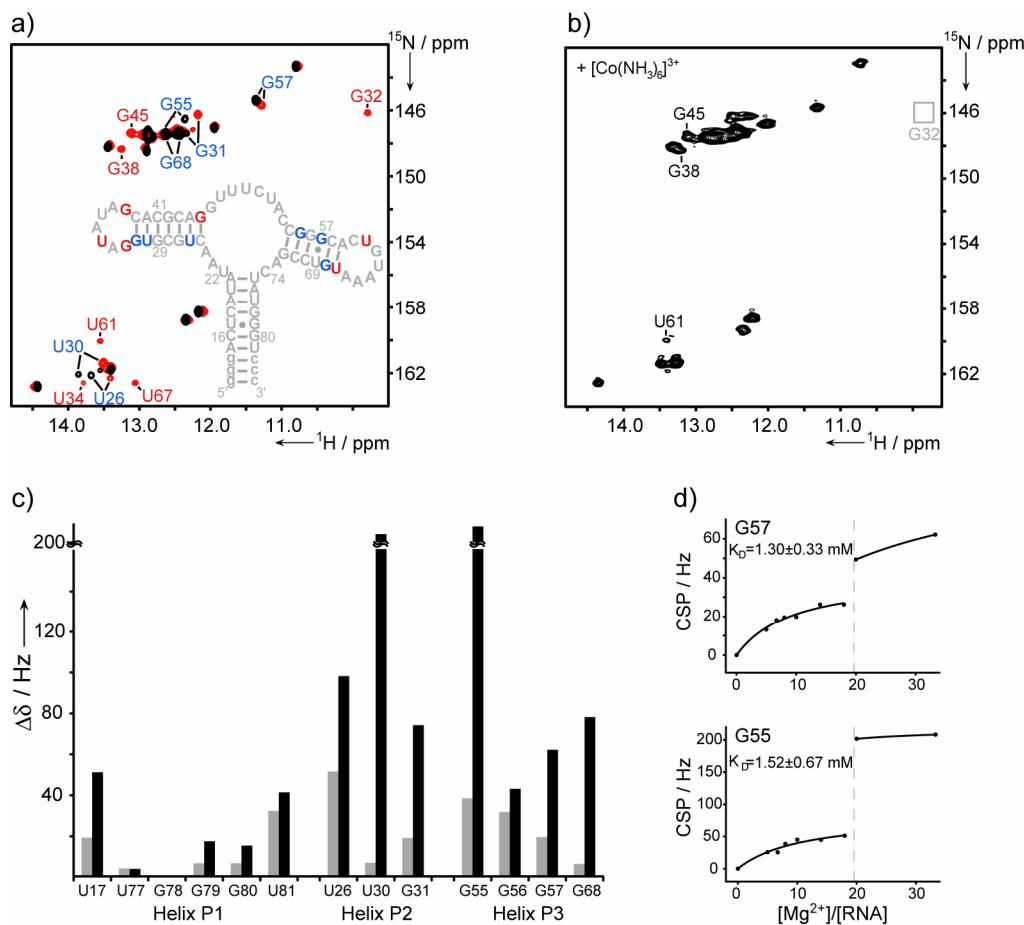


NMR-Resonanzen führen. Diese  $Mg^{2+}$ -induzierten Unterschiede der RNA-Strukturen können gegebenenfalls auch zu Änderungen der NOE-Konnektivitäten führen.

Die anhand von  $^1H,^{15}N$ -HSQC Spektren verfolgten  $Mg^{2+}$ -Titrations von  $Gsw^{loop}$ , ausgehend vom freien Zustand der RNA bis zu einem  $[RNA]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnis von  $\sim 1:18$ , ergeben keine Veränderungen der Anzahl der detektierbaren Iminoprotonen. Die beobachteten Signale konnten dabei Nukleotiden der helikalen Elemente P1, P2 und P3 zugeordnet werden. Es wurden allerdings signifikante CSPs einiger Iminoprotonen beobachtet. Die Analyse der Abhängigkeit der CSPs als Funktion des  $[RNA]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnisses ergibt  $K_D(Mg^{2+})$ -Werte im niedrig millimolaren Bereich (Abbildung 4.4). Eine darüber hinausgehende Erhöhung der  $Mg^{2+}$ -Konzentration ( $[RNA]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnis  $>1:18$ ) führte jedoch zu ausgeprägten Veränderungen der spektralen Charakteristika von  $Gsw^{loop}$ .

Zum einen konnten zusätzliche Iminoprotonensignale in den  $^1H,^{15}N$ -HSQC Spektren beobachtet werden. Diese Signale konnten den Nukleotiden zugeordnet werden, die an der Ausbildung der interhelikalen Schlaufenwechselwirkung beteiligt sind (U34, G32, G38, U61) oder abschließende Basenpaarungsinteraktionen der Helices (G45, U67) ausbilden. Die Signale können ausschließlich detektiert werden, sobald das Tertiärstrukturelement ausgebildet ist (Abbildung 4.4). Diese NMR-Experimente zeigten demzufolge, dass hohe  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen die Ausbildung des Tertiärstrukturelementes, der interhelikalen Schlaufenwechselwirkung, vermitteln können, welche zuvor als Folge der eingeführten Mutationen destabilisiert wurde.

Zum anderen führte die Stabilisierung der interhelikalen Schlaufenwechselwirkung bei hohen  $[RNA]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnissen zu auffallend starken chemischen Verschiebungsänderungen der Signale der helikalen Strukturelemente P2 und P3 (Abbildung 4.4). Diese CSPs können möglicherweise mit zwei Effekten in Verbindung gebracht werden. Sie könnten zum einen infolge lokaler konformationeller Veränderungen der RNA aufgrund von RNA- $Mg^{2+}$  Wechselwirkungen auftreten. Zum anderen könnten sie durch die strukturellen Veränderungen induziert werden, die durch die Stabilisierung des Tertiärstrukturelementes und die dadurch hervorgerufene parallele Ausrichtung der Helices P2 und P3 ausgelöst werden. Die Veränderungen der chemischen Verschiebung dieser Signale sind dabei vergleichsweise abrupt und werden vermutlich durch die globalen konformationellen Veränderungen der RNA induziert, die infolge eines kombinierten Prozesses von  $Mg^{2+}$ -Bindung und RNA-Faltung durch die Ausbildung einer stabilen  $Mg^{2+}$ -vermittelten Tertiärinteraktion auftreten.



**Abbildung 4.4:** Kationen-induzierte Effekte auf die Strukturausbildung der *Gsw<sup>loop</sup>*-RNA; **a)** Überlagerung der  $^1H, ^{15}N$ -HSQC Spektren von *Gsw<sup>loop</sup>* ( $T \sim 283$  K) bei [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnissen von  $\sim 1:8$  (schwarz) und  $\sim 1:33$  (rot). Imino protonenresonanzen, welche ausschließlich bei hohen [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnissen zu detektieren sind, sind im NMR-Spektrum und auf der Sekundärstruktur von *Gsw<sup>loop</sup>* in rot hervorgehoben. Imino protonen mit einer chemischen Verschiebungsänderung  $\Delta\delta > 40$  Hz innerhalb des Bereiches der [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnisse von  $\sim 1:8$  bis  $\sim 1:33$  sind in blau dargestellt; **b)**  $^1H, ^{15}N$ -HSQC-Spektrum von *Gsw<sup>loop</sup>* in Gegenwart von 20 eq [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]<sup>3+</sup> ( $T \sim 283$  K); charakteristische Signale, welche die Ausbildung der interhelikalen Schlaufenwechselwirkung anzeigen (G38, U61, G45), können detektiert werden. Ein Signal für das Nukleotid G32 kann nicht beobachtet werden, was möglicherweise den sich unterscheidenden Austauschprozessen zugeschrieben werden könnte; **c)** Chemische Verschiebungsänderungen (CSP)  $\Delta\delta$  [Hz] von aufgelösten Imino protonen nach Mg<sup>2+</sup>-Zugabe bis zu einem [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnis von  $\sim 1:8$  (grau) und  $\sim 1:33$  (schwarz); **d)** Abhängigkeit der CSPs exemplarischer Imino protonen (G55, G57) vom [Mg<sup>2+</sup>]:[RNA]-Verhältnis. Die  $K_D(Mg^{2+})$ -Werte resultieren jeweils aus der Analyse dieser Korrelation bis zu einem [Mg<sup>2+</sup>]:[RNA]-Quotient von  $\sim 18:1$ . Die gestrichelte graue Linie markiert das [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnis, für welches alle Signale der interhelikalen Schlaufenwechselwirkung in den NMR-Spektren von *Gsw<sup>loop</sup>* detektiert werden können.

Um einzuordnen, ob direkte Metallkoordinationen mit der RNA oder unspezifische elektrostatische Interaktionen und negative Ladungskompensationen die minimalen Voraussetzungen darstellen, um die Ausbildung der interhelikalen RNA-RNA-Tertiärinteraktion zu vermitteln, wurden NMR-Spektren von  $Gsw^{loop}$  in Gegenwart von  $[Co(NH_3)_6]^{3+}$  (34) aufgenommen. Infolge der Titration der RNA mit diesem  $[Mg(H_2O)_6]^{2+}$ -Analogon und dessen Assoziation konnten auch hier chemische Verschiebungsänderungen von Iminoprotonenresonanzen beobachtet werden. Zusätzlich dazu führte nicht nur die Zugabe von  $Mg^{2+}$ , sondern auch die von  $[Co(NH_3)_6]^{3+}$  zum Auftreten derjenigen Iminoprotonensignale in den  $^1H$ ,  $^{15}N$ -HSQC Spektren, die für die ausgebildete Tertiärinteraktion charakteristisch sind (Abbildung 4.4b). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass bereits Interaktionen der äußeren Metall-Ionen Koordinationssphäre (*outer-sphere complex*) mit der RNA ausreichend sind, um die Ausbildung des interhelikalen Tertiärstrukturelementes für  $Gsw^{loop}$  zu vermitteln.

### **Strukturelle Charakteristika der freien RNA-Konformation bestimmen die Eigenschaften der $Gsw^{loop}$ -Ligand Komplexbildung**

Wie bereits gezeigt wurde, werden die Ligand-Bindungscharakteristika der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne durch die in den Schlaufenregionen eingeführten Mutationen (G37A/C61U) wesentlich beeinflusst (27). Während die Riboswitch-RNA  $Gsw^{apt}$  keine  $Mg^{2+}$ -Ionen für die RNA-Ligand Komplexbildung benötigt, bindet die Mutante  $Gsw^{loop}$  den Liganden Hypoxanthin nur in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen.

Die NMR-Spektren von  $Gsw^{loop}$  und Hypoxanthin in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  zeigten, dass die Ligandbindung an die Mutante stattfindet und die Ausbildung eines RNA-Ligand Komplexes induziert, der demjenigen des  $Gsw^{apt}$ -Hypoxanthin Komplexes gleicht (Abbildung 4.6c). Für den  $Gsw^{loop}$ -Hypoxanthin Komplex in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  konnten alle erwarteten zusätzlichen Signale beobachtet werden, die denjenigen des gebundenen Liganden und der Nukleotide der Ligand-Bindungsregion der RNA entsprechen (27).

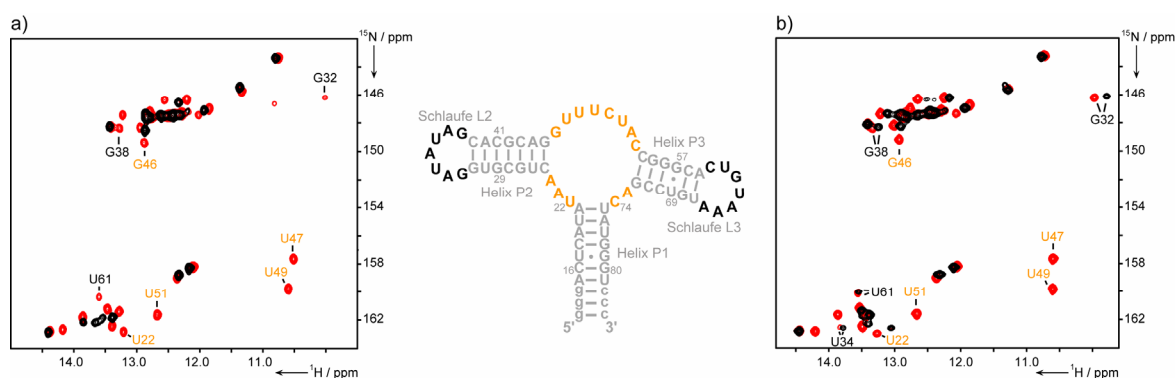
Wie im vorangehenden Abschnitt diskutiert, ist die Konformation der  $Gsw^{loop}$ -RNA im Ligand-freien Zustand stark von der  $Mg^{2+}$ -Konzentration abhängig. Basierend auf den  $Mg^{2+}$ -abhängigen strukturellen Charakteristika dieser Ligand-freien RNA-Konformationen können entsprechend drei Bereiche mit unterschiedlichen Eigenschaften bezüglich der RNA-Ligand Komplexbildung definiert werden.

(i) In Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  ist die interhelikale Schlaufeninteraktion nicht ausgebildet und für die Mutante  $Gsw^{loop}$  kann keine Bindung des Liganden Hypoxanthin beobachtet werden. Auch die Zugabe eines 10-fachen Überschusses des Liganden führte nicht zu einer Komplexbildung

und zeigte somit, dass die nicht ausgebildete interhelikale Tertiärstruktur in Bezug auf eine Komplexbildung nicht durch hohe Ligand-Konzentrationen kompensiert werden kann.

(ii) In niedrigeren  $Mg^{2+}$ -Konzentrationsbereichen mit  $[Gsw^{loop}]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnissen bis zu  $\sim 1:18$  können charakteristische RNA-Ligand Komplex-Signale in den NMR-Spektren detektiert werden (Abbildung 4.5). Die Ausbildung der interhelikalen Schlaufenwechselwirkung und der Ligand-Bindungstasche findet allerdings ausschließlich als Folge der Bindung des Liganden zusammen mit der Assoziation von  $Mg^{2+}$ -Ionen statt.

(iii) Im Gegensatz dazu kann bei hohen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen mit  $[Gsw^{loop}]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnissen  $>1:18$  die interhelikale Schlaufenwechselwirkung bereits im Ligand-freien Zustand der RNA detektiert werden. Sobald Hypoxanthin zugegeben wird, konnten neben dem erwarteten Auftreten der Signale der Ligand-Bindungsregion chemische Verschiebungsänderungen für Resonanzen der Schlaufenregionen und der Helices P2 und P3 beobachtet werden (Abbildung 4.5). Diese chemischen Verschiebungsänderungen zeigten auf, dass in Folge des Ligand-Bindungsprozesses nicht nur die Ligandbindung selbst, sondern auch eine zusätzliche konformationelle Umorientierung von entfernt lokalisierten Strukturelementen der RNA stattfindet.



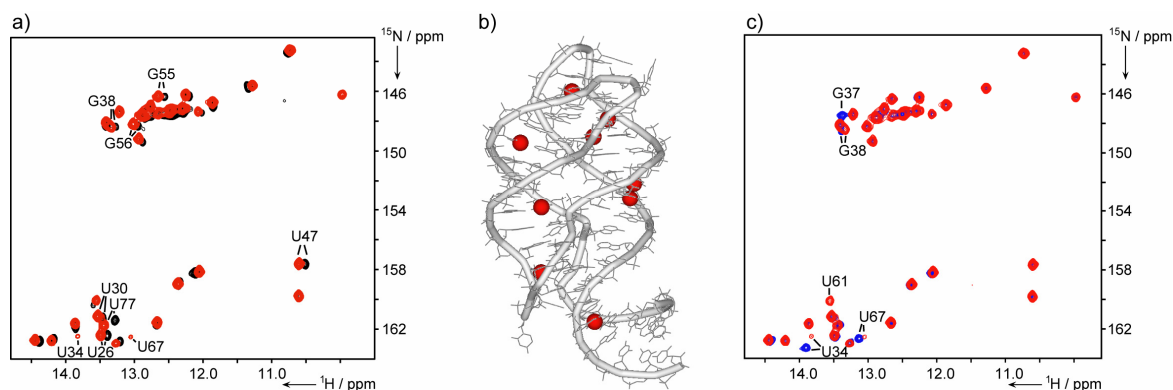
**Abbildung 4.5:** Überlagerung der  $^1H,^{15}N$ -HSQC Spektren von  $Gsw^{loop}$  bei verschiedenen  $[Gsw^{loop}]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnissen in An- (rot) und Abwesenheit (schwarz) von Hypoxanthin (mitte: Sekundärstruktur  $Gsw^{loop}$ ); **a)**  $[Gsw^{loop}]:[Mg^{2+}] \sim 1:7$  und **b)**  $[Gsw^{loop}]:[Mg^{2+}] \sim 1:33$ . Die NMR-Spektren in Anwesenheit des Liganden zeigen jeweils die charakteristischen Iminoprotonensignale der Tertiärelemente. Signale der Ligand-Bindungsregion sind in den Spektren und auf der Sekundärstruktur von  $Gsw^{loop}$  orange gekennzeichnet, Signale der interhelikalen Schlaufenwechselwirkung sind schwarz annotiert. Während bei einem  $[Gsw^{loop}]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnis von (a)  $\sim 1:7$  beide Strukturelemente erst nach Zugabe des Liganden ausgebildet werden, ist die interhelikale Schlaufenwechselwirkung bei einem  $[Gsw^{loop}]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnis von (b)  $\sim 1:33$  bereits im Ligand-freien Zustand detektierbar. Nach Zugabe des Liganden sind

allerdings signifikante chemische Verschiebungsänderungen der entsprechenden Signale zu beobachten, was eine zusätzliche strukturelle Umorientierung dieser Strukturbereiche infolge der Ligandbindung impliziert.

Der Vergleich der NMR-Spektren der finalen  $Gsw^{loop}$ -Ligand Komplexe für (ii) niedrige und (iii) hohe  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen ergibt dennoch Unterschiede in den CSPs für diverse Iminoprotonenresonanzen (Abbildung 4.6). NMR-Signale mit einer CSP  $>25$  Hz nach  $Mg^{2+}$ -Titration des RNA-Ligand Komplexes ( $[Gsw^{loop}]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnis von (ii)  $\sim 1:7$  bis (iii)  $\sim 1:33$ ) sind in Abbildung 4.6 hervorgehoben. Bei hohen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen ( $[Gsw^{loop}]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnis  $\sim 1:33$ ) können außerdem zwei zusätzliche Iminoprotonensignale detektiert werden, die den Nukleotiden U34 und U67 zugeordnet werden konnten. Beide Nukleotide sind in der strukturellen Umgebung der ausgebildeten interhelikalen Schlaufenwechselwirkung lokalisiert. Die beobachteten  $Mg^{2+}$ -abhängigen CSPs der Iminoprotonenresonanzen des  $Gsw^{loop}$ -Ligand Komplexes sind in guter Übereinstimmung mit den für den  $Gsw^{apt}$ -Ligand Komplex identifizierten  $Mg^{2+}$ -Bindungsstellen (27). Obwohl die RNA-Ligand Komplexbildung bereits in den NMR-Spektren bei niedrigen  $[Gsw^{loop}]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnissen zu beobachten war, konnte gezeigt werden, dass sich die NMR-spektroskopischen Charakteristika aufgrund der Veränderungen der Eigenschaften des konformationellen RNA-Ensembles nicht nur der Ligand-freien RNA, sondern auch der RNA-Ligand Komplexe mit zunehmender  $Mg^{2+}$ -Konzentration verändern.

Der Vergleich der finalen RNA-Hypoxanthin Komplexe von  $Gsw^{apt}$  und  $Gsw^{loop}$  bei hohen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen ergibt mit Ausnahme der Iminoprotonenresonanzen, die sich aufgrund der RNA-Mutationen unterscheiden (G37 und U61), übereinstimmende  $^1H, ^{15}N$ -HSQC Spektren. Signifikante Unterschiede in der chemischen Verschiebung werden nur für diejenigen Nukleotide beobachtet, die in direkter struktureller Umgebung der Mutation in den Schlaufenregionen der RNA-Konstrukte lokalisiert sind (Abbildung 4.6c).

Zusammengefasst ergibt die NMR-Konformationsanalyse damit, dass die destabilisierenden Effekte der Mutationen bezüglich der Ausbildung der tertiären interhelikalen Schlaufenwechselwirkung durch die Zugabe von  $Mg^{2+}$  sowohl in der Ligand-freien Konformation von  $Gsw^{loop}$  als auch im RNA-Ligand Komplex kompensiert werden können. Die chemischen Verschiebungsänderungen der Nukleotide in den Schlaufenregionen weisen dennoch auf mögliche lokale Strukturänderungen hin, die sich gegebenenfalls auch auf die lokale Stabilität des Tertiärstrukturelementes im Vergleich zur  $Gsw^{apt}$ -RNA auswirken könnten.



**Abbildung 4.6:**  $Mg^{2+}$ -induzierte Auswirkungen auf den Gsw<sup>loop</sup>-Hypoxanthin Komplex; **a)** Überlagerung der <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC Spektren des Gsw<sup>loop</sup>-Hypoxanthin Komplexes mit (ii) 7 eq (schwarz) und (iii) 33 eq (rot)  $Mg^{2+}$ . Annotiert sind Iminoprotonensignale, die chemische Verschiebungsänderungen von  $\Delta\delta > 25$  Hz aufweisen oder ausschließlich in Gegenwart hoher  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen detektierbar sind; **b)** Die in (a) ermittelten Iminoprotonen der entsprechenden Nukleotide sind in der Kristallstruktur der Hypoxanthin-gebundenen Aptamerdomäne der Guanin Riboswitch-RNA (pdb: 1U8D) (22) rot hervorgehoben; **c)** Überlagerung der <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC Spektren der RNA-Hypoxanthin Komplexe, Gsw<sup>apt</sup>-Hypoxanthin (blau) und Gsw<sup>loop</sup>-Hypoxanthin (rot, [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnis ~1:33) in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ . Iminoprotonensignale die sich aufgrund der Mutationen in den beiden Spektren unterscheiden (G37 bzw. U61 sind jeweils ausschließlich im Spektrum von Gsw<sup>apt</sup> bzw. Gsw<sup>loop</sup> detektierbar) oder signifikante chemische Verschiebungsänderungen aufweisen (U34, G38 und U67) sind annotiert.

### Einfluss der konformationellen RNA-Dynamiken auf einen nicht-spezifischen Ligand-Bindungsprozess

Wie in Kapitel 3 beschrieben, konnte für das RNA-Konstrukt Gsw<sup>apt</sup> ein schwach affiner, nicht-spezifischer Ligand-Bindungsprozess beobachtet werden. Die Interpretation einer solchen schwach affinen RNA-Ligand Komplexbildung basierte auf den beobachteten NMR-Linienverbreiterungen der Ligand-Signale von Hypoxanthin bzw. Adenin in Gegenwart der den jeweiligen Liganden nicht spezifisch bindenden Riboswitch-RNA Aptamerdomäne Asw<sup>apt</sup> bzw. Gsw<sup>apt</sup> (35). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde vermutet, dass der schwach affine Ligand-Bindungsprozess durch eine partiell strukturierte Ligand-Bindungsregion hervorgerufen wird, welche diese transienten Wechselwirkungen mit dem Liganden ermöglicht (36).

Um den Einfluss des Tertiärstrukturelementes, der interhelikalen Schlaufenwechselwirkung, auf die Eigenschaften eines solchen nicht-spezifischen Ligand-Bindungsprozesses zu untersuchen, wurden analoge NMR-Experimente in Gegenwart der Gsw<sup>loop</sup>-RNA mit variierenden  $Mg^{2+}$ -

Konzentrationen durchgeführt. Es wurden die Linienbreiten der nicht austauschenden NMR-Signale C2-H2 und C8-H8 der  $^{13}C,^{15}N$ -markierten Liganden Hypoxanthin und Adenin in Gegenwart von nicht-isotopenmarkierter  $Gsw^{loop}$ -RNA analysiert (Tabelle 4.2).

Für die freien Liganden in Lösungen konnten Linienbreiten von  $6.9 \pm 0.1$  Hz für Adenin bzw.  $7.5 \pm 1.0$  Hz für Hypoxanthin ermittelt werden. Erwartungsgemäß wird eine starke Linienverbreiterung der Hypoxanthin-Signale in Gegenwart von  $Gsw^{loop}$  und hohen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen beobachtet. Die Analyse ergab eine Ligand-Linienbreite von  $33.0 \pm 3.2$  Hz, die die Ausbildung eines spezifischen RNA-Ligand Komplexes mit langsamen Austauschprozessen reflektiert. Die Ausbildung eines schwach affinen Komplexes von  $Gsw^{loop}$  und Adenin, analog der Beobachtung für  $Gsw^{apt}$  (ohne  $Mg^{2+}$ ) und Adenin bzw.  $Asw^{apt}$  und Hypoxanthin, kann aufgrund einer ermittelten Ligand-Linienbreite von  $11.3 \pm 0.1$  Hz bei einem  $[Gsw^{loop}]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnis  $>1:18$  angenommen werden (Tabelle 4.2).

$Gsw^{loop}$	Ligand ( $^{13}C,^{15}N$ -markiert)	$Mg^{2+}$ [eq]	RNA-Charakteristika		$\Delta\sigma$ [Hz]	$\Delta\Gamma^{1/2}$ (Ligand) [Hz]	$\Delta\Gamma^{1/2}_{rel}$ [Hz]
			ausgebildete interhelikale Schlaufen- wechselwirkung	spezifische Ligandbindung			
--	Adenin	--			0.14	$6.9 \pm 0.1$	--
x	Adenin	100	x	--	0.22	$11.3 \pm 0.1$	4.4
--	Hypoxanthin	--			0.11	$7.5 \pm 1.0$	--
x	Hypoxanthin	--	--	--	0.01	$10.0 \pm 0.4$	2.5
x	Hypoxanthin	50	x	x	0.05	$33.0 \pm 3.2$	25.5

**Tabelle 4.2:** NMR-Linienbreiten der  $^{13}C,^{15}N$ -markierten Liganden in Gegenwart nicht-isotopenmarkierter  $Gsw^{loop}$ -RNA ( $[Mg^{2+}] \sim$ Angabe in Äquivalenten (eq) relativ zu der Konzentration des jeweiligen RNA-Ligand Komplexes;  $\Delta\sigma$ : Abweichung der NMR-Linienbreite des jeweiligen DSS-Referenzsignals vom Mittelwert der DSS-Linienbreiten; Ligand-Linienbreite  $\Delta\Gamma^{1/2}$  (Ligand): Mittelwert der Linienbreiten der Signale C2-H2 und C8-H8 des jeweiligen Liganden;  $\Delta\Gamma^{1/2}_{rel}$ : Abweichung der NMR-Linienbreite relativ zur Linienbreite des jeweiligen freien Liganden).

Die bisher aufgeführten Ergebnisse spiegeln damit die Ligand-Bindungscharakteristika der in Gegenwart der  $Gsw^{apt}$ -RNA ermittelten Eigenschaften (Kapitel 3) sowohl in Bezug auf die Ausbildung eines spezifischen Komplexes in Gegenwart des spezifisch erkannten Liganden

Hypoxanthin als auch eines schwach affinen Komplexes in Gegenwart des nicht spezifisch erkannten Liganden Adenin wieder. Interessanterweise werden dagegen in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  nur sehr geringe RNA-induzierte Linienverbreiterungseffekte der Ligand NMR-Signale beobachtet (Tabelle 4.2), die den ermittelten Effekten in Gegenwart eines Modell-RNA-Konstruktes entsprechen (Tabelle 3.2).

Die Beobachtung, dass für  $Gsw^{loop}$  in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  kein solch nicht-spezifischer Bindungsprozess detektiert werden konnte, deutet darauf hin, dass die verstärkte konformationelle Dynamik des RNA-Ensembles in Abwesenheit eines stabil ausgebildeten interhelikalen Tertiärstrukturelementes einen solchen nicht-spezifischen Ligand-Bindungsprozesses verhindert.

### **RNA- $Mg^{2+}$ -Interaktionen beeinflussen die Temperaturabhängigkeit der funktionalen Stabilitäten von $Gsw^{apt}$ und $Gsw^{loop}$**

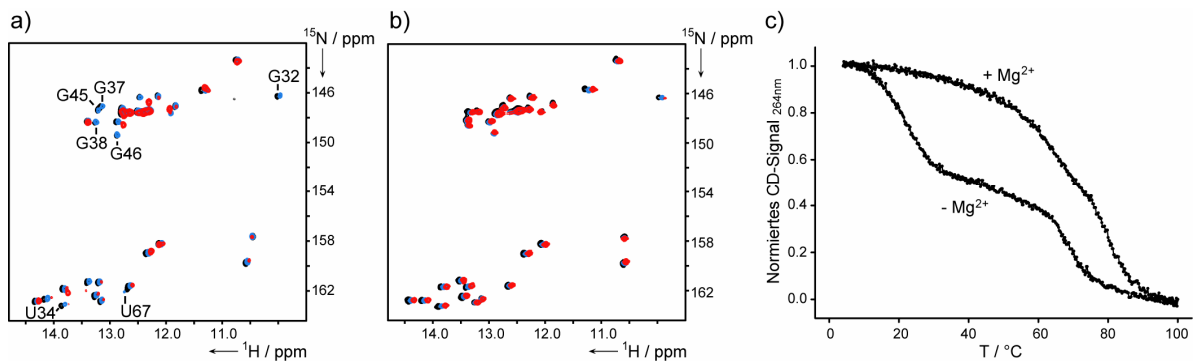
Die Stabilität von komplexen RNA-Strukturen kann wesentlich durch RNA- $Mg^{2+}$ -Interaktionen beeinflusst werden und damit entsprechende RNA-Funktionen herbeiführen oder verändern (2, 37). Die RNA-Konstrukte  $Gsw^{apt}$  und  $Gsw^{loop}$  weisen im Ligand-freien Zustand sehr ähnliche Sekundärstrukturen auf, unterscheiden sich aber im Ausmaß ihrer Tertiärstrukturausbildung und deren  $Mg^{2+}$ -Abhängigkeit, welche im Weiteren die Ligand-Bindungskompetenz der jeweiligen RNA definiert.

Um die Beiträge von RNA- $Mg^{2+}$ -Interaktionen zur Ausbildung der entsprechenden RNA-Strukturen und deren funktionale Stabilitäten zu analysieren, wurden die temperaturabhängigen Entfaltungsübergänge der Guanin Riboswitch Aptamerdomänen ( $Gsw^{apt}$  und  $Gsw^{loop}$ ) in Gegenwart der Cofaktoren Hypoxanthin und  $Mg^{2+}$  analysiert. Dabei wurden die Informationen der globalen Eigenschaften aus CD-Schmelzkurven (38) mit den Nukleotid-spezifisch aufgelösten Charakteristika von temperaturabhängigen NMR-Untersuchungen kombiniert.

Der Vergleich der Schmelzkurven der RNA-Konstrukte  $Gsw^{apt}$  und  $Gsw^{loop}$  belegte, dass die konzentrationsabhängige Interaktion von  $Mg^{2+}$  mit der RNA mit der Stabilität der RNA-Tertiärstrukturen korreliert. Der Verlauf der Schmelzkurven ergab zwei Übergänge für RNA-Konstrukte oder RNA-Ligand Komplexe, für die basierend auf den NMR-Daten die Ausbildung der interhelikalen Tertiärinteraktion bestätigt werden konnte (Abbildungen 4.7 und 4.8, Tabelle 4.3). Einzig die Schmelzkurven von  $Gsw^{loop}$  in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  oder bei geringen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen, für welche die NMR-Untersuchungen keine stabil ausgebildeten Tertiärstrukturen ergaben, zeigten einen Verlauf mit nur einem Übergang bei  $\sim 67.4-68.1^{\circ}C$  (Abbildung 4.8c). Entsprechend kann der erste Schmelzübergang vorerst der



Entfaltung der Tertiärstrukturelemente zugeordnet werden, während der zweite Übergang (oder der einzige Übergang im Falle von  $Gsw^{loop}$  in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  oder bei geringen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen) der Entfaltung der Sekundärstrukturelemente zugewiesen werden kann.



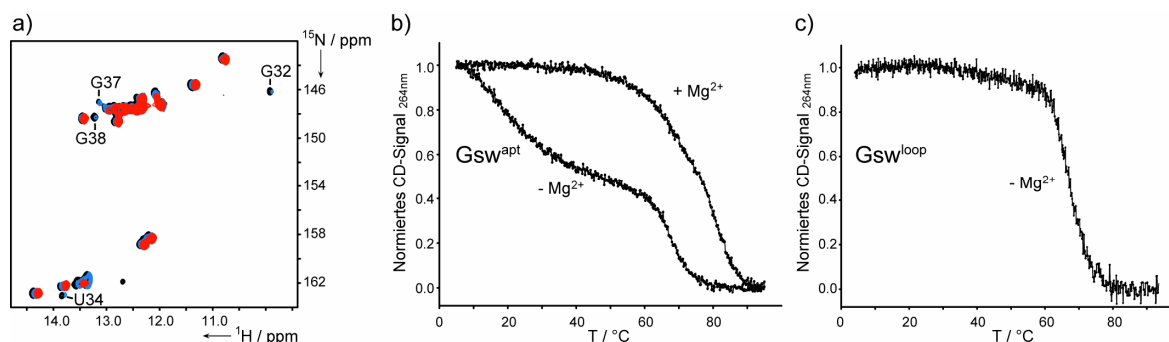
**Abbildung 4.7:** Temperaturabhängige Eigenschaften der  $Gsw^{apt}$ -Hypoxanthin Komplexe; Überlagerung der temperaturabhängigen  $^1H,^{15}N$ -HSQC Spektren (schwarz: 10°C, blau: 20°C, rot: 30°C) des **a)**  $Gsw^{apt}$ -Hypoxanthin Komplexes und **b)** des  $Gsw^{apt}$ -Hypoxanthin Komplexes in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  ( $^{15}N$ -markierte RNA, nicht-isotopenmarkierter Ligand). Annotiert sind Iminoprotonensignale, die bei 30°C nicht detektierbar sind; **c)** Normierte CD-Schmelzkurven des  $Gsw^{apt}$ -Hypoxanthin Komplexes in An- und Abwesenheit von  $Mg^{2+}$ .

Um eine eindeutige Zuordnung der verschiedenen Übergänge zu der Entfaltung definierter Strukturelemente zu erhalten, wurde der Vorteil der Nukleotid-spezifischen Auflösung in temperaturabhängigen NMR-Experimenten genutzt (Abbildungen 4.7 und 4.8).

Die CD-Schmelzkurven zeigten einen ersten Übergang für den  $Gsw^{apt}$ -Hypoxanthin Komplex bei  $\sim 21.9^\circ C$ , während die Zugabe von  $Mg^{2+}$  zu einer Erhöhung der Temperatur dieses Überganges auf  $\sim 69.5^\circ C$  führte. Der Vergleich der bei verschiedenen Temperaturen aufgenommenen  $^1H,^{15}N$ -HSQC Spektren ergab, dass zahlreiche Iminoprotonensignale des  $Gsw^{apt}$ -Hypoxanthin Komplexes bei 30°C nicht länger detektierbar sind, während im Gegensatz dazu die Signale des RNA-Ligand Komplexes in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  bei dieser Temperatur noch alle beobachtet werden können (Abbildung 4.7). Im Detail nimmt die Signalintensität derjenigen Nucleotide des  $Gsw^{apt}$ -Hypoxanthin Komplexes bei 30°C am stärksten ab, die an der Ausbildung der interhelikalen Basenquadrupel (U34, G37, G38) beteiligt sind oder nur im Falle der ausgebildeten interhelikalen Tertiärstrukturinteraktion detektiert werden können (G32, G45, U67). Hinsichtlich Tertiärstrukturinteraktionen der Ligand-Bindungstasche konnte beobachtet werden, dass die entsprechenden Signale ebenfalls Linienverbreiterungen zeigten. Das

Iminoprotonensignal des Nukleotids G46 ist allerdings das einzige Reportersignal, dessen Intensität bereits bei 30°C soweit abgenommen hatte, dass es im  $^1H, ^{15}N$ -HSQC-Spektrum nicht mehr detektierbar war. Eine weitere Temperaturerhöhung ( $T \sim 35-40^\circ C$ ) führte dann jedoch zu NMR-Spektren, in welchen auch alle weiteren NMR-Resonanzen der Nukleotide nicht mehr zu beobachten sind, die in die Ausbildung der Ligand-Bindungstasche involviert sind.

Im Ligand-freien Zustand von  $Gsw^{apt}$  können die Iminoprotonensignale der Ligand-Bindungsregion allgemein nicht detektiert werden (27). Die NMR-Resonanzen der Nukleotide, die in die bereits in der Ligand-freien Konformation ausgebildete interhelikale Schlaufenwechselwirkung involviert sind, zeigten aber vergleichbare temperaturabhängige Effekte wie entsprechende Signale im RNA-Ligand Komplex (Abbildung 4.8a). Auf der Basis dieser NMR-spektroskopischen Experimente konnte folglich der erste temperaturabhängige Übergang der Entfaltung eindeutig den jeweilig vorliegenden Tertiärstrukturinteraktionen zugeordnet werden.



**Abbildung 4.8:** **a)** Überlagerung der temperaturabhängigen  $^1H, ^{15}N$ -HSQC Spektren (schwarz: 10°C, blau: 20°C, rot: 30°C) der Ligand-freien  $Gsw^{apt}$ -RNA; Annotiert sind Iminoprotonensignale von Nukleotiden der interhelikalen Schlaufeninteraktion; **b)** Normierte CD Schmelzkurven von  $Gsw^{apt}$  in An- und Abwesenheit von  $Mg^{2+}$ ; **c)** Normierte CD Schmelzkurve von  $Gsw^{loop}$  in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  mit nur einem Entfaltungsübergang.

Die beobachteten Effekte der beiden Cofaktoren auf die thermische Stabilität der RNA-Komplexe sind sehr unterschiedlich. Während Hypoxanthin weder für  $Gsw^{apt}$  noch für  $Gsw^{loop}$  signifikante Verschiebungen der jeweiligen Entfaltungsübergänge induziert, stabilisiert  $Mg^{2+}$  die jeweiligen Tertiärstrukturen in signifikanter Weise (Abbildungen 4.7 und 4.8). Die beiden Entfaltungsübergänge sind beispielsweise für den  $Gsw^{apt}$ -Hypoxanthin Komplex in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  gut separiert, während die temperaturabhängigen Entfaltungen von

Tertiär- und Sekundärstrukturelementen bei hohen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen weniger klar unterscheidbar sind. Für  $G_{sw}^{apt}$  induziert die Zugabe von  $Mg^{2+}$  sowohl im Ligand-freien als auch im Ligand-gebundenen Zustand eine Verschiebung des ersten Entfaltungsüberganges von  $\Delta T_M \sim 45.3-47.6^\circ C$ . Hingegen differieren die Übergänge der Sekundärstrukturentfaltung in beiden Zuständen mit einem Unterschied von  $\Delta T_M \sim 10.7-12.1^\circ C$  jeweils weniger stark.

RNA	Cofaktor	erster Entfaltungs- übergang [ $^\circ C$ ]	zweiter Entfaltungs- übergang [ $^\circ C$ ]
$G_{sw}^{apt}$	--	20.6	68.2
$G_{sw}^{apt}$	$Mg^{2+}$	65.9	78.9
$G_{sw}^{apt}$	Hypoxanthin	21.9	67.9
$G_{sw}^{apt}$	$Mg^{2+}$ , Hypoxanthin	69.5	80.0
$G_{sw}^{loop}$	--	--	67.4
$G_{sw}^{loop}$	6 eq $Mg^{2+}$	--	68.1
$G_{sw}^{loop}$	33 eq $Mg^{2+}$	36.1	73.8
$G_{sw}^{loop}$	33 eq $Mg^{2+}$ , Hypoxanthin	37.0	73.5

**Tabelle 4.3:** Temperaturabhängige Entfaltungsübergänge der Guanin Riboswitch Aptamerdomänen ( $G_{sw}^{apt}$  und  $G_{sw}^{loop}$ ) in Gegenwart unterschiedlicher Cofaktoren.

Bei  $[RNA]:[Mg^{2+}]$ -Konzentrationsverhältnissen, für welche die NMR-Daten eine ausgebildete interhelikale Tertiärstrukturinteraktion belegen, konnten auch für die  $G_{sw}^{loop}$ -RNA und  $G_{sw}^{loop}$ -Hypoxanthin Komplexe zwei thermische Entfaltungsübergänge beobachtet werden. Während der zweite Übergang bei vergleichbaren experimentellen Bedingungen wie für  $G_{sw}^{apt}$  in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  eine ähnliche Stabilisierung durch die Assoziation von  $Mg^{2+}$ -Ionen zeigte, liegt der erste Entfaltungsübergang bei Temperaturen von  $\sim 36.1-37^\circ C$ .

Zusammengefasst weisen diese Beobachtungen darauf hin, dass die Stabilisierung der Tertiärstrukturelemente für beide RNA-Konstrukte sehr stark von der  $Mg^{2+}$ -Konzentration abhängen. Diese  $Mg^{2+}$ -induzierten Stabilisierungseffekte sind allerdings für  $G_{sw}^{apt}$  deutlicher ausgeprägt als für  $G_{sw}^{loop}$ , was möglicherweise der reduzierten Anzahl von Tertiärkontakten in der Mutante zugeschrieben werden könnte.

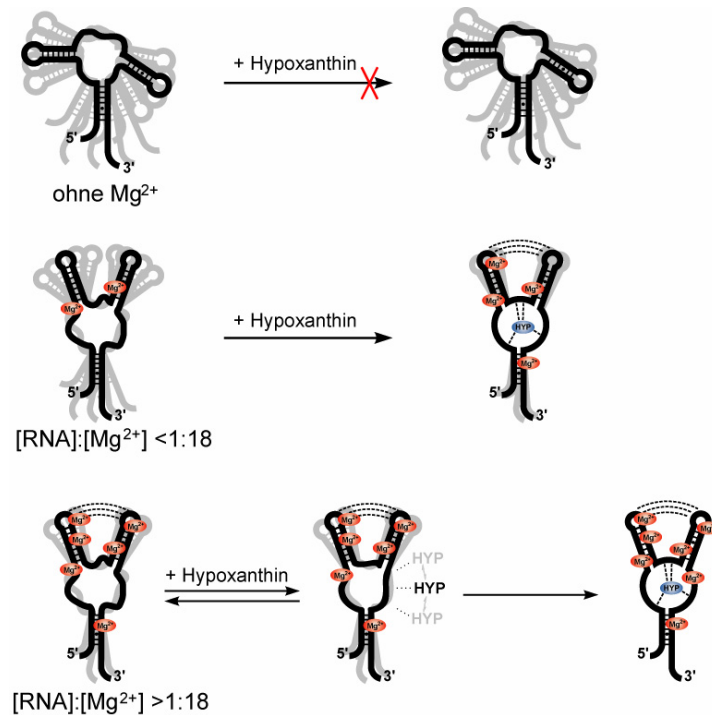
## DISKUSSION

Riboswitch-RNAs stellen RNA-Elemente dar, die in Abhängigkeit der Konzentration des jeweilig spezifischen Liganden und der in Folge entsprechend stabilisierten RNA-Struktur die Genexpression regulieren. Neben den in der Ligand-Bindungsregion lokalisierten Nukleotiden wurden auch dem aktiven Zentrum entfernt befindliche Strukturelemente als essentiell für die Organisation der globalen RNA-Architektur und die regulatorische Effizienz identifiziert (16, 17). Durch die Ausbildung komplexer Netzwerke obligatorischer inter- und intramolekularer Interaktionen, welche die Funktionen der Riboswitch-RNAs ausschlaggebend beeinflussen, stellen diese Elemente interessante Strukturen für die RNA-gerichtete Wirkstoffentwicklung dar (39). Eine grundlegende Voraussetzung für das Design entsprechender Moleküle ist das detaillierte Verständnis der involvierten RNA-Architekturen, deren funktionaler Stabilitäten und des Einflusses von RNA- $Mg^{2+}$ -Interaktionen auf die Strukturausbildung sowie die Korrelation dieser Eigenschaften mit zellulären Funktionen der regulatorischen RNA-Elemente.

Das interhelikale Tertiärstrukturelement der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne wird hauptsächlich durch die Ausbildung zweier interhelikaler Basenquadrupel stabilisiert, die bereits im Ligand-freien Zustand der RNA beobachtet wurde (22, 23, 27). In der G37A/C61U-Mutante können sich diese interhelikalen Wechselwirkungen formal weiterhin ausbilden. Die in  $Gsw^{loop}$  eingeführten Mutationen resultieren allerdings in ausgeprägten Veränderungen des konformationellen RNA-Ensembles der freien RNA im Vergleich zu demjenigen der  $Gsw^{apt}$ -RNA, welche in Folge auch die Ligand-Bindungscharakteristika beeinflussen.

Die NMR-spektroskopische Analyse von  $Gsw^{loop}$  basierte auf der NMR-Resonanzzuordnung der Iminoprotonen der RNA, die für alle Zustände der freien RNA, der  $Mg^{2+}$ -induzierten RNA-Konformationen und der RNA-Ligand Komplexe vervollständigt werden konnte. Die Nukleotid-spezifische Auflösung der NMR-Spektren in Kombination mit der vorteilhaften Gegebenheit, dass zahlreiche Iminoprotonen-Reportersignale an der Ausbildung der verschiedenen charakteristischen inter- und intramolekularen Tertiärstrukturinteraktionen beteiligt sind, ermöglichte die differenzierte Aufschlüsselung der individuellen strukturellen Beiträge zu den RNA-Charakteristika.

Während  $Mg^{2+}$ -Ionen für  $Gsw^{apt}$  bei tieferen Temperaturen keine essentielle Rolle für die Ligandbindung zukommt, zeigt die Mutante beträchtliche spektrale Veränderungen der konformationellen Dynamik im Ligand-freien Zustand in Abhängigkeit des  $[RNA]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnisses, welche in Folge die Ligand-Bindungscharakteristika bestimmen (Abbildung 4.9).



**Abbildung 4.9:** Schematische Darstellung der  $Mg^{2+}$ -induzierten Strukturausbildung der G37A/C61U-Mutante in Ligand-freien und -gebundenen Konformationen. In Abwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen bestätigen die NMR-spektroskopischen Untersuchungen die vorhergesagte Sekundärstruktur von  $Gsw^{loop}$ , zeigen allerdings weder eine ausgebildete Tertiärinteraktion noch kann die Ligandbindung detektiert werden. Im Gegensatz dazu verschiebt die Gegenwart von  $Mg^{2+}$  das RNA-Ensemble hin zu RNA-Konformationen die Ligand-bindungskompetent sind. Das  $[RNA]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnis bestimmt dabei die Eigenschaften des konformationellen RNA-Ensembles im Ligand-freien Zustand, welche in Folge die Ligandbindungseigenschaften beeinflussen. Bei hohen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen kann  $Mg^{2+}$  die zuvor destabilisierte Ausbildung der interhelikalen Tertiärinteraktion kompensieren und stellt damit sowohl die strukturellen Eigenschaften als auch die Ligand-Bindungscharakteristika der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne  $Gsw^{apt}$  wieder her.

Die freie Konformation der G37A/C61U-Mutante  $Gsw^{loop}$  zeigt signifikante konformationelle Dynamiken. Die NMR-Spektren in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  reflektieren die Ausbildung der vorhergesagten Sekundärstruktur, ergeben aber keinen Hinweis auf stabil ausgebildete Tertiärstrukturelemente; es konnten weder Iminoprotonen der interhelikalen Schlaufenwechselwirkung noch der Nukleotide der Ligand-Bindungsregion detektiert werden. Die Beobachtung, dass die Mutante den Ligand Hypoxanthin nicht binden kann, bestätigt die biologische Relevanz der interhelikalen Schlaufenwechselwirkung für eine mögliche Ligandbindung der Guanin Riboswitch-RNA (22, 24).

In Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen hingegen wird die Möglichkeit der Ligandbindung für  $Gsw^{loop}$  wiederhergestellt. Dies wirft die Frage auf, inwiefern eine Destabilisierung der interhelikalen Tertiärstruktur durch  $Mg^{2+}$ -Ionen kompensiert werden kann, um dann wiederum eine Ligandbindungskompetente RNA-Konformation zu erhalten.

Für  $[RNA]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnisse bis zu  $\sim 1:18$  kann die Mutante bereits den Ligand binden bevor die interhelikale Tertiärstruktur stabil ausgebildet ist. In diesem Bereich induziert die zusammenwirkende Bindung der Cofaktoren Hypoxanthin und  $Mg^{2+}$  zwei strukturelle Effekte. Es wird zum einen die interhelikale Tertiärstruktur und zum anderen die Ligand-Bindungstasche ausgebildet. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass  $Mg^{2+}$  die konformationelle Dynamik des RNA-Ensembles von  $Gsw^{loop}$  im Ligand-freien Zustand soweit einschränkt, dass schließlich die Ligand-Bindungskompetenz wieder hergestellt wird.

Eine weitere Erhöhung der  $Mg^{2+}$ -Konzentration ( $[RNA]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnis  $>1:18$ ) führte bereits im Ligand-freien Zustand der RNA zum Erscheinen der charakteristischen Iminoprotonen-Reportersignalen in den NMR-Spektren. Diese Beobachtung weist damit die Stabilisierung des interhelikalen Tertiärstrukturelementes durch höhere  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen nach. Unter diesen Bedingungen ist das dynamische RNA-Ensemble hin zu Konformationen mit einer stabil ausgebildeten interhelikalen Tertiärstruktur verschoben. Diese Beobachtung deutet an, dass hohe  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen die durch die Mutationen eingeführten RNA-Defekte hinsichtlich der Strukturausbildung kompensieren. Im Vergleich zu den bisher aufgeführten Konzentrationsbereichen können hier zusätzlich zu der stabilisierten Tertiärstruktur signifikante chemische Verschiebungsänderungen für Signale der Helices P2 und P3 beobachtet werden, die auf die Veränderung der Helix-Helix-Orientierung hinweisen. Diese Beobachtung kann möglicherweise mit einer Kombination der Effekte der  $Mg^{2+}$ -Bindung und der globalen RNA-Faltung assoziiert werden.

Die Zugabe des Liganden führt für  $Gsw^{loop}$  neben der erwarteten Ausbildung der Ligand-Bindungstasche zu chemischen Verschiebungsänderungen der Signale der Schlaufenregionen. Da in diesen Konzentrationsbereichen die interhelikale Tertiärstruktur bereits im Ligand-freien Zustand ausgebildet ist, zeigen diese Ergebnisse, dass die Zugabe von Hypoxanthin nicht nur zu der Ligandbindung führt, sondern dass es infolge der Ligandbindung zu einer zusätzlichen konformationellen Umorientierung der Helices kommt. Analoge spektrale Veränderungen, die als Ausrichtung der Helix-Helix-Orientierung interpretiert wurden, konnten auch in NMR-Untersuchungen des RNA-Konstruktes  $Gsw^{apt}$  beobachtet werden (35) (Kapitel 3), obwohl hier die Tertiärstrukturinteraktion bereits in der freien RNA-Konformation und auch in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  ausgebildet war (27, 35).

Wie in Kapitel 3 beschrieben, konnte für  $Gsw^{apt}$  die Ausbildung eines schwach affinen RNA-Ligand Komplexes charakterisiert werden. Die Analyse der NMR-Linienbreiten in Gegenwart der Mutante  $Gsw^{loop}$ , für welche der Grad der Tertiärstrukturausbildung durch die Variation der  $Mg^{2+}$ -Konzentration definiert werden kann, ermöglichte die Definition der Voraussetzungen für die Ausbildung eines solchen nicht-spezifischen Ligand-Bindungsprozesses. In Gegenwart von hohen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen konnten sowohl die spezifische Bindung des spezifisch erkannten Liganden Hypoxanthin als auch die nicht-spezifische Bindung des nicht spezifisch erkannten Liganden Adenin beobachtet werden. In diesem Konzentrationsbereich entsprechen somit nicht nur die strukturellen Charakteristika im Ligand-freien Zustand, d.h. die Ausbildung der interhelikalen Tertiärstruktur, sondern auch die Ligand-Bindungscharakteristika den für die  $Gsw^{apt}$ -RNA erhaltenen Ergebnissen (35).

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse der NMR-Linienbreiten Analyse darauf hin, dass die Bildung eines nicht-spezifischen, schwach affinen RNA-Ligand Komplexes von einer teilweise strukturierten Ligand-Bindungsregion abhängt. Eine solche teilweise Strukturierung der Ligand-Bindungsregion ist möglicherweise die Folge der Einschränkung der konformationellen Dynamik durch die Stabilisierung von entfernt lokalisierten Strukturelementen. Die Einschränkung der konformationellen Dynamik kann wiederum entweder durch die Ausbildung der stabilen interhelikalen Schlaufenwechselwirkung im Falle von  $Gsw^{apt}$  oder durch das in  $Gsw^{loop}$  durch  $Mg^{2+}$  stabilisierte Tertiärstrukturelement vermittelt werden. Sofern das interhelikale Tertiärstrukturelement nicht stabil ausgebildet ist, wie beispielsweise für  $Gsw^{loop}$  in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$ , kann diese schwach affine Komplexbildung nicht beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass die Ligand-Bindungsregion unter diesen Bedingungen nicht im gleichen Ausmaß strukturiert ist, und impliziert eine präzise Balance von enthalpischen und entropischen Beiträgen zur Ligandbindung. Basierend auf Fluoreszenzstudien wurde eine durch  $Mg^{2+}$ -vermittelte Strukturierung der Ligand-Bindungsregion auch für die Adenin Riboswitch Aptamerdomäne vorgeschlagen (25).

Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen ergeben somit, dass die erhöhte Flexibilität der konformationellen Dynamik des  $Gsw^{loop}$ -Ensembles durch RNA- $Mg^{2+}$ -Interaktionen kompensiert werden kann, dass deren Einschränkung aber auch essentiell für die Ligand-Bindungsaktivität ist. Die  $Mg^{2+}$ -induzierte Ausbildung einer kompakten Struktur von  $Gsw^{loop}$  scheint spezifisch zu sein, da im Vergleich zu NMR-Spektren der  $Gsw^{apt}$ -RNA sehr ähnliche intramolekulare RNA-Tertiärkontakte beobachtet werden. Zusätzlich dazu konnten keine fehlgefaltete Intermediate oder nicht-natürliche Konformationen mittels NMR-Spektroskopie detektiert werden.

Die Stabilität des interhelikalen Tertiärstrukturelementes ist für die Guanin Riboswitch Aptamerdomäne stark mit deren Ligand-Bindungsaktivität verknüpft. Die funktionale Stabilität wird dabei sowohl für  $Gsw^{loop}$  als auch für  $Gsw^{apt}$  wesentlich durch RNA- $Mg^{2+}$  Interaktionen beeinflusst, wie anhand der temperaturabhängigen Entfaltungstudien gezeigt werden konnte.  $Mg^{2+}$ -Ionen induzieren das Auftreten eines zusätzlichen Entfaltungsüberganges im Falle von  $Gsw^{loop}$  ( $[RNA]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnis  $>1:18$ ), der der hier zusätzlich stabilisierten Tertiärstruktur zugeordnet werden konnte, und ausgeprägte Verschiebungen der Entfaltungsübergänge für beide RNA-Konstrukte zu höheren Temperaturen. Im Falle der  $Gsw^{apt}$ -RNA unterstützen diese Beobachtungen die Ergebnisse einer Strukturanalyse, die unter Anwendung des SHAPE-Verfahrens (*selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*) durchgeführt wurde (40). Diese Untersuchungen identifizierten einen temperaturabhängigen Anstieg der konformationellen Dynamik der Nukleotide in den Schlaufenregionen, für die zusätzlich eine  $Mg^{2+}$ -Abhängigkeit beobachtet wurde.

Die in dieser Arbeit dargestellten temperaturabhängigen Untersuchungen zeigen, dass das RNA-Ensemble im Falle einer bereits ausgebildeten interhelikalen Tertiärstruktur durch die Assoziation von  $Mg^{2+}$  weiter stabilisiert wird, was wahrscheinlich einen höheren Grad der strukturellen Kompaktheit reflektiert. Sobald diese spezifischen RNA-RNA Kontakte fehlen, nimmt der Grad der Kompaktheit des RNA-Ensembles im Ligand-freien Zustand ab und die Barriere der Freien Enthalpie des Überganges wird durch zusätzliche Entropiebeiträge bestimmt.

Zusammengefasst unterstützen die hier dargestellten Untersuchungen die Signifikanz der interhelikalen Tertiärstruktur für die regulatorische Kapazität der Guanin-abhängigen Riboswitch-RNA (22, 24). Eine Destabilisierung dieser Tertiärstruktur führt zu erheblichen Veränderungen der strukturellen und funktionellen Charakteristika des konformationellen RNA-Ensembles. Die Topologie der interhelikalen Tertiärinteraktion und deren konformationelle Dynamik stellen essentielle Faktoren für die Faltung des Riboswitch-RNA Elementes dar. Die Ergebnisse der Untersuchungen belegen, dass eine stabil ausgebildete interhelikale Tertiärinteraktion oder die Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen die konformationelle Dynamik reduziert. Die mögliche Kompensation einer destabilisierten intramolekularen RNA-Tertiärstruktur durch  $Mg^{2+}$ -Ionen belegt die Signifikanz von RNA- $Mg^{2+}$ -Interaktionen für die Strukturausbildung und Funktion der Riboswitch Aptamerdomäne wie bereits für andere RNA-Elemente ermittelt werden konnte (2, 33, 37). Anhand der Mutante  $Gsw^{loop}$  konnte gezeigt werden, dass die konformationelle Dynamik des RNA-Ensembles die Ligand-Bindungsaktivität in wesentlichem Maße beeinflusst.



Obwohl es sich bei der Mutante um eine nicht-natürliche Riboswitch-RNA handelt, kann die detaillierte Analyse der  $Mg^{2+}$ -abhängigen Strukturausbildung im Ligand-freien Zustand und deren Verknüpfung mit den Ligand-Bindungscharakteristika Einblicke darüber liefern, welche strukturellen Beiträge zu der Funktion der Guanin-abhängigen Riboswitch-RNA beitragen. Auf der Basis dieser Untersuchungen kann vermutet werden, dass die Reduzierung der konformationellen Dynamik der Ligand-freien RNA, die durch die konformationelle Einschränkung der helikalen Elemente P2 und P3 erreicht wird, die minimale Voraussetzung darstellt, um eine teilweise Strukturierung der Ligand-Bindungsregion zu induzieren und diese somit für die Ligandbindung der Riboswitch-RNA zu optimieren. Die in die interhelikale Schlaufeninteraktion involvierten Nukleotide könnten dabei möglicherweise evolutionär optimiert worden sein, um die Funktionalität dieses regulatorischen RNA-Elementes zu erhöhen. Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse zeigen, dass  $Mg^{2+}$ -Ionen nicht nur eine durch Mutationen destabilisierte Tertiärinteraktion kompensieren können, sondern auch die bei höheren Temperaturen verstärkte konformationelle Dynamik der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne. Basierend auf diesen Untersuchungen scheint eine durch  $Mg^{2+}$ -Ionen induzierte strukturelle Stabilisierung für die Funktion der Riboswitch-RNA in Temperaturbereichen zellulärer Prozesse essentiell zu sein.

## LITERATUR

1. Batey, R.T., Rambo, R.P., Doudna, J.A. (1999) Tertiary motifs in RNA structure and folding. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **38**, 2326-43.
2. Draper, D.E., Grilley, D., Soto, A.M. (2005) Ions and RNA folding. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **34**, 221-43.
3. Mandal, M., Breaker, R.R. (2004) Gene regulation by riboswitches. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 451-63.
4. Blouin, S., Mulhbachter, J., Penedo, J.C., Lafontaine, D.A. (2009) Riboswitches: ancient and promising genetic regulators. *ChemBiochem*, **10**, 400-16.
5. Serganov, A., Huang, L., Patel, D.J. (2009) Coenzyme recognition and gene regulation by a flavin mononucleotide riboswitch. *Nature*, **458**, 233-7.

6. Kulshina, N., Edwards, T.E., Ferré-D'Amaré, A.R. (2010) Thermodynamic analysis of ligand binding and ligand binding-induced tertiary structure formation by the thiamine pyrophosphate riboswitch. *RNA*, **16**, 186-96.
7. Yamauchi, T., Miyoshi, D., Kubodera, T., Nishimura, A., Nakai, S., Sugimoto, N. (2005) Roles of  $Mg^{2+}$  in TPP-dependent riboswitch. *FEBS Lett.*, **579**, 2583-8.
8. Gilbert, S.D., Stoddard, C.D., Wise, S.J., Batey, R.T. (2006) Thermodynamic and kinetic characterization of ligand binding to the purine riboswitch aptamer domain. *J. Mol. Biol.*, **359**, 754-68.
9. Corbino, K.A., Barrick, J.E., Lim, J., Welz, R., Tucker, B.J., Puskarz, I., Mandal, M., Rudnick, N.D., Breaker, R.R. (2005) Evidence for a second class of S-adenosylmethionine riboswitches and other regulatory RNA motifs in alpha-proteobacteria. *Genome Biol.*, **6**, R70.
10. Epshtein, V., Mironov, A.S., Nudler, E. (2003) The riboswitch-mediated control of sulfur metabolism in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5052-6.
11. Fuchs, R.T., Grundy, F.J., Henkin, T.M. (2006) The S(MK) box is a new SAM-binding RNA for translational regulation of SAM synthetase. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 226-33.
12. McDaniel, B.A., Grundy, F.J., Kurlekar, V.P., Tomsic, J., Henkin, T.M. (2006) Identification of a mutation in the *Bacillus subtilis* S-adenosylmethionine synthetase gene that results in derepression of S-box gene expression. *J. Bacteriol.*, **188**, 3674-81.
13. Poiata, E., Meyer, M.M., Ames, T.D., Breaker, R.R. (2009) A variant riboswitch aptamer class for S-adenosylmethionine common in marine bacteria. *RNA*, **15**, 2046-56.
14. Weinberg, Z., Regulski, E.E., Hammond, M.C., Barrick, J.E., Yao, Z., Ruzzo, W.L., Breaker, R.R. (2008) The aptamer core of SAM-IV riboswitches mimics the ligand-binding site of SAM-I riboswitches. *RNA*, **14**, 822-8.
15. Winkler, W.C., Nahvi, A., Sudarsan, N., Barrick, J.E., Breaker, R.R. (2003) An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine. *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 701-7.
16. Serganov, A. (2009) The long and the short of riboswitches. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **19**, 251-9.
17. Edwards, T.E., Klein, D.J., Ferré-D'Amaré, A.R. (2007) Riboswitches: small-molecule recognition by gene regulatory RNAs. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **17**, 273-9.
18. Baird, N.J., Ferré-D'Amaré, A.R. (2010) Idiosyncratically tuned switching behavior of riboswitch aptamer domains revealed by comparative small-angle X-ray scattering analysis. *RNA*, **16**, 598-609.
19. Blouin, S., Lafontaine, D.A. (2007) A loop loop interaction and a K-turn motif located in the lysine aptamer domain are important for the riboswitch gene regulation control. *RNA*, **13**, 1256-67.
20. Heppell, B., Lafontaine, D.A. (2008) Folding of the SAM aptamer is determined by the formation of a K-turn-dependent pseudoknot. *Biochemistry*, **47**, 1490-9.

21. Mandal, M., Breaker, R.R. (2004) Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 29-35.
22. Batey, R.T., Gilbert, S.D., Montange, R.K. (2004) Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine. *Nature*, **432**, 411-5.
23. Serganov, A., Yuan, Y.R., Pikovskaya, O., Polonskaia, A., Malinina, L., Phan, A.T., Hobartner, C., Micura, R., Breaker, R.R., Patel, D.J. (2004) Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs. *Chem. Biol.*, **11**, 1729-41.
24. Mandal, M., Boese, B., Barrick, J.E., Winkler, W.C., Breaker, R.R. (2003) Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell*, **113**, 577-86.
25. Rieder, R., Lang, K., Graber, D., Micura, R. (2007) Ligand-induced folding of the adenosine deaminase A-riboswitch and implications on riboswitch translational control. *Chembiochem*, **8**, 896-902.
26. Lemay, J.F., Penedo, J.C., Tremblay, R., Lilley, D.M., Lafontaine, D.A. (2006) Folding of the adenine riboswitch. *Chem. Biol.*, **13**, 857-68.
27. Noeske, J., Buck, J., Fürtig, B., Nasiri, H.R., Schwalbe, H., Wöhnert, J. (2007) Interplay of 'induced fit' and preorganization in the ligand induced folding of the aptamer domain of the guanine binding riboswitch. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 572-83.
28. Noeske, J., Schwalbe, H., Wöhnert, J. (2007) Metal-ion binding and metal-ion induced folding of the adenine-sensing riboswitch aptamer domain. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 5262-73.
29. Noeske, J. (2007) Strukturelle Untersuchungen an Metabolit-bindenden Riboswitch-RNAs mittels NMR. Dissertation, J.W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
30. Zucker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3406-15.
31. Dingley, A.J., Grzesiek, S. (1998) Direct observation of hydrogen bonds in nucleic acid base pairs by internucleotide  $^2J_{NN}$  couplings. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 8293-7.
32. Fürtig, B., Richter, C., Wöhnert, J., Schwalbe, H. (2003) NMR spectroscopy of RNA. *Chembiochem*, **4**, 936-62.
33. Draper, D.E. (2004) A guide to ions and RNA structure. *RNA*, **10**, 335-43.
34. Cowan, J.A. (1993) Metallobiochemistry of RNA.  $[Co(NH_3)_6]^{3+}$  as a probe for  $Mg^{2+}$  (aq) binding sites. *J. Inorg. Biochem.*, **49**, 171-5.
35. Buck, J., Fürtig, B., Noeske, J., Wöhnert, J., Schwalbe, H. (2007) Time-resolved NMR methods resolving ligand-induced RNA folding at atomic resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 15699-704.
36. Delfosse, V., Bouchard, P., Bonneau, E., Dagenais, P., Lemay, J.F., Lafontaine, D.A., Legault, P. (2009) Riboswitch structure: an internal residue mimicking the purine ligand. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 2057-68.

37. Pyle, A.M. (2002) Metal ions in the structure and function of RNA. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **7**, 679-90.
38. Sosnick, T.R., Fang, X., Shelton, V.M. (2000) Application of circular dichroism to study RNA folding transitions. *Methods Enzymol.*, **317**, 393-409.
39. Blount, K.F., Breaker, R.R. (2006) Riboswitches as antibacterial drug targets. *Nat. Biotechnol.*, **24**, 1558-64.
40. Stoddard, C.D., Gilbert, S.D., Batey, R.T. (2008) Ligand-dependent folding of the three-way junction in the purine riboswitch. *RNA*, **14**, 675-84.

# KAPITEL 5

EINFLUSS VON COFAKTOREN AUF DIE FALTUNG  
VON GUANIN RIBOSWITCH-RNAS  
(GSW<sup>APT</sup> UND GSW<sup>LOOP</sup>)

## EINLEITUNG

Die Ausbildung funktionaler RNA-Strukturen und deren Faltungsprozesse sind oft abhängig von der jeweiligen RNA-Sequenz und damit der Möglichkeit der Ausbildung spezifischer Strukturelemente (1, 2). Zusätzlich unterstützt die Assoziation von Kationen häufig die Ausbildung kompakter Strukturen (3). RNA-Faltungsprozesse werden dabei wesentlich von den Eigenschaften des konformationellen RNA-Ensembles, welches den jeweiligen Ausgangszustand beschreibt, bestimmt. Die Abhängigkeit der Faltungsprozesse der RNA von den Eigenschaften des konformationellen Ensembles ist ausgeprägter als für Proteine, da Barrieren zwischen unterschiedlichen Konformationen bei gleicher Stabilität hoch sein können (4). Im Falle einer Riboswitch-vermittelten Kontrolle der Genexpression ist die Ligand-induzierte Kinetik des Faltungsprozesses der Aptamerdomäne ein kritischer Prozess im Modell des zu Grunde liegenden Regulationsmechanismus (5-8). Die je nach Ligand-Bindungszustand stabilisierte Struktur der Aptamerdomäne bestimmt dabei im Folgenden die Ausbildung eines 3'-nachgelagerten Strukturelementes und beeinflusst somit die Genexpression (Kapitel 1). Um beispielsweise eine effiziente Regulation der Genexpression auf der Ebene der Transkription zu gewährleisten, müssen die in Abhängigkeit der Ligandkonzentration beeinflusste Strukturierung der Aptamerdomäne und die in Folge induzierte Ausbildung der Expressionsplattform in einem Zeitfenster stattfinden, in dem ein regulatorisches Signal Einfluss auf die Transkription haben kann. Der Prozess der Ligandbindung selbst setzt dabei wiederum eine Ligand-bindungskompetente RNA-Konformation der Aptamerdomäne voraus. Die Geschwindigkeit des Faltungsprozesses der Aptamerdomäne ist somit unter anderem abhängig von der Kinetik der RNA-Faltung in eine Ligand-bindungskompetente RNA-Konformation, der spezifischen Ligandbindung und der dadurch hervorgerufenen Strukturierung bzw. Stabilisierung der RNA-Struktur (Kapitel 1).

Die Architektur des RNA-Ligand Komplexes der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne wird durch zahlreiche Tertiärinteraktionen im Bereich der Ligand-Bindungstasche, aber auch zwischen entfernt lokalisierten Strukturbereichen in Form einer interhelikalen Schlaufeninteraktion definiert (9, 10). Die Ausbildung der interhelikalen Schlaufeninteraktion führt im RNA-Ligand Komplex zu der fast parallelen, kompakt strukturierten Anordnung der Helices P2 und P3. Diese kompakte Anordnung der verschiedenen Tertiärstrukturbereiche führt denkbar zu elektrostatischen Wechselwirkungen des jeweils negativ geladenen Phosphatrückgrats von Nukleotiden der Ligand-Bindungstasche und der beiden Helices und wirft somit die Frage nach

der Bedeutung von Kationen für die zu Grunde liegenden RNA-Faltungsprozesse der Guanin Riboswitch-RNA auf (Kapitel 5, Abschnitt 1).

Der Vergleich von statischen NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne Gsw<sup>apt</sup> und der G37A/C61U-Mutante Gsw<sup>loop</sup> ergab, dass eine stabil ausgebildete interhelikale Schlaufeninteraktion keine essentielle Voraussetzung für die spezifische Ligandbindung darstellt. Die für die Mutante beobachtete konformationelle Dynamik und die infolge veränderten Charakteristika der Ligand-freien RNA-Konformation können durch Mg<sup>2+</sup> kompensiert werden. Die jeweilig vorliegende Mg<sup>2+</sup>-Konzentration bestimmt dabei sowohl die Ligand-Bindungskompetenz der Gsw<sup>loop</sup>-RNA als auch die stabile Strukturierung der interhelikalen Tertiärstruktur (Kapitel 4). Anhand der Unterschiede der konformationellen RNA-Ensembles des jeweils Ligand-freien Zustandes und damit des Ausgangszustandes des spezifischen Ligand-Bindungsprozesses von Gsw<sup>apt</sup> und Gsw<sup>loop</sup> und deren Mg<sup>2+</sup>-Abhängigkeit (Kapitel 3 und Kapitel 4) sollen die zu Grunde liegenden Faltungsprozesse detailliert analysiert werden. Die Möglichkeit, verschiedene strukturelle Prozesse, nämlich die Ausbildung der interhelikalen Tertiärstruktur und die Ligandbindung einschließlich der Ausbildung der Ligand-Bindungstasche, durch die Variation der Mg<sup>2+</sup>-Konzentration unabhängig voneinander induzieren zu können, ermöglichte eine detaillierte Untersuchung der relativen Beiträge zum Faltungsprozess der Gsw<sup>loop</sup>-RNA (Kapitel 5, Abschnitt 2).

Die Variation der strukturellen Eigenschaften des Ausgangszustandes der Guanin Riboswitch-RNAs in An- und Abwesenheit von verschiedenen Cofaktoren soll dabei Aufschlüsse über die Struktur und Population beteiligter RNA-Ensembles und über die Kinetik und die energetischen Barrieren der Ausbildung von beteiligten Strukturen, Intermediaten oder Komplexen geben. Obwohl diese Unterschiede in den Konzentrationsverhältnissen der involvierten Komponenten oder destabilisierende Mutationen *in vivo* wohl nicht signifikant auftreten, kann ihr Einsatz genutzt werden, um RNA-Faltungsprozesse *in vitro* zu beeinflussen und somit Erkenntnisse über mögliche Faltungsmechanismen und deren energetische Barrieren zu erhalten (11).

Die Verwendung der Mischapparatur zur schnellen Injektion einer Reaktionskomponente zu der Probenlösung *in situ* innerhalb des NMR-Spektrometers (Kapitel 2) ermöglichte die individuelle Untersuchung der durch die beiden Cofaktoren Hypoxanthin und Mg<sup>2+</sup> induzierten Faltungsprozesse mittels zeitaufgelöster *real time* NMR-Spektroskopie. Dabei bietet die Verwendung der Mischapparatur zur Initiierung der unterschiedlichen RNA-Faltungsprozesse verschiedene Vorteile gegenüber der Laser-induzierten Freisetzung des Liganden (Kapitel 3).

- i) Die Sensitivität der zeitaufgelösten NMR-Spektren kann im Vergleich zu den Licht-induzierten NMR-Kinetiken durch die größere Bandbreite möglich einsetzbarer RNA-Konzentrationen verbessert werden. Die einsetzbaren RNA-Konzentrationen waren in den mittels Laserbelichtung initiierten NMR-Kinetiken zur Untersuchung der Ligand-induzierten Faltungsprozesse von Gsw<sup>apt</sup> durch die Wasserlöslichkeit und die Freisetzungseffizienz der photogeschützten Verbindung Hyp\*DMNPE limitiert (12).
- ii) Die Initiierung selbst, d. h. die experimentell basierte Reaktionstotzeit der Kinetik, ist mit ~10 ms wesentlich kürzer als die der Laser-induzierten Aktivierung des photogeschützten Hypoxanthin, für die eine Laserbelichtung von ~1.5 s für eine maximale Freisetzung des Liganden optimiert wurde (Kapitel 3).
- iii) Es besteht die Möglichkeit, sowohl Hypoxanthin- als auch Mg<sup>2+</sup>-induzierte Prozesse separat zu analysieren oder den RNA-Faltungsprozess infolge der gleichzeitigen Initiierung durch beide Cofaktoren zu beobachten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass für die Mg<sup>2+</sup>-abhängige Ausbildung des Gsw<sup>loop</sup>-Ligand Komplexes durch die Injektion des Mg<sup>2+</sup>-Chelators DM-Nitrophen auch zeitaufgelöste Entfaltungsuntersuchungen der entsprechenden Tertiärstrukturen mittels *real time* NMR-Methoden möglich werden (Kapitel 5, Abschnitt 3).



## MATERIAL UND METHODEN

### RNA-Konstrukte

Die RNA-Konstrukte Gsw<sup>apt</sup> und Gsw<sup>loop</sup> (G37A/C61U-Mutante) entsprechen den in Kapitel 3 und Kapitel 4 beschriebenen RNA-Sequenzen und -Sekundärstrukturen der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne. Die *in vitro* Synthese und anschließende Aufreinigung der Riboswitch-RNA-Konstrukte erfolgte wie in Kapitel 2 beschrieben.

### Zeitaufgelöste NMR-Experimente

Die Initiierung der zeitaufgelösten NMR-Experimente zur Untersuchung der Cofaktor-abhängigen Faltungsprozesse von Gsw<sup>apt</sup> und Gsw<sup>loop</sup> erfolgte *in situ* unter Verwendung einer Mischapparatur (Kapitel 2). Das Volumen der Probenlösung betrug dabei jeweils ~300 µl und wurde in einem Shigemi-Probenröhrchen vorgelegt. Die Injektionslösung entsprach einem Volumen von ~40 µl. Die Lösungen setzten sich jeweils aus einem Verhältnis von H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O ~9:1 in NMR-Puffer zusammen. Die Kinetiken wurden an einem NMR-Spektrometer AV700 MHz der Firma Bruker bei einer Temperatur von 283 K durchgeführt. Untersuchungen zur RNA-Ligand Komplexbildung entsprachen im finalen Zustand jeweils einer äquimolaren Zusammensetzung von RNA und Hypoxanthin. Die Angaben zur jeweils eingesetzten Mg<sup>2+</sup>-Konzentration in Äquivalenten (eq) beziehen sich entsprechend auf die Konzentration der RNA bzw. des RNA-Ligand Komplexes.

Die zeitaufgelösten NMR-Experimente zur Untersuchung der Cofaktor-Abhängigkeit des Ligand-induzierten Faltungsprozesses von Gsw<sup>apt</sup> (Abschnitt 1) wurden mit nicht-isotopenmarkierter RNA durchgeführt und entsprechend mittels der in Kapitel 2 beschriebenen NMR-spektroskopischen Detektionsmethode aufgenommen.

Die zeitaufgelösten NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Faltungsprozesse der Gsw<sup>loop</sup>-RNA (Abschnitt 2) entsprachen der in Kapitel 2 beschriebenen Methode für selektiv isotopenmarkierte RNA-Konstrukte (Abbildung 2.2). Die RNA wurde hierfür jeweils selektiv <sup>15</sup>N-Uridin isotopenmarkiert eingesetzt. Die Analyse der Daten erfolgte analog der in Kapitel 3 beschriebenen Vorgehensweise. Die Analyse von Geschwindigkeitskonstanten individueller Signale erfolgte bei einer RNA-Konzentration von [Gsw<sup>loop</sup>] ~670 µM und einem [RNA]:[Ligand]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnis von ~1:1:8 mit einer Zeitauflösung von ~3.4 s/Datenpunkt. Für die Analyse der Mg<sup>2+</sup>-Abhängigkeit des Ligand-induzierten Faltungsprozesses von Gsw<sup>loop</sup>

wurde in den individuellen Kinetiken für alle untersuchten [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnisse jeweils eine allgemeine Geschwindigkeitskonstante ( $k_{\text{gesamt}}$  [s<sup>-1</sup>]) bestimmt. Diese allgemeine Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{gesamt}}$  entspricht dabei der Summe der jeweils normierten Integrale der ermittelten zeitlichen Verläufe individueller Signale in den entsprechenden Kinetiken.

Die Entfaltung der Tertiärstrukturen des Gsw<sup>loop</sup>-Ligand Komplexes (Abschnitt 3) wurde durch die Zugabe des Mg<sup>2+</sup>-Chelators DM-Nitrophen erreicht (DM-Nitrophen wurde von Kai Schlepckow (AK Schwalbe) zur Verfügung gestellt). Die entsprechenden Proben der statischen und zeitaufgelösten NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden hierfür unter Lichtausschluss vorbereitet und aufgenommen.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 1) Cofaktor-abhängige Konformation und Faltung der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne Gsw<sup>apt</sup>

Für verschiedene RNAs wurde bereits gezeigt, dass die zu Grunde liegenden RNA-Strukturen und -Faltungsprozesse von den jeweilig vorliegenden Kationen bzw. deren chemischen und physikalischen Eigenschaften, wie beispielsweise Größe, Ladung, Geometrie, Polarisierbarkeit, Hydratisierungseigenschaften oder Flexibilität, und der sich daraus ergebenden Unterschiede der Interaktionen mit der RNA abhängig sind (13-18). Neben Mg<sup>2+</sup>-Ionen konnte auch für weitere Kationen, wie beispielsweise [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup> oder verschiedene Polyamine, ein Einfluss auf die Stabilisierung bzw. den Grad der Kompaktheit des jeweiligen konformationellen RNA-Ensembles und in Folge auf die Thermodynamik und Kinetik des zu Grunde liegenden RNA-Faltungsprozesses beobachtet werden.

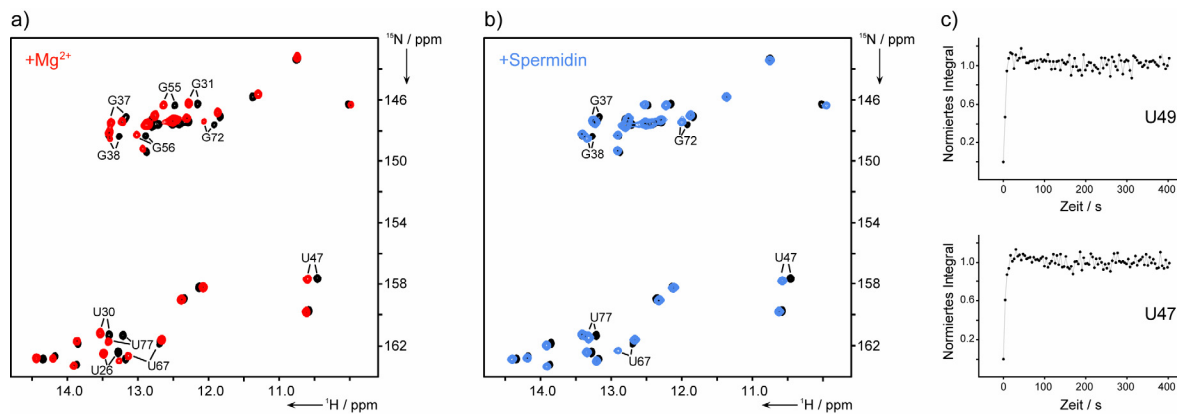
Für die strukturellen und zeitaufgelösten NMR-Untersuchungen der Cofaktor-Abhängigkeit der RNA-Konformationen und der Ligand-induzierten Faltungsprozesse der Gsw<sup>apt</sup>-RNA wurden die Kationen Mg<sup>2+</sup> und das ebenfalls natürlich vorkommende Polyamin Spermidin gewählt. Spermidin kann als Kation mit der RNA interagieren und RNA-Strukturen stabilisieren (19, 20). Es unterscheidet sich von Mg<sup>2+</sup>-Ionen durch die erhöhte Ladung (Spermidin<sup>3+</sup>), die Größe und die Geometrie und kann somit denkbar auch die Eigenschaften des RNA-Ensembles oder des Faltungsmechanismus verändern (21).

In NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne Gsw<sup>apt</sup> konnte die Ausbildung der interhelikalen Schlaufeninteraktion bereits in Abwesenheit des Liganden detektiert werden (22). Infolge der Zugabe von Mg<sup>2+</sup> wurden weder für die freie Gsw<sup>apt</sup>-RNA noch für den spezifischen RNA-Ligand Komplex zusätzliche Iminoprotonensignale beobachtet. Basierend auf chemischen Verschiebungsänderungen (CSPs) dieser NMR-Signale wurden jedoch RNA-Mg<sup>2+</sup>-Interaktionen ermittelt. Durch einen Vergleich mit der Kristallstruktur (9) konnten diese CSPs spezifischen Mg<sup>2+</sup>-Bindungsstellen zugeordnet werden (22). Iminoprotonenresonanzen des Gsw<sup>apt</sup>-Hypoxanthin Komplexes, die infolge der Zugabe von Mg<sup>2+</sup> signifikante chemische Verschiebungsänderungen aufweisen (22), sind in Abbildung 5.1a dargestellt. Zusätzlich zu diesen Ergebnissen der statischen NMR-spektroskopischen Untersuchungen von Noeske et al. (22) ergab die Analyse der CD-Schmelzkurven sowohl für die freie Gsw<sup>apt</sup>-RNA als auch für den RNA-Ligand Komplex eine

signifikante Stabilisierung vor allem der Tertiärstrukturelemente in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> (Kapitel 4).

Im Falle einer Zugabe von Spermidin zum Gsw<sup>apt</sup>-Hypoxanthin Komplex konnten ebenfalls NMR-Spektren mit Iminoprotonensignalen homogener Linienbreite beobachtet werden (Abbildung 5.1b). Die Spermidin-Titration induzierte chemische Verschiebungsänderungen verschiedener Iminoprotonenresonanzen, wohingegen analog der Situation in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> auch hier im <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC Spektrum keine zusätzlichen Signale detektiert werden konnten.

Basierend auf den Iminoprotonen-Reportersignalen werden im Folgenden die Effekte der Kationen Mg<sup>2+</sup> und Spermidin<sup>3+</sup> auf die spektralen Eigenschaften des Gsw<sup>apt</sup>-Hypoxanthin Komplexes vergleichend analysiert. Die Iminoprotonenresonanzen G37 und G38 entsprechen Nukleotiden der Schlaufenregion L2 und sind in die interhelikale Schlaufenwechselwirkung involviert. Das Nukleotid U67 gehört der abschließenden Basenpaarungsinteraktion von Helix P3 an und ist somit räumlich entsprechend nahe dem interhelikalen Tertiärstrukturelement angeordnet (Abbildung 1.4). Die spektralen Veränderungen dieser Signale infolge der Mg<sup>2+</sup>-Zugabe wurden als Vorliegen einer Mg<sup>2+</sup>-Bindungsstelle interpretiert, die zu einer Stabilisierung des interhelikalen Tertiärstrukturelementes führt (22). Im Falle der Zugabe von Spermidin konnten für diese Signale (G37, G38 und U67) ebenfalls signifikante chemische Verschiebungsänderungen beobachtet werden. Diese Beobachtung impliziert somit, dass auch das Kation Spermidin<sup>3+</sup> die interhelikalen Tertiärstrukturinteraktionen stabilisiert. Die für den Gsw<sup>apt</sup>-Hypoxanthin Komplex identifizierten Mg<sup>2+</sup>-abhängigen CSPs der entsprechenden Iminoprotonensignale in der Ligand-Bindungsregion (Nukleotid U47) und in Helix P1 (Nukleotid U77) konnten auch in Gegenwart von Spermidin beobachtet werden. Im Gegensatz zu den durch Mg<sup>2+</sup>-induzierten spektralen Effekten wurde in Gegenwart von Spermidin allerdings weiterhin nur für das Iminoprotonensignal G72 eine signifikante chemische Verschiebungsänderung beobachtet. Die Iminoprotonensignale der Nukleotide U26, U30, G31, G55 und G56, die alle Helix P2 und Helix P3 zugeordnet werden können und in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> ausgeprägte CSPs aufweisen, zeigen im Vergleich der <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC Spektren in An- und Abwesenheit von Spermidin keine signifikanten spektralen Veränderungen (Abbildung 5.1).



**Abbildung 5.1:** Cofaktor-abhängige Konformation des Gsw<sup>apt</sup>-Hypoxanthin Komplexes; Überlagerung der <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC Spektren von Gsw<sup>apt</sup>-Hypoxanthin (ohne weitere Cofaktoren, schwarz) und Gsw<sup>apt</sup>-Hypoxanthin ([RNA] ~0.15 mM) in Gegenwart von **a)** 5 mM Mg<sup>2+</sup> (rot) oder **b)** 5 mM Spermidin (blau); Signale, die infolge der Mg<sup>2+</sup>- bzw. Spermidin-Zugabe signifikante chemische Verschiebungsänderungen zeigen, sind jeweils annotiert; **c)** Zeitabhängiger Verlauf exemplarischer Iminoprotonensignale (U49 und U47) infolge der Ligand-induzierten Faltung von Gsw<sup>apt</sup> in Gegenwart von Spermidin ([RNA] und [Hypoxanthin] jeweils ~0.3 mM, [Spermidin] ~5 mM).

Die Analyse der CD-Schmelzkurven der Gsw<sup>apt</sup>-RNA zeigte, dass die beiden beobachteten thermischen Entfaltungsübergänge der RNA in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> zu höheren Temperaturen verschoben werden (Kapitel 4). Dabei ist der durch Mg<sup>2+</sup> induzierte stabilisierende Effekt auf den ersten Entfaltungsübergang, der als indikativ für die Entfaltung der jeweiligen Tertiärstrukturelemente identifiziert werden konnte, mit Temperaturunterschieden von  $\Delta T_{M1} \sim 45.3\text{-}47.6^\circ\text{C}$  wesentlich stärker ausgeprägt als auf den Entfaltungsübergang bei höheren Temperaturen ( $\Delta T_{M2} \sim 10.7\text{-}12.1^\circ\text{C}$ ). Analog der Mg<sup>2+</sup>-Zugabe konnte auch in Gegenwart von Spermidin eine Verschiebung der beiden Entfaltungsübergänge der Gsw<sup>apt</sup>-RNA zu höheren Temperaturen beobachtet werden. Dabei sind die durch Spermidin induzierten Temperaturunterschiede von  $\Delta T_{M1} \sim 48.5^\circ\text{C}$  und  $\Delta T_{M2} \sim 15.6^\circ\text{C}$  ([Gsw<sup>apt</sup>] ~15  $\mu\text{M}$ , [Spermidin] ~5 mM; Entfaltungsübergänge: ~69.1°C und ~83.8 °C) mit der in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> beobachteten Stabilisierung vergleichbar.

Der Hypoxanthin-induzierte RNA-Faltungsprozess wurde für Gsw<sup>apt</sup> in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> oder Spermidin mittels zeitaufgelöster *real time* NMR-Methoden untersucht. Die Gegenwart des zusätzlichen Cofaktors führte sowohl im Falle von Mg<sup>2+</sup> als auch von Spermidin zu einer sehr schnellen Ligandbindung bzw. RNA-Faltung (Abbildung 5.1c). Bereits innerhalb der ersten 3-4 zeitlich aufeinander folgenden 1D NMR-Spektren der Kinetik (~6-10 s) nach der Initiierung der

Reaktion weisen die charakteristischen Signale des RNA-Ligand Komplexes maximale Intensität auf. Aufgrund dessen konnten die dem Prozess jeweils zu Grunde liegenden Geschwindigkeitskonstanten nicht zuverlässig analysiert werden. Ferner konnte keine Aussage über mögliche Unterschiede der RNA-Faltungsprozesse in Bezug auf die durch variierende chemische und physikalische Eigenschaften der Kationen  $Mg^{2+}$  oder Spermidin induzierten Effekte getroffen werden.

Zusammenfassend sind die anhand der Iminoprotonen-Reportersignale detektierten spektralen Veränderungen der RNA durch die beiden Kationen,  $Mg^{2+}$  und Spermidin<sup>3+</sup>, nicht in allen strukturellen Bereichen identisch. Allerdings zeigte sowohl die Analyse der chemischen Verschiebungsänderungen für Nukleotide der interhelikalen Schlaufeninteraktion als auch der Vergleich der jeweiligen CD-Schmelzkurven vergleichbare durch die beiden Kationen induzierte Effekte. Die erhöhte Stabilität kann möglicherweise auf kompakter strukturierte RNA-Ensembles zurückgeführt werden, deren strukturelle Kompaktheit durch die Assoziation der Kationen und damit die Kompensation negativer elektrostatischer Effekte hervorgerufen wird. Dies könnte zum einen die kompakte Anordnung der Helices einschließen, als auch die Nukleotide der Ligand-Bindungsregion der RNA. Infolge dieser veränderten Eigenschaften der konformationellen RNA-Ensembles wird auch der RNA-Faltungsprozess beeinflusst, der auf einer schnellen Zeitskala stattfindet (siehe Abschnitt 'Zusammenfassende Diskussion').

## 2) Cofaktor-abhängige Faltung der G37A/C61U-Mutante Gsw<sup>loop</sup>

Die spezifische Ligandbindung der G37A/C61U-Mutante Gsw<sup>loop</sup> ist im Gegensatz zur Guanin Riboswitch Aptamerdomäne Gsw<sup>apt</sup> zusätzlich abhängig von  $Mg^{2+}$ -Ionen (22). Somit besteht für die Ligandbindungs- bzw. RNA-Faltungsprozesse der Gsw<sup>loop</sup>-RNA eine Abhängigkeit von zwei Cofaktoren, d. h. von Hypoxanthin und  $Mg^{2+}$ . Basierend auf statischen NMR-spektroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von  $Mg^{2+}$ -Ionen zu der Ausbildung Ligand-bindungskompetenter RNA-Ensembles führt. Deren Charakteristika sind dabei wesentlich vom jeweilig vorliegenden [RNA]:[ $Mg^{2+}$ ]-Verhältnis abhängig (Kapitel 4).

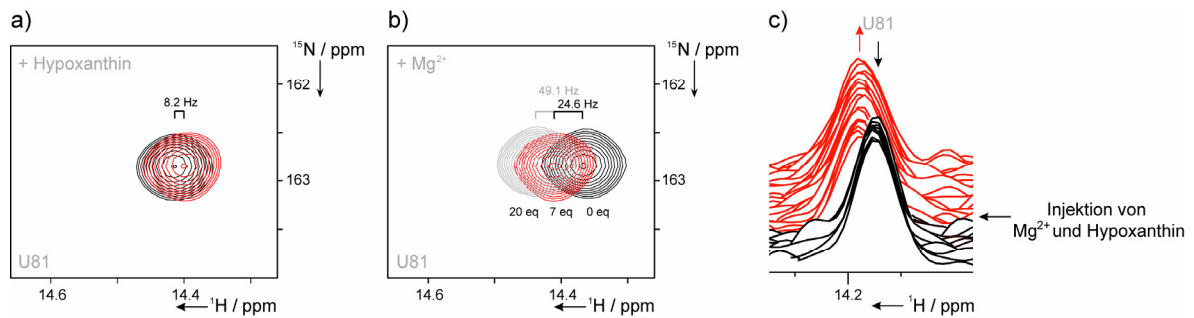
Die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse zeitaufgelöster NMR-Untersuchungen analysieren die Beiträge der durch  $Mg^{2+}$  und Hypoxanthin induzierten Faltungsprozesse zur Ausbildung der interhelikalen Tertiärstruktur der Ligand-freien Gsw<sup>loop</sup>-RNA bzw. zur Ausbildung des Gsw<sup>loop</sup>-Ligand Komplexes. Im Vergleich mit strukturellen und kinetischen Untersuchungen Gsw<sup>apt</sup>-RNA sollen Informationen hinsichtlich der Frage erhalten werden, wie die Charakteristika der

freien RNA-Konformationen und deren Mg<sup>2+</sup>-Abhängigkeit den spezifischen Ligand-induzierten Faltungsprozess der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne beeinflussen.

### **Ausbildung Ligand-bindungskompetenter RNA-Konformationen**

In Abbildung 5.2 sind am Beispiel des Iminoprotonensignals des Nukleotids U81 Unterschiede des jeweiligen Einflusses der beiden Cofaktoren, Hypoxanthin und Mg<sup>2+</sup>, auf die spektralen Eigenschaften der Gsw<sup>loop</sup>-RNA gezeigt. Das Nukleotid U81 ist in Helix P1 lokalisiert und entspricht für die Gsw<sup>apt</sup>-RNA einem Signal, dessen spektrale Eigenschaften unbeeinflusst vom Ligand-induzierten Faltungsprozess (in Abwesenheit von Mg<sup>2+</sup>) bleiben (Kapitel 3). Auch für Gsw<sup>loop</sup> zeigt die Iminoprotonenresonanz des Nukleotids U81 (bei einem [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnis von ~1:7) infolge der Zugabe von Hypoxanthin nur eine geringe chemische Verschiebungsänderung ( $\Delta\delta$  [Hz]) von  $\Delta\delta \sim 8.2$  Hz (Abbildung 5.2a). Im Gegensatz dazu wurden signifikante chemische Verschiebungsänderungen dieses Signals in Abhängigkeit der Mg<sup>2+</sup>-Konzentration beobachtet. Während bei einem [Gsw<sup>loop</sup>]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnis von ~1:7 eine chemische Verschiebungsänderung von  $\Delta\delta_{(0.7 \text{ eq})} \sim 24.6$  Hz infolge der Mg<sup>2+</sup>-Zugabe ermittelt wurde, konnte bei einem [Gsw<sup>loop</sup>]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnis von ~1:20 sogar eine chemische Verschiebungsänderung von  $\Delta\delta_{(0.20 \text{ eq})} \sim 49.1$  Hz im Vergleich zu der freien Gsw<sup>loop</sup>-RNA beobachtet werden (Abbildung 5.2b). Diese Beobachtungen bestätigten auch für geringere Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen, bei denen keine stabil ausgebildete Tertiärstruktur, dagegen aber Ligand-Bindungskompetenz der Gsw<sup>loop</sup>-RNA vorliegt (Kapitel 4), einen signifikanten Einfluss von Mg<sup>2+</sup>-Ionen auf die Konformation der freien RNA in diesem helikalen Strukturbereich.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Konformationsänderung in dem strukturellen Bereich des Nukleotids U81 während des durch die beiden Cofaktoren-induzierten RNA-Faltungsprozesses der Ausbildung einer Ligand-bindungskompetenten RNA-Konformation zugeschrieben, und ermöglichte unter dieser Annahme eine näherungsweise von der Ligandbindung unabhängige Analyse.



**Abbildung 5.2:** Einfluss der Cofaktoren Hypoxanthin und  $Mg^{2+}$  auf die Konformation und Faltung von  $Gsw^{loop}$ ; das Nukleotid U81 in Helix P1 zeigt **a)** nur eine geringe Änderung der chemischen Verschiebung ( $\Delta\delta \sim 8.2$  Hz) infolge der Zugabe von Hypoxanthin (Überlagerung des entsprechenden spektralen Bereichs der  $^1H, ^{15}N$ -HSQC Spektren von  $Gsw^{loop}$  bei einem  $[RNA]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnis von  $\sim 1:7$  in An- und Abwesenheit von Hypoxanthin), während **b)** die Zugabe von  $Mg^{2+}$  signifikante chemische Verschiebungsänderungen induziert (Überlagerung des entsprechenden spektralen Bereichs der  $^1H, ^{15}N$ -HSQC Spektren von  $Gsw^{loop}$  bei verschiedenen  $[RNA]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnissen mit  $\Delta\delta_{(0-7\text{ eq})} \sim 24.6$  Hz und  $\Delta\delta_{(0-20\text{ eq})} \sim 49.1$  Hz); **c)** Zeitlich aufeinander folgende 1D NMR-Spektren des spektralen Bereichs des Iminoprotonensignals U81 während der Kinetik der durch  $Mg^{2+}$  und Hypoxanthin initiierten Komplexbildung ( $[Gsw^{loop}]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnis nach der Injektion  $\sim 1:11$ ). Die 1D NMR-Spektren vor der Injektion sind in schwarz hervorgehoben, die 1D NMR-Spektren nach der Mischung sind rot gekennzeichnet.

Die Kinetik des  $Mg^{2+}$ -induzierten RNA-Faltungsprozesses wurde unter Verwendung der Mischapparatur (Kapitel 2) NMR-spektroskopisch untersucht. Abbildung 5.2c zeigt die zeitlich aufeinander folgenden 1D NMR-Spektren für das Iminoprotonensignal U81 der  $Gsw^{loop}$ -RNA während der Kinetik der RNA-Ligand Komplexbildung, die durch die Injektion von Hypoxanthin und  $Mg^{2+}$  initiiert wurde. Eine Geschwindigkeitskonstante des zu Grunde liegenden Prozesses konnte mittels zeitaufgelöster *real time* NMR-Spektroskopie nicht bestimmt werden, da das Signal des Nukleotids U81, das indikativ für die RNA-Konformation im gebundenen Zustand ist, bereits nach den ersten 2-3 zeitlich aufeinander folgenden 1D NMR-Spektren nach Initiierung der Reaktion maximale Intensität aufwies. Unter der Annahme, dass die zu Grunde liegende Konformationsänderung dieses strukturellen Bereiches dem  $Mg^{2+}$ -induzierten Prozess zuzuschreiben ist, konnte somit gezeigt werden, dass die  $Mg^{2+}$ -induzierte RNA-Faltung hier nach einer Zeitspanne von  $\sim 4-8$  s bereits vollständig abgeschlossen ist.

Die Beobachtung von schnellen  $Mg^{2+}$ -induzierten RNA-Faltungsprozessen ist im Einklang mit Untersuchungen verschiedener RNAs (23). Für das *Tetrahymena* Ribozym konnten beispielsweise verschiedene sehr schnelle,  $Mg^{2+}$ -induzierte Prozesse der RNA-Faltung auf einer Zeitskala von



Millisekunden beobachtet werden, die als Intermediate mit höherem Grad an struktureller Kompaktheit und transient ausgebildeten nativen Tertiärkontakten interpretiert wurden (24-27). Im Falle der Gsw<sup>loop</sup>-RNA könnten diese schnellen Prozesse möglicherweise entsprechend einer Mg<sup>2+</sup>-induzierten Strukturierung des konformationellen RNA-Ensembles hin zu funktionalen Zuständen interpretiert werden. Dabei sind allerdings in Abhängigkeit des [Gsw<sup>loop</sup>]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnisses nur bei hohen Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen stabil ausgebildete native Tertiärkontakte NMR-spektroskopisch detektierbar. In anderen Worten, dieser schnelle, Mg<sup>2+</sup>-induzierte RNA-Faltungsprozess ist nicht essentiell abhängig von der Ausbildung stabiler Tertiärkontakte, induziert aber bereits bei geringen Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen die Ligand-Bindungskompetenz der RNA. Mögliche Unterschiede der Geschwindigkeitskonstanten dieses schnellen Mg<sup>2+</sup>-induzierten Faltungsprozesses in Abhängigkeit variierender Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen können nicht ausgeschlossen werden. Diese konnten allerdings aufgrund der Zeitskala des Prozesses in den zeitaufgelösten NMR-spektroskopischen Untersuchungen nicht differenziert werden.

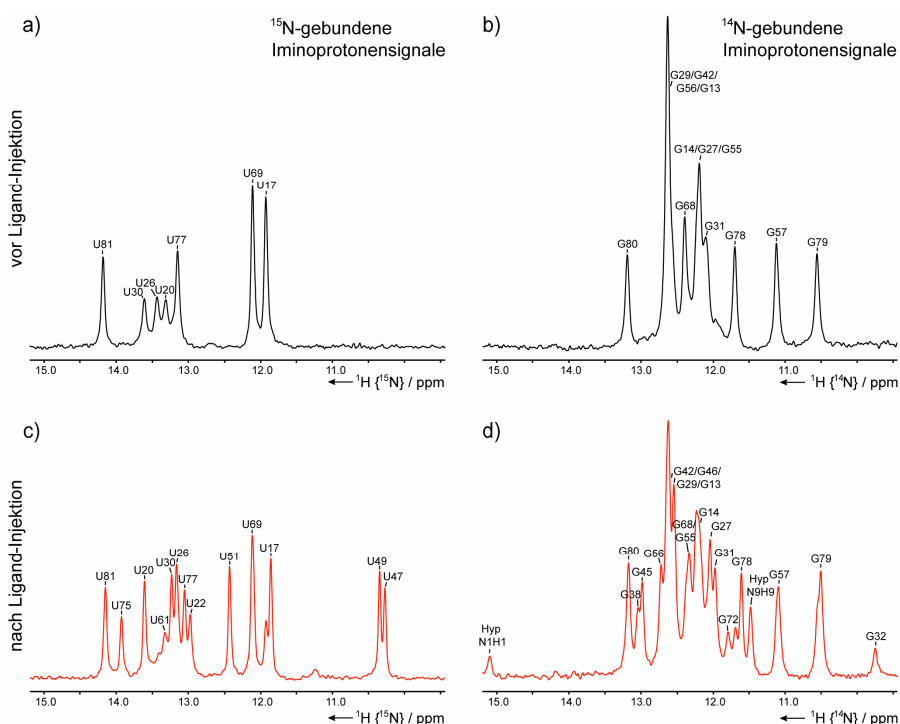
### **Einfluss des interhelikalen Tertiärstrukturelementes auf den spezifischen Faltungsprozess der RNA-Ligand Komplexbildung**

Die Konformationen der Riboswitch-RNAs Gsw<sup>apt</sup> und Gsw<sup>loop</sup> unterscheiden sich im Ligand-freien Zustand im Wesentlichen durch den Grad der Ausbildung des interhelikalen Tertiärstrukturelementes, der konformationellen Dynamik des jeweiligen RNA-Ensembles und deren Mg<sup>2+</sup>-Abhängigkeit (Kapitel 4). Dabei bestehen für die Eigenschaften des konformationellen RNA-Ensembles der Gsw<sup>loop</sup>-RNA durch die Veränderung der entsprechenden Mg<sup>2+</sup>-Konzentration größere Variationsmöglichkeiten der RNA-Charakteristika. Um den Einfluss der strukturellen und dynamischen Eigenschaften des RNA-Ensembles im Ligand-freien Zustand auf die Kinetik des Ligand-Bindungsprozesses zu untersuchen, wurden zeitaufgelöste NMR-Experimente des Faltungsprozesses der Gsw<sup>loop</sup>-RNA in Gegenwart verschiedener Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen durchgeführt.

Der Fokus lag hierbei zunächst auf kinetischen Untersuchungen des RNA-Faltungsprozesses bei einem [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnis, für das die RNA Ligand-bindungskompetent, das interhelikale Tertiärstrukturelement jedoch nicht stabil ausgebildet ist ([RNA]:[Mg<sup>2+</sup>] <1:18, Kapitel 4). Die zeitaufgelösten NMR-Untersuchungen wurden daher unter Verwendung der Mischapparatur (Kapitel 2) bei einem [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnis von ~1:8 durchgeführt. Für den schnellen Mg<sup>2+</sup>-induzierten RNA-Faltungsprozess war, wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben, keine detaillierte kinetische Analyse möglich. Aus diesem Grund wurde die RNA in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> in der Probenlösung vorgelegt und der Ligand Hypoxanthin zur

Initiierung der Gsw<sup>loop</sup>-Ligand Komplexbildung dann injiziert, um eine Überlagerung der durch die beiden Cofaktoren induzierten kinetischen Prozesse zu vermeiden.

Um eine kinetische Analyse individueller Signale zu ermöglichen, wurde für Gsw<sup>loop</sup>, analog der Vorgehensweise zur Untersuchung der Ligand-induzierten Kinetik der Gsw<sup>apt</sup>-RNA (Kapitel 3), eine Kombination aus selektiver Isotopenmarkierung der RNA und NMR-Filtermethoden angewandt (Kapitel 2). Der Vergleich der NMR-Spektren der Gsw<sup>loop</sup>-RNA vor und nach der Injektion des Liganden Hypoxanthin zeigte die erwarteten Unterschiede, welche die RNA-Ligand Komplexbildung charakterisieren (Abbildung 5.3). Ferner waren die NMR-Spektren nach der Injektion identisch mit statischen NMR-Untersuchungen des RNA-Ligand Komplexes (Kapitel 4) und bestätigten somit die erfolgreiche Anwendung der Mischapparatur in den hier durchgeführten zeitaufgelösten NMR-Untersuchungen.



**Abbildung 5.3:** Iminoprotonen NMR-Spektren der <sup>15</sup>N-Uridin isotopenmarkierten G37A/C61U-Mutante Gsw<sup>loop</sup> ([RNA]:[Mg<sup>2+</sup>] ~1:8, 700 MHz, 283 K) mit jeweils annotierter Resonanzzuordnung (Kapitel 4); **a)** <sup>15</sup>N-edierte Spektrum zeigt die Uridin-Signale und **b)** <sup>15</sup>N-gefiltertes Spektrum zeigt die Guanosin-Signale von Gsw<sup>loop</sup> jeweils vor der Injektion des Liganden; **c)** <sup>15</sup>N-edierte Spektrum zeigt die Uridin-Signale und **d)** <sup>15</sup>N-gefiltertes Spektrum zeigt die Guanosin-Signale des Gsw<sup>loop</sup>-Hypoxanthin Komplexes jeweils nach dem Ligand-induzierten RNA-Faltungsprozess.

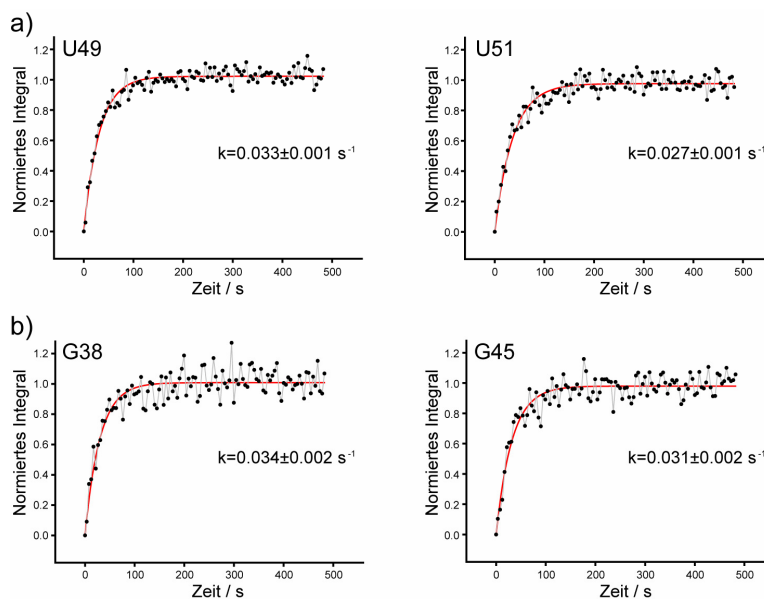
Nukleotid	$k$ [s <sup>-1</sup> ]	$t_{1/2}$ [s]
U17	0.029 ± 0.002	24.0 ± 1.4
U30	0.028 ± 0.002	24.5 ± 1.5
G31	0.031 ± 0.002	22.7 ± 1.6
G38	0.034 ± 0.002	20.6 ± 1.4
G45	0.031 ± 0.002	22.5 ± 1.2
U47	0.032 ± 0.001	21.7 ± 0.9
U49	0.033 ± 0.001	21.1 ± 0.8
U51	0.027 ± 0.001	25.5 ± 1.1
U75	0.027 ± 0.002	25.6 ± 1.6
U77	0.029 ± 0.002	23.8 ± 1.5
G78	0.035 ± 0.003	20.1 ± 1.5
Hypoxanthin (N9-H9)	0.028 ± 0.002	24.9 ± 1.9

**Tabelle 5.1:** Kinetische Daten des Hypoxanthin-induzierten Faltungsprozesses der Gsw<sup>loop</sup>-RNA ([RNA]:[Ligand]:[Mg<sup>2+</sup>] ~1:1:8).

Der Ligand-induzierte Faltungsprozess der Gsw<sup>loop</sup>-RNA konnte anhand von 12 spektral aufgelösten Iminoprotonen-Reportersignalen analysiert werden (Tabelle 5.1). Darunter waren sowohl Reportersignale der Ligand-Bindungsregion der RNA und des Liganden selbst als auch des Tertiärstrukturbereiches der interhelikalen Schlaufeninteraktion (Abbildungen 5.3 und 5.4). Die kinetische Analyse des Ligand-induzierten Faltungsprozesses der Gsw<sup>loop</sup>-RNA ([RNA]:[Ligand]:[Mg<sup>2+</sup>] ~1:1:8) ergab keine signifikanten Unterschiede individueller Signalaufbauzeiten hinsichtlich ihrer Zuordnung zu Nukleotiden verschiedener struktureller Bereiche der RNA (Tabelle 5.1, Abbildung 5.4). Der kinetische Verlauf der Iminoprotonensignale konnte jeweils mittels einer monoexponentiellen Funktion analysiert werden. Die ermittelten Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$  [s]) des Faltungsprozesses lagen unter diesen experimentellen Bedingungen für alle Iminoprotonensignale in einem Bereich von ~20.1-25.6 s. Damit konnte die für die Guanin Riboswitch Aptamerdomäne Gsw<sup>apt</sup> beobachtete Differenzierung der kinetischen Prozesse (in Abwesenheit von Mg<sup>2+</sup>, Kapitel 3), d. h. einerseits der Ligandbindung und Strukturierung der Ligand-Bindungstasche und andererseits der Umorientierung bzw. kompakteren Anordnung der Helices einschließlich des interhelikalen Tertiärstrukturelementes, für Gsw<sup>loop</sup> nicht beobachtet werden (Abbildung 5.4).

Die Destabilisierung der interhelikalen Tertiärstruktur bei diesem [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnis und damit die veränderten strukturellen Eigenschaften des RNA-Ensembles der Ligand-freien

Konformation führen demnach zu signifikanten Veränderungen des Ligand-induzierten RNA-Faltungsprozesses. Zum einen findet der RNA-Faltungsprozess, im Gegensatz zur Situation der Gsw<sup>apt</sup>-RNA (Kapitel 5, Abschnitt 1), auch in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> in einem zeitlichen Bereich statt, der mittels *real time* NMR-Methoden aufgelöst und analysiert werden kann. Zum anderen ergibt die Analyse der kinetischen NMR-Untersuchungen vergleichbare Signalaufbauzeiten für Nukleotide der verschiedenen strukturellen Bereiche.



**Abbildung 5.4:** Zeitlicher Verlauf exemplarischer Iminoprotonensignale während des Ligand-induzierten Faltungsprozesses der Gsw<sup>loop</sup>-RNA ([RNA]:[Ligand]:[Mg<sup>2+</sup>] ~1:1:8, 700 MHz, 283 K); Normierte Integrale **a)** von Signalen der Nukleotide U49 und U51 der Ligand-Bindungsregion und **b)** von Signalen der Nukleotide G38 und G45 der Schlaufenregion P2 bzw. der Helix P2, die indikativ für die Ausbildung der interhelikalen Tertiärstruktur und die kompakte Anordnung der Helices sind.

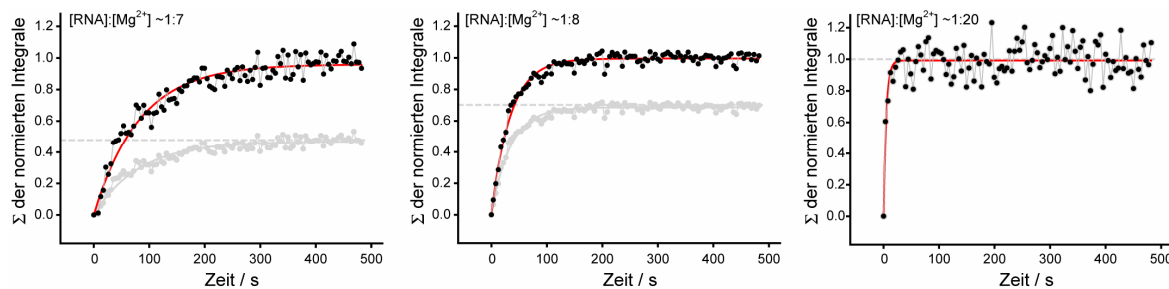
Da die interhelikale Tertiärstruktur in der Ligand-freien Konformation von Gsw<sup>loop</sup> unter diesen experimentellen Bedingungen ([RNA]:[Mg<sup>2+</sup>] ~1:8) im Gegensatz zur Gsw<sup>apt</sup>-RNA nicht stabil ausgebildet ist, unterscheiden sich die jeweiligen Ausgangszustände der Ligand-induzierten Faltungsprozesse und somit möglicherweise auch die Faltungswege der RNA-Ligand Komplexbildung der beiden RNA-Konstrukte. Für Gsw<sup>apt</sup> finden die Faltungsprozesse, nämlich die Ligandbindung einschließlich der Strukturierung der Ligand-Bindungstasche und infolge dessen eine Umorientierung der Helices einschließlich des interhelikalen Tertiärstrukturelementes, mit unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten statt (Kapitel 3). Im Gegensatz

dazu muss für Gsw<sup>loop</sup> bei einem [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnis von ~1:8 sowohl die Tertiärstruktur der Schlaufenregionen als auch der Ligand-Bindungsregion erst ausgebildet werden. Basierend auf den Ergebnissen der zeitaufgelösten NMR-Untersuchungen handelt es sich hierbei um Prozesse erster Ordnung, die auf einer vergleichbaren Zeitskala stattfinden. Die vergleichbaren Geschwindigkeitskonstanten von Nukleotiden der unterschiedlichen Strukturbereiche könnten möglicherweise bedeuten, dass die zu Grunde liegenden Faltungsprozesse konzertiert ablaufen, d.h. für Gsw<sup>loop</sup> führt die gleichzeitige Strukturierung der Ligand-Bindungstasche und die Ausbildung der interhelikalen Schlaufeninteraktion ([RNA]:[Mg<sup>2+</sup>] ~1:8) direkt zu einer bevorzugt kompakten Anordnung der Helices.

### **Mg<sup>2+</sup>-Abhängigkeit der Kinetik der spezifischen RNA-Ligand Komplexbildung**

Die strukturellen Eigenschaften und die Ligand-Bindungscharakteristika des RNA-Ensembles im Ligand-freien Zustand sind für Gsw<sup>loop</sup> stark abhängig vom jeweilig vorliegenden [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnis (Kapitel 4). Um den Einfluss dieser Mg<sup>2+</sup>-abhängigen Eigenschaften auf die Kinetik des Ligand-Bindungsprozesses zu untersuchen, wurden zeitaufgelöste *real time* NMR-Kinetiken der Bindung von Hypoxanthin durch die Gsw<sup>loop</sup>-RNA in Gegenwart unterschiedlicher [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnisse in einem Bereich von [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>] ~1:5 bis 1:20 durchgeführt. Da die Kinetiken individueller Signale vergleichbare Signalaufbauzeiten zeigten (siehe vorangehender Abschnitt), wurde jeweils eine allgemeine Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{gesamt}} [s^{-1}]$  des RNA-Faltungsprozesses für die verschiedenen [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnisse ermittelt (Abbildungen 5.5 und 5.6).

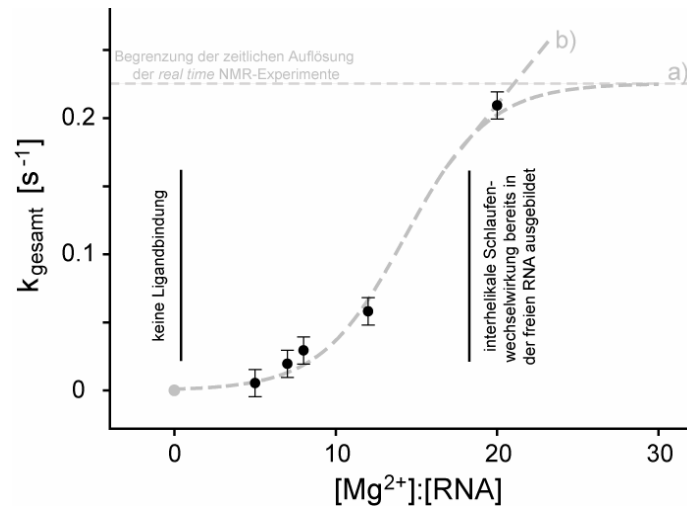
Abbildung 5.5 zeigt den kinetischen Verlauf der RNA-Faltung bei drei exemplarischen [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnissen, wobei das [RNA]:[Ligand]-Verhältnis jeweils ~1:1 entspricht. Der Verlauf der Integrale der jeweiligen RNA-Signale in Abhängigkeit der Zeit zeigt, dass die Kinetik der RNA-Faltung essentiell abhängig ist vom vorliegenden [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnis. Während die Kinetiken für [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnisse von beispielsweise ~1:7 oder ~1:8 mittels zeitaufgelöster NMR-Spektroskopie detektiert und zuverlässig analysiert werden konnten, ist die Kinetik der RNA-Ligand Komplexbildung bei einem [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnis von ~1:20 auf einer Zeitskala von wenigen Sekunden bereits vollständig abgelaufen. Damit ist die Kinetik bei diesem Konzentrationsverhältnis an der Grenze einer möglichen Zeitauflösung der Reaktion mittels der hier angewandten *real time* NMR-Methoden. Aus diesem Grund war für dieses und höhere [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnisse keine zuverlässige Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der entsprechenden RNA-Faltungsprozesse möglich.



**Abbildung 5.5:** Mg<sup>2+</sup>-Abhängigkeit des Ligand-induzierten Faltungsprozesses von Gsw<sup>loop</sup>; Dargestellt ist jeweils der zeitliche Verlauf der Signalzunahme der jeweiligen RNA-Signale für die [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnisse von ~1:7, ~1:8 und ~1:20 infolge der Injektion des Liganden (*Signal-zu-Rausch* Verhältnisse variieren aufgrund der Unterschiede der jeweils eingesetzten absoluten RNA-Konzentration). Da individuelle Signale während des Ligand-induzierten RNA-Faltungsprozesses einen analogen zeitlichen Verlauf zeigen (siehe vorangehenden Abschnitt), wurde die Summe der normierten Integrale der zeitlichen Verläufe individueller Signale in den entsprechenden Kinetiken ermittelt (schwarz) und analysiert (rot: monoexponentielle Fit-Funktion). Entsprechend der in Abbildung 5.7 analysierten Mg<sup>2+</sup>-abhängigen Populationen der RNA-Konformationen der Endzustände der Kinetiken (graue gestrichelte Linie) wurde der zeitliche Verlauf der RNA-Faltungsprozesse entsprechend normiert (grau) und zusätzlich dargestellt.

Wie in Kapitel 4 gezeigt, entspricht der Ausgangszustand der Kinetik, d. h. der Ligand-freie Zustand der Gsw<sup>loop</sup>-RNA, bei [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnissen >1:18 strukturell den Charakteristika der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne Gsw<sup>apt</sup>. Die Gsw<sup>loop</sup>-RNA weist dann bereits in der Ligand-freien Konformation eine stabil ausgebildete interhelikale Tertiärstruktur auf, und der Vergleich der Iminoprotonen NMR-Spektren mit denjenigen der Gsw<sup>apt</sup>-RNA in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> zeigte weitestgehend analoge spektrale Eigenschaften (Kapitel 4).

Zusätzlich zu den strukturell vergleichbaren Eigenschaften der beiden RNA-Ligand Komplexe konnte auch für den Verlauf der Komplexbildung sowohl für Gsw<sup>loop</sup> als auch für Gsw<sup>apt</sup> in Gegenwart hoher Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen ein analoges kinetisches Verhalten ermittelt werden. Der Vergleich der Cofaktor-Abhängigkeit der Ligand-induzierten Kinetiken der Gsw<sup>apt</sup>-RNA (Abbildung 5.1) mit dem kinetischen Verlauf der RNA-Faltung von Gsw<sup>loop</sup> bei einem [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnis von ~1:20 (Abbildung 5.5) zeigte für beide RNA-Konstrukte jeweils einen Ligand-induzierten Faltungsprozess mit einer für zeitaufgelöste NMR-Spektroskopie schnellen Kinetik. Aufgrund dessen können allerdings mögliche individuelle Unterschiede der Kinetiken auf einer schnellen Zeitskala (<Sekunden) für die beiden RNAs nicht ausgeschlossen werden.

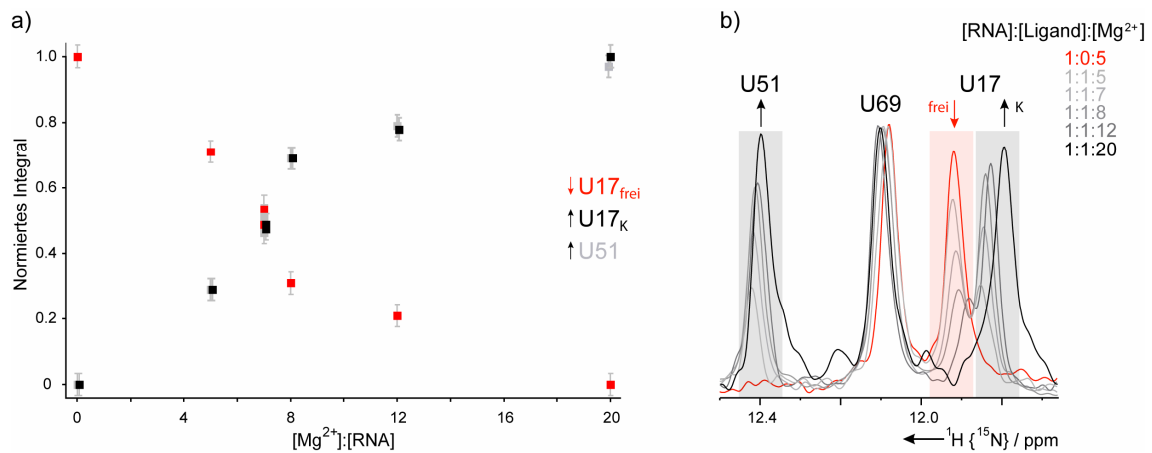


**Abbildung 5.6:** Mg<sup>2+</sup>-Abhängigkeit des Ligand-induzierten Faltungsprozesses von Gsw<sup>loop</sup>; Dargestellt ist die jeweils ermittelte allgemeine Geschwindigkeitskonstante k<sub>gesamt</sub> [s<sup>-1</sup>] des Ligand-induzierten RNA-Faltungsprozesses in Abhängigkeit des jeweiligen [Mg<sup>2+</sup>]:[RNA]-Verhältnisses (der angegebene Fehler der Einzelmessungen entspricht der Standardabweichung der zweifach durchgeführten Kinetik bei einem [Mg<sup>2+</sup>]:[RNA]-Verhältnis von ~7:1). In Abwesenheit von Mg<sup>2+</sup> kann keine Ligandbindung für Gsw<sup>loop</sup> detektiert werden (grauer Datenpunkt). Die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k<sub>gesamt</sub> [s<sup>-1</sup>] vom [Mg<sup>2+</sup>]:[RNA]-Verhältnis kann denkbar durch einen sigmoidalen Verlauf beschrieben werden (graue Linie). Allerdings konnte bereits bei einem [Mg<sup>2+</sup>]:[RNA]-Verhältnis von ~20:1 eine schnelle Kinetik der RNA-Faltung (Abbildung 5.5) beobachtet werden, für welche die Signale des RNA-Ligand Komplexes bereits innerhalb der ersten 3-4 aufgenommenen zeitlich aufeinander folgenden 1D NMR-Spektren mit der maximalen Intensität detektiert werden konnten. Für [Mg<sup>2+</sup>]:[RNA]-Verhältnisse >20:1 konnten somit keine weiteren Differenzierungen der kinetischen Prozesse erhalten werden, was durch den sigmoidalen Verlauf der Mg<sup>2+</sup>-Abhängigkeit mit einem Grenzwert, welcher die limitierende experimentelle Zeitauflösung reflektiert (Verlauf a)) ( $f = a / (1 + \exp(-(x - x_0) / b))$ ); für k<sub>gesamt</sub> wurde ein Wert von ~0.22 s<sup>-1</sup> als experimentell basierter Grenzwert eingesetzt), und durch einen weiteren alternativ denkbaren Verlauf (Verlauf b)) gekennzeichnet ist.

Die Analyse der allgemeinen Geschwindigkeitskonstanten k<sub>gesamt</sub> [s<sup>-1</sup>] des jeweiligen Ligand-induzierten RNA-Faltungsprozesses in Abhängigkeit des [Mg<sup>2+</sup>]:[RNA]-Verhältnisses lässt einen sigmoidalen Verlauf vermuten. Aufgrund der experimentell limitierten Zeitauflösung konnten allerdings keine Geschwindigkeitskonstanten des Ligand-induzierten Faltungsprozesses von Gsw<sup>loop</sup> für [Mg<sup>2+</sup>]:[RNA]-Verhältnisse >20:1 bestimmt werden (Abbildung 5.6).

Zusätzlich zu der Mg<sup>2+</sup>-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten des Ligand-induzierten RNA-Faltungsprozesses (Abbildung 5.6) beeinflusst die entsprechend vorliegende Mg<sup>2+</sup>-Konzentration auch den jeweiligen Anteil der Riboswitch-RNA, der den finalen RNA-Ligand

Komplex ausbildet (Abbildung 5.7). Dabei liegen für alle [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnisse die RNA und der Ligand jeweils in äquimolaren Verhältnissen vor.



**Abbildung 5.7:** Analyse der Mg<sup>2+</sup>-abhängigen Populationen der RNA-Konformationen (freie Gsw<sup>loop</sup>-RNA und Gsw<sup>loop</sup>-Hypoxanthin Komplex) infolge der Ligandbindung; Während das Signal des Nukleotids U51 ausschließlich infolge der Ligandbindung detektiert werden kann, ist das Signal des Nukleotids U17 sowohl in der Ligand-freien (U17<sub>frei</sub>) als auch der -gebundenen (U17<sub>k</sub>) Konformation, allerdings mit unterschiedlicher chemischer Verschiebung, detektierbar. Das Signal des Nukleotids U69 zeigt weder in Bezug auf die chemische Verschiebung noch auf die Intensität signifikante Unterschiede in den beiden RNA-Konformationen; **a)** Normierte Integrale (relativ zum Integral U17<sub>gesamt</sub> (=U17<sub>frei</sub>+U17<sub>k</sub>)) der Iminoprotonensignale von U17<sub>frei</sub>, U17<sub>k</sub> und U51 in Abhängigkeit des [Mg<sup>2+</sup>]:[RNA]-Verhältnisses. Das rot gekennzeichnete Integral des Signals U17 entspricht der Abnahme der freien RNA-Konformation (U17<sub>frei</sub>), während das schwarz gekennzeichnete Integral der Konformation von U17 im RNA-Ligand Komplex entspricht (U17<sub>k</sub>); **b)** Überlagerung der 1D NMR-Spektren von Gsw<sup>loop</sup> in Gegenwart der Cofaktoren Hypoxanthin und Mg<sup>2+</sup> (die entsprechenden Konzentrationsverhältnisse sind farblich annotiert. Das *Signal-zu-Rausch* Verhältnis der 1D-Spektren variiert aufgrund der Unterschiede in der eingesetzten absoluten RNA-Konzentration. Die Skalierung wurde jeweils relativ zum Iminoprotonensignal U69 vorgenommen); rot hinterlegt ist das Signal, das der abnehmenden freien RNA-Konformation entspricht und grau hinterlegt sind Signale, die nur im Falle der RNA-Ligand Komplexbildung detektiert werden können.

Die NMR-spektroskopische Analyse der RNA-Populationen in den Spektren nach Ablauf der Mg<sup>2+</sup>-abhängigen Ligand-induzierten RNA-Faltungsprozesse zeigte, dass die RNA-Ligand Komplexbildung bei einem [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnis von ~1:20 vollständig abgelaufen ist. Unter diesen experimentellen Bedingungen kann die RNA-Konformation des Ligand-freien



Zustandes in den NMR-Spektren nach Ablauf des Ligand-induzierten RNA-Faltungsprozesses nicht detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnten beispielsweise bei einem  $[\text{RNA}]:[\text{Mg}^{2+}]$ -Verhältnis von  $\sim 1:8$  nach Ablauf des Ligand-induzierten RNA-Faltungsprozesses sowohl Signale des RNA-Ligand Komplexes ( $[\text{RNA-Ligand}]_{\text{mg}}$ ) als auch der Ligand-freien RNA-Konformation ( $[\text{RNA}_{\text{frei}}]_{\text{mg}}$ ) beobachtet werden. Anhand der Integrale der entsprechend zugehörigen Signale der Nukleotide U17 und U51 der jeweiligen RNA-Konformationen kann hier beispielsweise ein Populationsverhältnis  $[\text{RNA-Ligand}]_{\text{mg}}:[\text{RNA}_{\text{frei}}]_{\text{mg}}$  von  $\sim 69:31$  bestimmt werden (Abbildung 5.7).

Mittels CD-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die RNA-Konformationen von  $\text{Gsw}^{\text{loop}}$  wesentlich durch  $\text{Mg}^{2+}$  stabilisiert werden. Dabei wurden beispielsweise bei einem  $[\text{RNA}]:[\text{Mg}^{2+}]$ -Verhältnis von  $\sim 1:33$  vergleichbare durch  $\text{Mg}^{2+}$  induzierte Stabilisierungen der Ligand-freien RNA ( $[\text{RNA}_{\text{frei}}]_{\text{mg}}$ ) und des RNA-Ligand Komplexes ( $[\text{RNA-Ligand}]_{\text{mg}}$ ) ermittelt (Kapitel 4). Damit kann angenommen werden, dass die durch  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen induzierte Stabilisierung des Ausgangszustandes ( $[\text{RNA}_{\text{frei}}]_{\text{mg}}$ ) der spezifischen Ligandbindung und ebenso die Stabilisierung des Endzustandes ( $[\text{RNA-Ligand}]_{\text{mg}}$ ) unter diesen Bedingungen jeweils vergleichbar zunimmt. Die durch verschiedene  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen induzierte relative Stabilisierung der freien RNA unterscheidet sich jedoch, soweit untersucht. Demzufolge könnten die Unterschiede der Geschwindigkeitskonstanten des spezifischen Ligand-Bindungsprozesses in Abhängigkeit der  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration durch eine entsprechend variierende Freie Aktivierungsenthalpie zur RNA-Ligand Komplexbildung interpretiert werden. In anderen Worten, je höher das  $[\text{Mg}^{2+}]:[\text{RNA}]$ -Verhältnis, desto stabiler der Übergangszustand hin zum RNA-Ligand Komplex, was in Folge zu einer schnelleren Kinetik der Ligandbindung führt. Die unterschiedlichen Populationsverhältnisse der freien RNA ( $[\text{RNA}_{\text{frei}}]_{\text{mg}}$ ) und des finalen  $\text{Gsw}^{\text{loop}}$ -Ligand Komplexes ( $[\text{RNA-Ligand}]_{\text{mg}}$ ), die in Abhängigkeit der  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration beobachtet wurden, könnten zum einen ein  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängiges Gleichgewicht der jeweiligen konformationellen RNA-Ensembles reflektieren, deren Assoziations- bzw. Dissoziationsprozesse jeweils auf der NMR-Zeitskala mit langsamen Austauschprozessen stattfinden. Zum anderen ist auch denkbar, dass durch die Assoziation der Kationen die Dynamik möglicher energetisch entarteter RNA-Konformationen reduziert und somit der jeweilige entropische Beitrag verringert wird und demzufolge in Abhängigkeit der  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration Ligand-bindungskompetente RNA-Konformationen bevorzugt populiert werden.

### 3) Tertiärstrukturentfaltung des Gsw<sup>loop</sup>-Ligand Komplexes

Eine detaillierte kinetische Charakterisierung von RNA-Faltungsmechanismen beinhaltet neben der Untersuchung von Faltungsprozessen selbst auch die Bestimmung entsprechender Entfaltungsvorgänge der jeweiligen Sekundär- und/oder Tertiärstrukturelemente (28, 29). Um ein genaueres kinetisches Modell des Ligand-induzierten RNA-Faltungsprozesses der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne zu erhalten, könnten neben den bisher beschriebenen Assoziationsprozessen denkbar auch entsprechende Rückreaktionen analysiert werden. Eine vollständige Analyse der Faltungs- und Entfaltungsprozesse könnte zur Aufklärung des zu Grunde liegenden Gen-Regulationsmechanismus oder auch für denkbare RNA-gerichtete Wirkstoffentwicklungen von Bedeutung sein.

Die Ausbildung des spezifischen RNA-Ligand Komplexes ist im Falle der G37A/C61U-Mutante essentiell abhängig von Mg<sup>2+</sup>-Ionen. Ausgehend von der Ligand-freien RNA-Konformation, die ausschließlich durch stabil ausgebildete Sekundärstrukturen charakterisiert ist, werden die charakteristischen Tertiärstrukturelemente des Komplexes durch die gemeinsame Zugabe von Mg<sup>2+</sup> und Hypoxanthin ausgebildet. Durch die Zugabe eines Mg<sup>2+</sup>-Chelators könnten somit die entsprechenden Tertiärstrukturentfaltungsprozesse beobachtet werden. Für mögliche zeitaufgelöste NMR-spektroskopische Untersuchungen sind dafür verschiedene Voraussetzungen erforderlich.

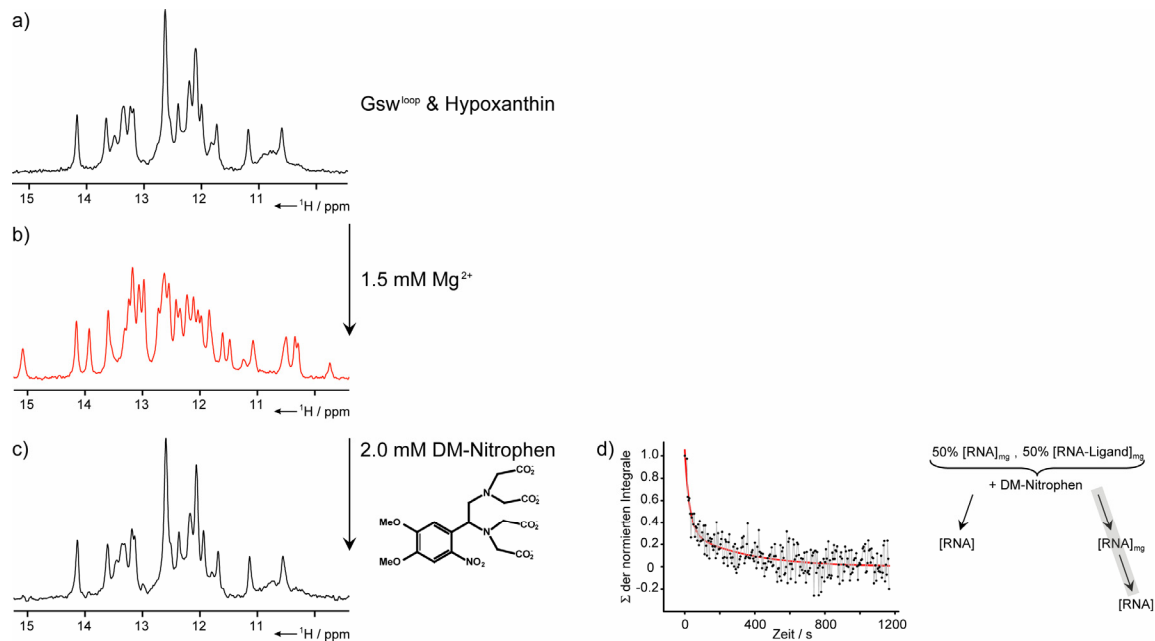
- i) Die Tertiärstrukturentfaltung muss mit Veränderungen der spektralen Eigenschaften einhergehen, was für den Gsw<sup>loop</sup>-Hypoxanthin Komplex durch charakteristische Iminoprotonen-Reportersignale für individuelle Tertiärstrukturbereiche gewährleistet ist (22) (Kapitel 4).
- ii) Die Entfaltungsreaktion muss durch den entsprechenden Mg<sup>2+</sup>-Chelator in den jeweiligen für zeitaufgelöste NMR-spektroskopische Methoden benötigten Konzentrationsbereichen möglich sein und *in situ* initiiert werden können. Diese beiden experimentellen Bedingungen können durch die Verwendung der Mischapparatur (Kapitel 2) realisiert werden.
- iii) Die Zugabe des Mg<sup>2+</sup>-Chelators muss zu der Entfaltung des RNA-Ligand Komplexes führen und der Mg<sup>2+</sup>-Chelatkomplex muss im Folgenden stabil ausgebildet bleiben. Die Erfüllung dieser Eigenschaften konnten für den Mg<sup>2+</sup>-Chelator DM-Nitrophen gezeigt werden ( $K_D(\text{DM-Nitrophen}/\text{Mg}^{2+}) \sim 1.5\text{-}2.5 \mu\text{M}$  (30-32)). Die NMR-Spektren infolge der Titration des Gsw<sup>loop</sup>-Hypoxanthin Komplexes (in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup>) mit DM-Nitrophen entsprechen denjenigen der freien Gsw<sup>loop</sup>-RNA (Abbildung 5.8) und bestätigen somit eine durch DM-Nitrophen induzierte Mg<sup>2+</sup>-Chelatisierung, die infolge zu der Entfaltung der Tertiärstrukturelemente des Gsw<sup>loop</sup>-Hypoxanthin Komplexes führt.

iv) Die Dissoziation von  $Mg^{2+}$  und RNA darf nicht den geschwindigkeitsbestimmenden Prozess darstellen. Für die tRNA<sup>Phe</sup> (aus Hefe) wurden beispielsweise Dissoziationsraten ( $k_{off}$ ) für  $Mg^{2+}$  im Millisekundenbereich bestimmt (33, 34), während  $k_{off}$  ( $Mg^{2+}$ ) für DM-Nitrophen mit  $1.25\text{ s}^{-1}$  bestimmt wurde (35).

v) Um ausschließlich den Prozess der Tertiärstrukturfaltung beobachten zu können, müssen die Sekundärstrukturelemente der freien RNA dann unter den experimentellen Bedingungen der Kinetik weiterhin stabil ausgebildet sein. Die CD-spektroskopischen Untersuchungen zur Analyse der thermischen Stabilität zeigten, dass dies für die Gsw<sup>loop</sup>-RNA bis zu Temperaturen von  $\sim 50\text{-}60^\circ\text{C}$  zutrifft (Kapitel 4).

Eine experimentell mögliche Entfaltung der Tertiärstrukturelemente des Gsw<sup>loop</sup>-Hypoxanthin Komplexes konnte in statischen und zeitaufgelösten NMR-Spektren gezeigt werden (Abbildung 5.8). Das 1D NMR-Spektrum des RNA-Ligand Komplexes (in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ ) nach der Titration mit DM-Nitrophen entspricht demjenigen der Ligand-freien RNA in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$ . Anhand der Analyse des zeitlichen Verlaufs der Signalabnahme der charakteristischen RNA-Ligand Komplexsignale besteht somit die generelle Möglichkeit, die Tertiärstrukturfaltung mittels zeitaufgelöster NMR-Spektroskopie zu untersuchen. Unter Verwendung der Mischapparatur (Kapitel 2) konnte durch die Injektion einer DM-Nitrophen-Lösung zu dem Gsw<sup>loop</sup>-Ligand Komplex (in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ ) gezeigt werden, dass die Entfaltungsprozesse der entsprechenden Tertiärstrukturelemente auf einer mittels *real time* NMR-Methoden möglich zu beobachtenden und zu analysierenden Zeitskala stattfinden (Abbildung 5.8d).

Der zeitliche Verlauf der Tertiärstrukturfaltung des RNA-Ligand Komplexes wurde anhand der Summe der normierten Integrale individueller Signale dargestellt (Abbildung 5.8d). Die Darstellung der Normierung der Kinetik bis zu der vollständigen Abnahme der RNA-Ligand Komplexsignale entspricht dabei allerdings nicht den experimentell erhaltenen Populationen der RNA-Konformationen des Endzustandes der Kinetik, da die Konzentration der injizierten DM-Nitrophen-Lösung nicht einem äquimolaren Verhältnis der entsprechend vorliegenden  $Mg^{2+}$ -Konzentration entsprach. Zudem erlaubte das *Signal-zu-Rausch* Verhältnis der dargestellten Entfaltungskinetik keine zuverlässige quantitative Aussage über die dem Prozess zu Grunde liegenden Geschwindigkeitskonstanten. Die dargestellte Signalabnahme soll im Rahmen dieser Arbeit lediglich zeigen, dass eine kinetische Beobachtung der Entfaltung der RNA-Tertiärstrukturen und damit die Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten der Komplexdissoziation mittels *real time* NMR-Methoden möglich sind.



**Abbildung 5.8:** Entfaltung des Gsw<sup>loop</sup>-Ligand Komplexes; 1D NMR-Spektren (600 MHz, 283 K) von nicht-isotopenmarkierter Gsw<sup>loop</sup>-RNA ([RNA]  $\sim$  0.2 mM) **a)** in Gegenwart von Hypoxanthin ([RNA]:[Ligand]  $\sim$  1:1.5), **b)** in Gegenwart von Hypoxanthin nach der Zugabe von 1.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  und **c)** in Gegenwart von Hypoxanthin und  $\text{Mg}^{2+}$  nach der Zugabe von 2 mM DM-Nitrophen; während die Zugabe von  $\text{Mg}^{2+}$  zu der Ausbildung des RNA-Ligand Komplexes führt (b), entspricht das 1D NMR-Spektrum nach Zugabe von DM-Nitrophen (c) dem Ausgangsspektrum der Titration, d. h. dem 1D NMR-Spektrum der freien Gsw<sup>loop</sup>-RNA (a); **d)** *Links:* Zeitlicher Verlauf der Entfaltung des Gsw<sup>loop</sup>-Hypoxanthin Komplexes initiiert durch die Zugabe von DM-Nitrophen ([RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]  $\sim$  1:7, 700 MHz, T  $\sim$  283 K). Dargestellt ist die Summe der normierten Integrale von RNA-Signalen der Ligand-Bindungsregion in Abhängigkeit der Zeit mit biexponentieller Fit-Funktion (rote Linie). *Rechts:* Schematisch dargestellt sind denkbare Tertiärstruktur-Entfaltungsverläufe, die bei einem [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnis von  $\sim$  1:7 möglicherweise sowohl die Entfaltung der freien (Mg<sup>2+</sup>-komplexierten) RNA-Konformation ([RNA]<sub>mg</sub>) als auch die Entfaltung des RNA-Ligand Komplexes (in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup>, [RNA-Ligand]<sub>mg</sub>) einschließen könnten. Da für den (*links*) dargestellten zeitlichen Verlauf der Entfaltung ausschließlich Signale der Ligand-Bindungsregion analysiert wurden, reflektiert dieser ausschließlich die Entfaltung des RNA-Ligand Komplexes (grau hinterlegt).

Für die Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Entfaltung des RNA-Ligand Komplexes wurden ausschließlich diejenigen normierten Integrale der Signale aufsummiert, die unter diesen experimentellen Bedingungen ([RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnis  $\sim$  1:7) lediglich im RNA-Ligand

Komplex detektierbar und zusätzlich spektral aufgelöst sind (U47, U49, U51 und U75). Wie in Abbildung 5.7 gezeigt, liegen bei einem [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnis von  $\sim 1:7$  und einem [RNA]:[Ligand]-Verhältnis von  $\sim 1:1$  sowohl die RNA-Konformation im Ligand-freien als auch diejenige im -gebundenen Zustand vor. Entsprechend beinhalten denkbare durch die Zugabe des Mg<sup>2+</sup>-Chelators induzierte Entfaltungsprozesse unter diesen experimentellen Bedingungen sowohl die Entfaltung des RNA-Ligand Komplexes ( $[\text{RNA-Ligand}]_{\text{mg}}$ ) als auch eine durch den Entzug von Mg<sup>2+</sup>-Ionen induzierte Konformationsänderung der zuvor Mg<sup>2+</sup>-komplexierten Ligand-freien RNA ( $[\text{RNA}]_{\text{frei,mg}}$ ) (Abbildung 5.8d). Da die in Abbildung 5.8d analysierten Signale der Ligand-Bindungsregion ausschließlich im RNA-Ligand Komplex detektierbar sind, reflektiert deren Signalabnahme nur den Prozess der Entfaltung des Komplexes und damit der entsprechenden Tertiärstrukturinteraktionen der Ligand-Bindungsregion. Obwohl das *Signal-zu-Rausch* Verhältnis keine zuverlässige quantitative kinetische Analyse ermöglichte, kann der dargestellte zeitliche Verlauf dennoch am besten mittels einer biexponentiellen Funktion analysiert werden. Dies impliziert ein komplexes der Tertiärstrukturentfaltung des RNA-Ligand Komplexes zu Grunde liegendes Entfaltungsschema, das möglicherweise die Entfaltung über Mg<sup>2+</sup>-komplexierte Intermediat-RNA-Ensembles beinhalten könnte.

## ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION

Ein bedeutender Aspekt bezüglich der Faltung von Biomakromolekülen ist die Einschränkung des jeweilig dynamischen und flexiblen Ensembles ungefalteter Konformationen hin zu einer funktionalen Struktur. Die Ausbildung eines bereits kompakteren bzw. partiell strukturierten Intermediat-RNA-Ensembles kann die Zahl dynamisch zugänglicher Konformationen, welche auch funktionale Konformationen beinhalten, begrenzen und somit den Faltungsprozess vereinfachen. Tertiärstrukturinteraktionen lokal entfernter Strukturelemente können dabei die Geschwindigkeit und Spezifität des RNA-Faltungsprozesses wesentlich bestimmen (11, 36). Der polyanionische Charakter von RNAs stellt zudem eine elektrostatische Barriere für deren Faltung in kompakte funktionale Tertiärstrukturen dar, weshalb unter anderem Kationen, insbesondere zweiwertige, oft zusätzlich essentiell benötigt werden.

Wichtige Aspekte zur Aufklärung des transkriptional-vermittelten Gen-Regulationsmechanismus des Guanin Riboswitch-RNA Elementes beinhalten die Charakterisierung von beteiligten statischen Strukturen der Grund-, Übergangs- und Endzustände der entsprechenden RNA-Faltungsprozesse sowie deren thermodynamische Untersuchung und die Charakterisierung dynamischer Aspekte der zu Grunde liegenden RNA-Faltungsprozesse. Die in den Kapiteln 3-5 dargestellten strukturellen, thermodynamischen und kinetischen Ergebnisse der Guanin Riboswitch-RNA Aptamerdomänen Gsw<sup>apt</sup> und Gsw<sup>loop</sup> sollen im Folgenden zusammenfassend diskutiert werden.

NMR-spektroskopische Untersuchungen der verschiedenen RNA-Konformationen von Gsw<sup>apt</sup> und Gsw<sup>loop</sup> in An- oder Abwesenheit von Mg<sup>2+</sup> ermöglichten anhand der Iminoprotonen-Reportersignale die Charakterisierung der jeweils stabil ausgebildeten Sekundär- und Tertiärstrukturelemente. Basierend auf Ligand- und/oder Mg<sup>2+</sup>-Titrations der RNA-Konstrukte konnten anhand dieser Reportersignale diejenigen Bereiche definiert werden, für die RNA-Strukturelemente ausgebildet werden und/oder Ligand-Bindungskompetenz vorliegt. Mittels CD-spektroskopischer Untersuchungen erfolgten die Charakterisierung thermischer Entfaltungsübergänge der RNA-Konstrukte und der RNA-Ligand Komplexe. Durch die Kombination von CD- und NMR-spektroskopischen Experimenten konnten diese Übergänge der Entfaltung von Tertiär- und Sekundärstrukturelementen der RNA-Konstrukte zugeordnet und somit deren individuelle Stabilitäten analysiert werden. Anhand der Analyse von NMR-Ligand-Linienbreiten konnten nicht-spezifische Ligand-Bindungsprozesse und deren strukturelle Voraussetzung charakterisiert werden. Die Nukleotid-spezifische Auflösung in *real time* NMR-Untersuchungen ermöglichte einen Einblick in mögliche, in den Ligand-

Bindungsprozess der Riboswitch-RNA involvierte konformationelle RNA-Ensembles und deren Faltungsprozesse. Die Variationsmöglichkeiten der Charakteristika des jeweiligen konformationellen RNA-Ensembles des Ausgangs- bzw. Endzustandes der Ligand-induzierten Faltungsprozesse von Gsw<sup>apt</sup> und Gsw<sup>loop</sup> ermöglichten die Analyse der Zusammenhänge zwischen der Cofaktor-Abhängigkeit sowie der globalen Organisation der Tertiärstruktur und den spezifischen Ligand-induzierten RNA-Faltungsprozessen.

Die RNA-Konformation von Gsw<sup>apt</sup> im Ligand-freien Zustand ist durch die stabil ausgebildete interhelikalen Tertiärstruktur (gekennzeichnet durch: \*) charakterisiert (N\*) (Abbildung 5.9a, *links*), wohingegen für die Ligand-Bindungsregion in den NMR-Spektren keine Iminoprotonensignale detektiert werden können (22). Für diese RNA-Konformation (N\*) kann die spezifische Ligandbindung bereits in Abwesenheit von Mg<sup>2+</sup> beobachtet werden. Die Zugabe von Mg<sup>2+</sup> führt in NMR-Spektren von Gsw<sup>apt</sup> (N\*<sub>mg</sub>) zu geringen chemischen Verschiebungsänderungen (22). Allerdings ergab der Vergleich der Stabilitäten der Strukturen von N\* und N\*<sub>mg</sub> in CD- und temperaturabhängigen NMR-spektroskopischen Untersuchungen eine signifikante Stabilisierung, vor allem der interhelikalen Tertiärstruktur, in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> ( $\Delta T_{M1}(N^*_{mg} \rightarrow N^*) \sim 45.3^\circ\text{C}$  und  $\Delta T_{M2}(N^*_{mg} \rightarrow N^*) \sim 10.7^\circ\text{C}$ , Kapitel 4, Abbildung 4.8). In NMR-Spektren des Gsw<sup>apt</sup>-Ligand Komplexes (K\*) können bereits alle Iminoprotonen-Reportersignale sowohl der Ligand-Bindungstasche als auch der interhelikalen Tertiärstruktur detektiert werden, und die Zugabe von Mg<sup>2+</sup> führt hier zu geringen CSPs (22). Die thermische Stabilität vor allem der interhelikalen Tertiärstruktur wird jedoch auch für den RNA-Ligand Komplex in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> (K\*<sub>mg</sub>) signifikant höher ( $\Delta T_{M1}(K^* \rightarrow K^*_{mg}) \sim 47.6^\circ\text{C}$ ) (Kapitel 4, Abbildung 4.7).

Im Gegensatz zu der RNA-Konformation von Gsw<sup>apt</sup> (N\*) ist in der freien RNA-Konformation der G37A/C61U-Mutante Gsw<sup>loop</sup> (M) in Abwesenheit von Mg<sup>2+</sup> weder die interhelikale Tertiärstruktur stabil ausgebildet noch können Iminoprotonensignale der Ligand-Bindungsregion der RNA in den NMR-Spektren detektiert werden. Diese RNA-Konformation ist ausschließlich durch stabil ausgebildete Sekundärstrukturelemente charakterisiert (Kapitel 4, Abbildung 4.2). Zusätzlich zeigt diese RNA-Konformation der Gsw<sup>loop</sup>-RNA (M) keine Ligand-Bindungskompetenz (22) (Abbildung 5.9a, *mitte* und *rechts*). In Gegenwart von Mg<sup>2+</sup>-Ionen hingegen können diese RNA-Charakteristika für Gsw<sup>loop</sup> wiederhergestellt werden (Kapitel 4). Durch die Variation der Mg<sup>2+</sup>-Konzentration wird für die freie RNA-Konformation von Gsw<sup>loop</sup> sowohl ausschließlich die Ligand-Bindungskompetenz wiederhergestellt ( $\{I\}_{mg}$ ) (Abbildung 5.9a, *rechts*) oder auch bei hohen Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen zusätzlich die interhelikale

Tertiärstruktur stabil ausgebildet ( $I_{mg}^*$ ,  $[RNA]:[Mg^{2+}] > 1:18$ ) (Abbildung 5.9a, *mitte*). Während für das konformationelle RNA-Ensemble von Gsw<sup>loop</sup> bei  $[RNA]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnissen  $< 1:18$  ( $\{I\}_{mg}$ ) ausschließlich ein einziger thermischer Entfaltungsübergang beobachtet wird, führt die stabil ausgebildete, durch  $Mg^{2+}$ -Ionen vermittelte interhelikale Tertiärstruktur für  $I_{mg}^*$  in den CD-Schmelzkurven, analog der Situation für Gsw<sup>apt</sup>, zu zwei Entfaltungsübergängen (Kapitel 4, Tabelle 4.3). Die Ausbildung der spezifischen Gsw<sup>loop</sup>-Ligand Komplexe ist in den NMR-spektroskopischen Experimenten durch die Beobachtung charakteristischer Signale der intra- und intermolekularen RNA-Tertiärkontakte gekennzeichnet (Kapitel 4, Abbildungen 4.5 und 4.6). In NMR-Spektren des Gsw<sup>loop</sup>-Ligand Komplexes ( $\{K_{mg}^*\}$ ) können bei hohen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen ( $K_{mg}^*$ ) zusätzliche Iminoprotonensignale im Bereich der interhelikalen Tertiärstruktur beobachtet werden, welche auch für den Gsw<sup>apt</sup>-Ligand Komplex (hier allerdings bereits in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$ ) beobachtet wurden (Kapitel 4, Abbildung 4.6).

Der Vergleich der konformationellen RNA-Ensembles von Gsw<sup>apt</sup> und Gsw<sup>loop</sup> und deren spezifische RNA-Ligand Komplexe zeigt trotz der strukturell vergleichbar ausgebildeten Tertiärinteraktionen individuelle Unterschiede. Der Vergleich der Ligand-freien RNA-Konformationen, für welche in den NMR-Spektren die stabil ausgebildete interhelikale Tertiärinteraktion detektiert werden konnte ( $N^*$ ,  $N_{mg}^*$ ,  $I_{mg}^*$ ), zeigt, dass sich deren Stabilitäten dennoch unterscheiden. Die durch hohe  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen induzierte Tertiärinteraktion der freien RNA-Konformation von Gsw<sup>loop</sup> ( $I_{mg}^*$ ) weist zwar im Vergleich zu Gsw<sup>apt</sup> in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  ( $N^*$ ) eine erhöhte thermische Stabilität auf ( $\Delta T_{M1}(I_{mg}^* \rightarrow N^*) \sim 15.5^\circ C$ ), die Temperatur des Entfaltungsüberganges unterscheidet sich jedoch signifikant von Gsw<sup>apt</sup> in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  ( $N_{mg}^*$ ) ( $\Delta T_{M1}(N_{mg}^* \rightarrow I_{mg}^*) \sim 29.8^\circ C$ ) (Kapitel 4, Tabelle 4.3).

Der Vergleich von  $^1H, ^{15}N$ -HSQC Spektren der RNA-Hypoxanthin Komplexe, Gsw<sup>apt</sup>-Hypoxanthin und Gsw<sup>loop</sup>-Hypoxanthin jeweils in Gegenwart hoher  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen, zeigt weitestgehend ähnliche spektrale Eigenschaften (Abbildung 4.6). Chemische Verschiebungsänderungen von Nukleotiden der Schlaufenregionen weisen dennoch auch im RNA-Ligand Komplex auf mögliche lokale Strukturänderungen im Bereich des interhelikalen Tertiärstrukturelementes hin. Der Vergleich der CD-Schmelzkurven dieser beiden RNA-Ligand Komplexe in Gegenwart hoher  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen ergibt zwar eine vergleichbare Stabilisierung des zweiten Entfaltungsüberganges (Kapitel 4, Tabelle 4.3). Der erste Übergang, welcher charakteristisch ist für die Entfaltung der Tertiärstrukturen, ist aber für den Gsw<sup>apt</sup>-Ligand Komplex durch die Assoziation von  $Mg^{2+}$ -Ionen zu wesentlich höheren Temperaturen verschoben ( $(\Delta T_{M1}(K_{mg}^*, Gsw^{apt} \rightarrow Gsw^{loop}) \sim 32.5^\circ C$ ) (Kapitel 4, Tabelle 4.3).



Auf der Basis der Analyse von NMR-Ligand-Linienbreiten wurde eine schwach affine und nicht-spezifische Ligandbindung der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne postuliert. Ein nicht-spezifischer Ligand-Bindungsprozess konnte für RNA-Konstrukte mit stabil ausgebildeter interhelikaler Tertiärstruktur ermittelt werden ( $N^*$ ,  $N^*_{mg}$ ,  $I^*_{mg}$ ), wohingegen für Gsw<sup>loop</sup> in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  keine schwach affine Komplexbildung beobachtet wurde (Kapitel 3, Tabelle 3.2 und Kapitel 4, Tabelle 4.2). Diese Ergebnisse implizieren, dass die Bildung eines schwach affinen, nicht-spezifischen RNA-Ligand Komplexes von einer partiellen Strukturierung der RNA abhängig ist, die möglicherweise durch die Einschränkung der konformationellen Dynamik des RNA-Ensembles infolge der Stabilisierung des interhelikalen Tertiärstrukturelementes vermittelt wird.

Die mittels zeitaufgelöster NMR-Spektroskopie untersuchten RNA-Faltungsprozesse umfassen zum einen die  $Mg^{2+}$ -induzierte Strukturierung einer RNA (Gsw<sup>loop</sup>) ausgehend von ausschließlich ausgebildeten Sekundärstrukturelementen und zum anderen die RNA-Faltungsprozesse, die in Zusammenhang mit der Ligandbindung der RNAs (Gsw<sup>loop</sup> und Gsw<sup>apt</sup>) stehen (Kapitel 3 und Kapitel 5). Diese Faltungsprozesse schließen dabei sowohl die Ausbildung der Ligand-Bindungstasche, als auch Strukturveränderungen in entfernt lokalisierten Tertiärstrukturbereichen ein. Dabei unterscheiden sich die jeweiligen Ausgangs- und Endzustände der Ligand-induzierten Kinetiken sowohl in ihrer Struktur, der Stabilität und der konformationellen Dynamik (Abbildung 5.9).

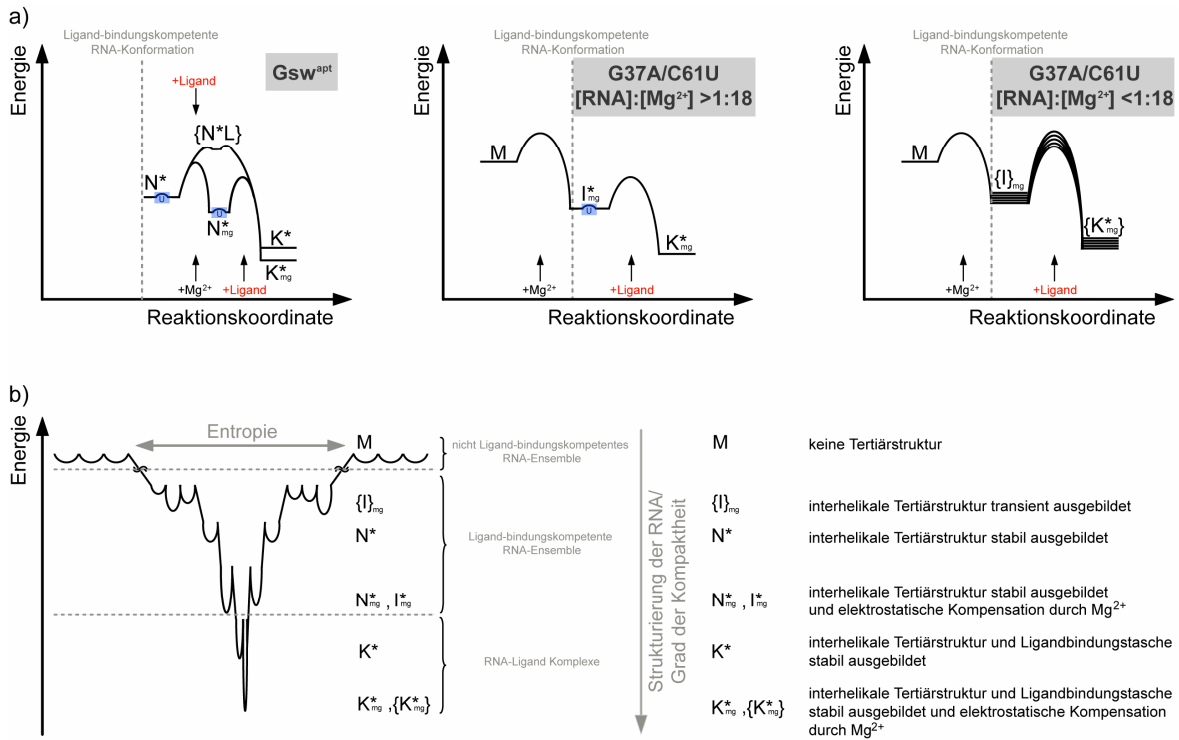
Für den spezifischen Ligand-induzierten Faltungsprozess von Gsw<sup>apt</sup> ( $N^* \rightarrow K^*$ ) wurden (in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$ ) verschiedene kinetische Prozesse beobachtet, die Nukleotiden der strukturell getrennten Bereiche, der Ligand-Bindungsregion ( $t_{1/2}$  [s] im Bereich von 18.9-23.6 s) und der interhelikalen Tertiärstruktur bzw. der Helices P2 und P3 ( $t_{1/2}$  [s] im Bereich von 27.1-30.7 s), zugeordnet werden konnten. Die Signalaufbauzeiten konnten dabei jeweils mittels einer monoexponentiellen Funktion analysiert werden. Da es sich um getrennte Strukturbereiche handelt, kann vermutet werden, dass die individuellen Geschwindigkeitskonstanten jeweils nur die entsprechende lokale Strukturänderung reflektieren und die einzelnen Faltungsprozesse in gewisser Weise entkoppelt sind (Kapitel 3).

Die Freie Aktivierungsenthalpie  $\Delta G^\ddagger(Mg^{2+})$  der  $Mg^{2+}$ -induzierten Faltungsprozesse ist in Abbildung 5.9a für alle Übergänge ( $N^* \rightarrow N^*_{mg}$ ,  $M \rightarrow I^*_{mg}$ ,  $M \rightarrow \{I\}_{mg}$ ) schematisch gleich dargestellt. Diese Darstellung begründet sich auf der Beobachtung, dass die durch  $Mg^{2+}$ -induzierte Kinetik, die für Gsw<sup>loop</sup> bei einem  $[RNA]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnis  $<1:18$  untersucht wurde ( $M \rightarrow \{I\}_{mg}$ ), auf einer schnellen Zeitskala stattfindet, die mittels zeitaufgelöster NMR-

Spektroskopie nicht zuverlässig aufgelöst und analysiert werden kann (Kapitel 5, Abbildung 5.2). Dieser Faltungsprozess  $M \rightarrow \{I\}_{mg}$  beginnt mit dem RNA-Ensemble, für welches die größte konformationelle Dynamik angenommen werden kann (Kapitel 4). Zusätzlich ist für  $Gsw^{loop}$  bei  $[RNA]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnissen  $<1:18$  zwar Ligand-Bindungskompetenz zu beobachten, allerdings ist die interhelikale Tertiärstruktur nicht stabil ausgebildet (Kapitel 4). Aufgrund dieser Ergebnisse wird angenommen, dass die  $Mg^{2+}$ -induzierten Faltungsprozesse, die von einem RNA-Ensemble ausgehen, das durch stabil ausgebildete interhelikale Tertiärinteraktionen charakterisiert ist ( $N^*$ ) und/oder in einen Endzustand übergehen, der im Vergleich zum konformationellen RNA-Ensemble  $\{I\}_{mg}$  einen höheren Grad der strukturellen Kompaktheit aufweist ( $N^*_{mg}$ ,  $I^*_{mg}$ ), eine Aktivierungsbarriere besitzen, die vergleichbar oder sogar kleiner ist. Damit kann für die entsprechenden Übergänge ebenfalls eine schnelle Kinetik angenommen werden, und möglicherweise vorhandene Unterschiede können mittels zeitaufgelöster NMR-Untersuchungen hier nicht zuverlässig bestimmt werden.

Die Darstellung der Freien Aktivierungsenthalpie des spezifischen Ligand-Bindungsprozesses  $\Delta G^\ddagger(\text{Ligand})$  ausgehend von konformationellen RNA-Ensembles mit stabil ausgebildeten interhelikalen Tertiärinteraktionen in Gegenwart hoher  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen ( $N^*_{mg} \rightarrow K^*_{mg}$ ,  $I^*_{mg} \rightarrow K^*_{mg}$ ), begründet sich auf den Ergebnissen der entsprechenden zeitaufgelösten NMR-Untersuchungen. Diese zeigten sowohl für die  $Gsw^{apt}$ -RNA als auch für die  $Gsw^{loop}$ -RNA in Gegenwart der entsprechenden  $Mg^{2+}$ -Konzentration jeweils eine schnelle Kinetik der RNA-Ligand Komplexbildung (Kapitel 5, Abbildungen 5.1 und 5.5). Für die jeweils zu Grunde liegenden Prozesse können mögliche individuelle Unterschiede mittels zeitaufgelöster NMR-Spektroskopie nicht aufgelöst werden, so dass die Freie Aktivierungsenthalpie  $\Delta G^\ddagger(\text{Ligand})$  der entsprechenden Übergänge schematisch gleich dargestellt ist.

Sofern in der freien RNA-Konformation von  $Gsw^{loop}$  die interhelikale Tertiärstruktur nicht stabil ausgebildet ist ( $\{I\}_{mg}$ ), ist die Kinetik der Ligandbindung ( $\{I\}_{mg} \rightarrow \{K^*\}_{mg}$ ) stark abhängig vom jeweilig vorliegenden  $[RNA]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnis (Kapitel 5, Abbildungen 5.5 und 5.6). Diese Beobachtung wird schematisch durch ein konformationelles RNA-Ensemble beschrieben, dessen Eigenschaften  $Mg^{2+}$ -abhängig sind (gekennzeichnet durch:  $\{\}$ ). Die in Abhängigkeit der  $Mg^{2+}$ -Konzentration variierende Geschwindigkeitskonstante des jeweiligen spezifischen Ligand-Bindungsprozesses impliziert entsprechende Unterschiede der jeweiligen Freie Aktivierungsenthalpie  $\Delta G^\ddagger(\text{Ligand})$  (Abbildung 5.9a).



**Abbildung 5.9:** Schematisch zusammengefasste Darstellung der ermittelten statischen, thermodynamischen und kinetischen RNA-Strukturen und -Faltungsprozesse von Gsw<sup>apt</sup> und Gsw<sup>loop</sup> (G37A/C61U-Mutante) in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit von Mg<sup>2+</sup> oder des Liganden (*I*: Intermediat (Gsw<sup>loop</sup> in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup>), *M*: Mutante im freien Zustand (Gsw<sup>loop</sup> in Abwesenheit von Mg<sup>2+</sup> ohne stabile Tertiärinteraktionen), *N*: native Struktur (Gsw<sup>apt</sup> im Ligand-freien Zustand), {*N*\**L*}: RNA-Ensemble, für welches die Faltung der Ligand-Bindungsregion bereits der nativen Struktur entspricht (Kapitel 3), *K*: RNA-Ligand Komplex, *U*: nicht-spezifischer Ligand-Bindungsprozess (blau hinterlegt), (\*): stabil ausgebildete interhelikale Tertiärinteraktion, *mg*: RNA-Mg<sup>2+</sup>-Interaktionen, {}): konformationelles RNA-Ensemble, dessen Eigenschaften von der Mg<sup>2+</sup>-Konzentration abhängig sind); **a)** Schematische Energiediagramme der Cofaktor-abhängigen Strukturen und -Faltungsprozesse der Guanin Riboswitch Aptamerdomänen Gsw<sup>apt</sup> (*links*) und Gsw<sup>loop</sup> bei [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnissen >1:18 (*mitte*) und <1:18 (*rechts*). Die Darstellung struktureller Eigenschaften der jeweiligen konformationellen RNA-Ensembles basiert auf statischen NMR-spektroskopischen Untersuchungen. Die schematisch dargestellten energetischen Unterschiede der RNA-Konformationen stellen die mittels CD- und NMR-Spektroskopie ermittelten thermischen Stabilitätsunterschiede dar, während die Energiebarrieren durch die Unterschiede der jeweiligen Kinetiken in zeitaufgelösten NMR-Untersuchungen definiert werden (siehe Text); **b)** Schematische (zweidimensionale) Darstellung eines Faltungstrichters, dessen Breite das Maß der Entropie der RNA-Ensembles charakterisiert, wohingegen in Abhängigkeit der Strukturierung der RNA bzw. des Grades der strukturellen Kompaktheit die energetische Stabilisierung bestimmt wird (siehe Text).

Für Gsw<sup>loop</sup> ist der erste, schnelle Mg<sup>2+</sup>-induzierte Faltungsprozess nicht strikt mit der stabilen Ausbildung des interhelikalen Tertiärstrukturelementes gekoppelt, führt aber dennoch zu einem Ligand-bindungskompetenten konformationellen RNA-Ensemble. Dies spricht für einen obligatorischen Schritt dieser ersten schnellen Faltungsphase während der *in vitro* Transkription, initiiert und abhängig von der physiologisch verfügbare Mg<sup>2+</sup>-Konzentration. Der Mg<sup>2+</sup>-induzierte Faltungsprozess stellt somit für die Guanin Riboswitch Aptamerdomäne einen schnellen Faltungsschritt dar, der zu der Ausbildung eines Ligand-bindungskompetenten Intermediat-RNA-Ensembles führt. Bei dem Mg<sup>2+</sup>-initiierten Faltungsprozess könnte es sich um eine generelle elektrostatische Kompensation bzw. eine Sättigung spezifischer Mg<sup>2+</sup>-Bindungsstellen handeln, welche die konformationelle Dynamik des RNA-Ensembles verändert. Dies könnte möglicherweise eine Einschränkung der Dynamik des konformationellen RNA-Ensembles hin zu transient populierte RNA-Konformationen mit interhelikalen Tertiärkontakten beinhalten, die, wie am Beispiel der Gsw<sup>loop</sup>-RNA gezeigt werden konnte, ein essentielles Intermediat des Faltungsprozesses repräsentieren.

Die Eigenschaften des durch die Assoziation von Mg<sup>2+</sup>-Ionen stabilisierten konformationellen RNA-Ensembles bestimmen im Folgenden die Geschwindigkeit der spezifischen RNA-Ligand Komplexbildung. Eine Mg<sup>2+</sup>-Abhängigkeit der Kinetik der spezifischen RNA-Ligand Komplexbildung konnte sowohl für Gsw<sup>apt</sup> als auch für Gsw<sup>loop</sup> beobachtet werden. Kinetische Untersuchungen der spezifischen Ligandbindung und der damit verbundenen RNA-Faltungsprozesse der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne Gsw<sup>apt</sup> ergaben, dass die Geschwindigkeit dieser Prozesse in Gegenwart von zusätzlichen Cofaktoren (Mg<sup>2+</sup> oder Spermidin<sup>3+</sup>) wesentlich zunimmt. Für die Gsw<sup>loop</sup>-RNA konnte die spezifische Ligandbindung ausschließlich in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup>-Ionen beobachtet werden. Die Eigenschaften des Mg<sup>2+</sup>-abhängigen Intermediat-RNA-Ensembles bestimmen dabei für Gsw<sup>loop</sup> die Geschwindigkeit der spezifischen RNA-Ligand Komplexbildung. In zeitaufgelösten NMR-Untersuchungen konnten in Abhängigkeit des jeweils vorliegenden [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnisses signifikante Unterschiede der Kinetik der RNA-Faltungsprozesse ermittelt werden.

Die kompakteste Struktur und somit die schnellste Kinetik der Ligandbindung konnte für Gsw<sup>apt</sup> in Gegenwart der Cofaktoren Mg<sup>2+</sup> oder Spermidin und für Gsw<sup>loop</sup> in Gegenwart hoher Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen beobachtet werden. Unter diesen Bedingungen sind die globalen Eigenschaften des RNA-Ensembles durch die Ausbildung der interhelikalen Tertiärstruktur und die elektrostatische Kompensation bzw. Sättigung der Mg<sup>2+</sup>-Bindungsstellen definiert. Für Gsw<sup>apt</sup> in Abwesenheit von Mg<sup>2+</sup> ist zwar die interhelikale Tertiärstruktur ausgebildet, die

Anordnung der Helices P2 und P3 ist aber nicht maximal eng gepackt und die ermittelte Kinetik der Ligandbindung findet auf einer langsameren Zeitskala statt. Für die Mutante Gsw<sup>loop</sup> ist bei [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnissen <1:18 dann wiederum auch das interhelikale Tertiärstrukturelement nicht ausgebildet, was zu stark ausgeprägten Veränderungen der Eigenschaften des RNA-Ensembles und infolge langsamen Kinetiken der Ligandbindung führt. Das jeweilig vorliegende [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnis bestimmt dabei die Geschwindigkeit der spezifischen Ligandbindung. Die Beobachtung der Mg<sup>2+</sup>-abhängigen Ligand-induzierten Faltungsprozesse lässt vermuten, dass Mg<sup>2+</sup> die Ligand-freien RNA-Konformationen in unterschiedlichem Maße stabilisiert, und dass die Erhöhung des [RNA]:[Mg<sup>2+</sup>]-Verhältnisses zu einem höheren Grad an struktureller Kompaktheit führt. Ein Modell hierfür könnte durch die Neutralisierung des Phosphatrückgrates der Helices bzw. Nukleotide der Ligand-Bindungsregion und Sättigung der spezifischen Mg<sup>2+</sup>-Bindungsstellen mit steigender Mg<sup>2+</sup>-Konzentration beschrieben werden, welche im Folgenden die Wahrscheinlichkeit deren paralleler bzw. kompakter Anordnung erhöht. Durch ein weniger definiertes konformationelles RNA-Ensemble variiert der entropische Beitrag zur Faltung und die Freie Aktivierungsenthalpie des Prozesses ist erhöht. Dies führt dann möglicherweise im Folgenden zu langsameren Ligand-induzierten Faltungsprozessen. In anderen Worten, je ähnlicher die Eigenschaften des konformationellen RNA-Ensembles des Ausgangszustandes denjenigen der nativen, kompakten Struktur des RNA-Ligand Komplexes sind, desto schneller ist die Kinetik der Ligandbindung. Der Grad der strukturellen Kompaktheit wird dabei wesentlich sowohl von intramolekularen RNA-RNA-Interaktionen als auch von RNA-Mg<sup>2+</sup>-Interaktionen definiert (Abbildung 5.9b).

Die zeitaufgelösten NMR-Untersuchungen der Guanin Riboswitch Aptamerdomänen Gsw<sup>apt</sup> und Gsw<sup>loop</sup> und deren Mg<sup>2+</sup>-Abhängigkeiten zeigen, dass die Geschwindigkeit des Ligand-Bindungsprozesses sensitiv reguliert ist und wesentlich abhängig von strukturellen und Kationen-induzierten Eigenschaften des RNA-Ensembles der Ligand-freien Konformation. Die Zeitskala des spezifischen Bindungsprozesses korreliert dabei mit dem Grad der Strukturierung und der Stabilität der RNA-RNA-Interaktionen des Ausgangszustandes. Die NMR-Untersuchungen zeigen, dass die interhelikale Tertiärinteraktion und RNA-Mg<sup>2+</sup>-Interaktionen nicht nur die Stabilität der RNA-Struktur bestimmen, sondern auch die Kinetik des Ligand-Bindungsprozesses wesentlich beeinflussen. Für die Mutante Gsw<sup>loop</sup> hat der erste Mg<sup>2+</sup>-induzierte Faltungsprozess und die Eigenschaften des Intermediat-RNA-Ensembles einen signifikanten Einfluss auf den darauf folgenden spezifischen Ligand-Bindungsprozess. Die biologische Funktion des interhelikalen Tertiärstrukturelementes der Guanin Riboswitch-RNA

könnte möglicherweise dadurch definiert werden, dass durch dessen Ausbildung die generelle Möglichkeit alternativer Faltungswege reduziert wird und es somit ein 'Hilfs-Strukturmotiv' darstellt, um die akkurate und spezifische, globale Faltung zu gewährleisten und damit die lokale Faltung der RNA und die Ligandbindung zu ermöglichen.

## LITERATUR

1. Woodson, S.A. (2010) Compact intermediates in RNA folding. *Annu. Rev. Biophys.*, **39**, 61-77.
2. Brion, P., Westhof, E. (1997) Hierarchy and dynamics of RNA folding. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **26**, 113-37.
3. Draper, D.E., Grilley, D., Soto, A.M. (2005) Ions and RNA folding. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **34**, 221-43.
4. Thirumalai, D., Hyeon, C. (2005) RNA and protein folding: common themes and variations. *Biochemistry*, **44**, 4957-70.
5. Garst, A.D., Batey, R.T. (2009) A switch in time: detailing the life of a riboswitch. *Biochim. Biophys. Acta* **1789**, 584-91.
6. Mandal, M., Breaker, R.R. (2004) Gene regulation by riboswitches. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 451-63.
7. Winkler, W.C., Breaker, R.R. (2003) Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *ChemBiochem*, **4**, 1024-32.
8. Winkler, W.C., Breaker, R.R. (2005) Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annu. Rev. Microbiol.*, **59**, 487-517.
9. Batey, R.T., Gilbert, S.D., Montange, R.K. (2004) Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine. *Nature*, **432**, 411-5.
10. Serganov, A., Yuan, Y.R., Pikovskaya, O., Polonskaia, A., Malinina, L., Phan, A.T., Hobartner, C., Micura, R., Breaker, R.R., Patel, D.J. (2004) Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs. *Chem. Biol.*, **11**, 1729-41.
11. Chauhan, S., Woodson, S.A. (2008) Tertiary interactions determine the accuracy of RNA folding. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 1296-303.
12. Buck, J. (2005) Chemische, biochemische und NMR-spektroskopische Untersuchungen der Kinetik der ligandinduzierten Umfaltung von Riboswitch-RNA. Diplomarbeit, J.W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

13. Koculi, E., Lee, N.-K., Thirumalai, D., Woodson, S.A. (2004) Folding of the Tetrahymena ribozyme by polyamines: importance of counterion valence and size. *J. Mol. Biol.*, **341**, 27-36.
14. Koculi, E., Hyeon, C., Thirumalai, D., Woodson, S.A. (2007) Charge density of divalent metal cations determines RNA stability. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 2676-82.
15. Schlatterer, J.C., Kwok, L.W., Lamb, J.S., Park, H.Y., Andresen, K., Brenowitz, M., Pollack, L. (2008) Hinge stiffness is a barrier to RNA folding. *J. Mol. Biol.*, **379**, 859-70.
16. Moghaddam, S., Caliskan, G., Chauhan, S., Hyeon, C., Briber, R.M., Thirumalai, D., Woodson, S.A. (2009) Metal ion dependence of cooperative collapse transitions in RNA. *J. Mol. Biol.*, **393**, 753-64.
17. Heilman-Miller, S.L., Thirumalai, D., Woodson, S.A. (2001) Role of counterion condensation in folding of the Tetrahymena ribozyme. I. Equilibrium stabilization by cations. *J. Mol. Biol.*, **306**, 1157-66.
18. Heilman-Miller, S.L., Pan, J., Thirumalai, D., Woodson, S.A. (2001) Role of counterion condensation in folding of the Tetrahymena ribozyme. II. Counterion-dependence of folding kinetics. *J. Mol. Biol.*, **309**, 57-68.
19. Childs, A.C., Mehta, D.J., Gerner, E.W. (2003) Polyamine-dependent gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 1394-406.
20. Igarashi, K., Kashiwagi, K. (2000) Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **271**, 559-64.
21. Koculi, E., Thirumalai, D., Woodson, S.A. (2006) Counterion charge density determines the position and plasticity of RNA folding transition states. *J. Mol. Biol.*, **359**, 446-54.
22. Noeske, J., Buck, J., Fürtig, B., Nasiri, H.R., Schwalbe, H., Wöhnert, J. (2007) Interplay of 'induced fit' and preorganization in the ligand induced folding of the aptamer domain of the guanine binding riboswitch. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 572-83.
23. Thirumalai, D., Lee, N., Woodson, S.A., Klimov, D. (2001) Early events in RNA folding. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **52**, 751-62.
24. Russell, R., Millett, I.S., Tate, M.W., Kwok, L.W., Nakatani, B., Gruner, S.M., Mochrie, S.G.J., Pande, V., Doniach, S., Herschlag, D., Pollack, L. (2002) Rapid compaction during RNA folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4266-71.
25. Das, R., Kwok, L.W., Millett, I.S., Bai, Y., Mills, T.T., Jacob, J., Maskel, G.S., Seifert, S., Mochrie, S.G.J., Thiyagarajan, P., Doniach, S., Pollack, L., Herschlag, D. (2003) The fastest global events in RNA folding: electrostatic relaxation and tertiary collapse of the Tetrahymena ribozyme. *J. Mol. Biol.*, **332**, 311-9.
26. Kwok, L.W., Shcherbakova, I., Lamb, J.S., Park, H.Y., Andresen, K., Smith, H., Brenowitz, M., Pollack, L. (2006) Concordant exploration of the kinetics of RNA folding from global and local perspectives. *J. Mol. Biol.*, **355**, 282-93.

27. Takamoto, K., Das, R., He, Q., Doniach, S., Brenowitz, M., Herschlag, D., Chance, M.R. (2004) Principles of RNA compaction: insights from the equilibrium folding pathway of the P4-P6 RNA domain in monovalent cations. *J. Mol. Biol.*, **343**, 1195-206.
28. Maglott, E.J., Glick, G.D. (1997) A new method to monitor the rate of conformational transitions in RNA. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3297-301.
29. Li, P.T., Vieregge, J., Tinoco, I., Jr. (2008) How RNA unfolds and refolds. *Annu. Rev. Biochem.*, **77**, 77-100.
30. Ellis-Davies, G.C., Barsotti, R.J. (2006) Tuning caged calcium: photolabile analogues of EGTA with improved optical and chelation properties. *Cell Calcium*, **39**, 75-83.
31. Faas, G.C., Karacs, K., Vergara, J.L., Mody, I. (2005) Kinetic properties of DM-nitrophen binding to calcium and magnesium. *Biophys J.*, **88**, 4421-33.
32. Kaplan, J.H., Ellis-Davies, G.C. (1988) Photolabile chelators for the rapid photorelease of divalent cations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 6571-5.
33. Gueron, M., Leroy, J.L. (1982) Significance and mechanism of divalent-ion binding to transfer RNA. *Biophys J.*, **38**, 231-6.
34. Reid, S.S., Cowan, J.A. (1990) Biostructural chemistry of magnesium ion: characterization of the weak binding sites on tRNA<sup>Phe</sup>(yeast). Implications for conformational change and activity. *Biochemistry*, **29**, 6025-32.
35. Ayer, R.K., Jr., Zucker, R.S. (1999) Magnesium binding to DM-nitrophen and its effect on the photorelease of calcium. *Biophys J.*, **77**, 3384-93.
36. Pan, J., Woodson, S.A. (1999) The effect of long-range loop-loop interactions on folding of the Tetrahymena self-splicing RNA. *J. Mol. Biol.*, **294**, 955-65.



# KAPITEL 6

NMR-SPEKTROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG  
VON STRUKTUR UND KATALYSE DES  
*ADENIN-ABHÄNGIGEN HAIRPIN RIBOZYMS*

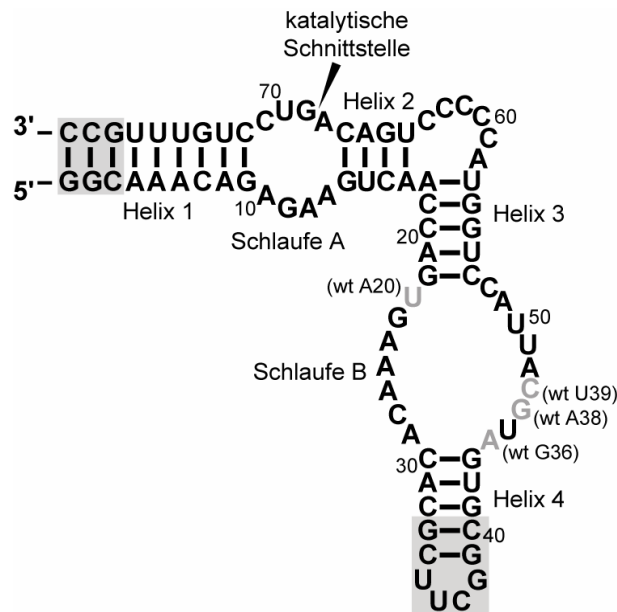
## EINLEITUNG

Katalytische und regulatorische RNA-Motive, zu welchen unter anderem natürlich vorkommende Ribozyme und Riboswitch-RNAs zählen, können ihre zelluläre Funktionen ohne eine initiale Beteiligung von Proteinen ausüben und unterstreichen damit die funktionelle Bedeutung von RNAs im zellulären Kontext. Selbstspaltende Ribozym-Motive katalysieren beispielsweise die Prozessierung von Satelliten-, Virus- oder Viroiden-RNAs; die Regulation der Genexpression in Abhängigkeit der Bindung eines spezifischen Liganden stellt die zelluläre Funktion von Riboswitch-RNAs dar. Das *glmS* Ribozym wiederum repräsentiert eine katalytische Riboswitch-RNA, für die Genregulation über eine Spaltreaktion des RNA-Phosphatrückgrates in Gegenwart des spezifischen Liganden Glucosamin-6-Phosphat (GlcN6P) kontrolliert wird. Damit unterstreichen diese RNA-Motive die Bedeutung von RNA-Ligand-Wechselwirkungen für das funktionelle und mechanistische Verständnis zellulärer Prozesse.

Unter den selbstspaltenden katalytischen Ribozym-Motiven (siehe Kapitel 1) ist für die hier vorgestellte Arbeit das *hairpin ribozyme* der *tobacco ringspot virus satellite* (TRSV) RNA von speziellem Interesse. Das Wildtyp *hairpin* Ribozym-Motiv ist aus zwei Domänen aufgebaut, die eine Vierwege-Kreuzung bilden. Allerdings wurde auch in einem Minimalkonstrukt des Ribozyms mit einer Zweifur-Kreuzung katalytische Aktivität beobachtet (1). Jede der beiden Domänen besteht aus einer internen Schlaufe mit jeweils zwei flankierenden helikalen Elementen. Die Ausbildung eines intramolekularen Kontaktes der beiden Domänen wurde als essentielle Voraussetzung für katalytische Aktivität ermittelt (2, 3).

Um den Beitrag von Cofaktoren für die Funktion katalytischer RNA-Motive zu untersuchen und damit zum Verständnis RNA-vermittelter zellulärer Prozesse beizutragen, identifizierten Maurel und Mitarbeiter ausgehend vom Wildtyp *hairpin* Ribozym-Motiv neue Ribozym-Mutanten, die ihre zuvor durch die Mutationen eingebüßte katalytische Aktivität durch die Zugabe des externen Cofaktors Adenin wiedererlangen (4). Adenin wurde als Cofaktor ausgewählt, da es sowohl eine potentiell prebiotische Verbindung darstellt als auch in verschiedensten modernen zellulären Prozessen eine zentrale Funktion einnimmt, wie beispielsweise als Motiv in AMP (Adenosinmonophosphat), ATP (Adenosintriphosphat), FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid), NAD (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) oder CoA (Coenzym A) (5). Weiterhin stellt Adenin eine der vier kanonischen Nukleobasen in DNA und RNA dar und ist selbst in regulatorische Prozesse involviert wie beispielsweise in die Genregulation durch

Riboswitch-RNA-Elemente. Hierbei sind für den Metaboliten Adenin Regulationsmechanismen sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene bekannt (6).



**Abbildung 6.1:** Sekundärstruktur des ADHR1-nmr Ribozym-Motivs (Position der katalytischen Schnittstelle in Schlaufe A); zusätzliche Basenpaare im Vergleich zu dem RNA-Konstrukt ADHR1 (4) sind grau hinterlegt; Nukleotide, die im Vergleich zum Wildtyp *hairpin ribozyme* mutiert wurden, sind grau eingefärbt. Die entsprechenden Nukleotide der Wildtyp *hairpin ribozyme* Sequenz und ihre jeweilige Sequenzposition sind dabei in Klammern angegeben.

Diese neuen Ribozym-Mutanten, die so genannten ‘Adenin-abhängigen Hairpin Ribozym’-Motive (*adenine-dependent hairpin ribozyme*, ADHR), wurden *in vitro* durch ein SELEX- (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) Verfahren (7, 8) identifiziert. Die Sekundärstruktur der ADHR Ribozym-Motive basiert auf derjenigen des Minimalkonstruktes des Wildtyp *hairpin* Ribozym-Motivs. Die ADHR RNA-Konstrukte sind aus vier Helices (Helices 1-4) aufgebaut, die durch zwei Schlaufen-Regionen (Schlaufen A und B) getrennt werden. Die beiden Domänen sind durch eine Cytidin-reiche Sequenz miteinander verbunden. Das in dieser Arbeit untersuchte RNA-Konstrukt ADHR1-nmr weist 80 Nukleotide auf und basiert auf dem bereits von Maurel und Mitarbeitern biochemisch charakterisierten RNA-Konstrukt ADHR1 (4). Helices 1 und 4 wurden im RNA-Konstrukt ADHR1-nmr durch Einfügen zusätzlicher GC-Basenpaare stabilisiert, zudem besitzt Helix 4 eine apikale Schlaufe der Sequenz 5'-UUCG-3' (Abbildung 6.1). Die vier Mutationen, die im Vergleich zum *hairpin ribozyme* identifiziert werden

können, befinden sich in der Schlaufe B an den Sequenzpositionen 23 (A20wt→U), 44 (G36wt→A), 46 (A38wt→G) und 47 (U39wt→C). Damit bleibt die katalytische Schnittstelle, die in der Schlaufe A lokalisiert ist, im Vergleich zum Wildtyp *hairpin ribozyme* unverändert. Vorangegangene Untersuchungen an ADHR Ribozym-Motiven zeigten, dass insbesondere die Cofaktoren Adenin und  $Mg^{2+}$  die katalytische Aktivität und Effizienz dieser Ribozym-Motive bestimmen (4).

Für das minimale Wildtyp *hairpin ribozyme* konnten verschiedene sequentielle Nukleotide und Sekundärstruktur motive identifiziert werden, die essentiell für dessen katalytische Aktivität sind (9). Der Vergleich des ADHR1-nmr Ribozyms mit den Analysen der Struktur-Funktions-Beziehungen des *hairpin ribozyme* lässt vermuten, dass der Verlust der katalytischen Aktivität für ADHR1-nmr ein Effekt der Mutation an Position 46 (A38wt→G) ist. Während Mutationsstudien ergaben, dass den Nukleotiden an den drei entsprechenden Sequenzpositionen 20wt, 36wt und 39wt keine besondere Bedeutung für die katalytische Aktivität des *hairpin ribozyme* zukommt (9), zeigten im Gegensatz dazu verschiedene Untersuchungen die Relevanz der strukturellen und katalytischen Beiträge des Nukleotids A38wt (9-12). Sobald beispielsweise im *hairpin ribozyme* das Nukleotid A38wt durch ein Guanosin ersetzt wird, was entsprechend auch im ADHR1-nmr Ribozym der Fall ist, kann ein  $10^4$ -facher Aktivitätsverlust beobachtet werden (10). Die Analyse der Architektur des aktiven Zentrums in Kristallstrukturen des *hairpin ribozyme* zeigt außerdem, dass ein Guanosin an Position 38 die lokale Geometrie hier stark beeinflusst (11).

## MATERIAL UND METHODEN

### RNA-Konstrukte

Die nicht-isotopenmarkierten und <sup>15</sup>N-markierten ADHR1-nmr RNA-Proben wurden von Dr. Marie-Christine Maurel (Universität Pierre & Marie Curie, Paris) zur Verfügung gestellt. Das hier untersuchte RNA-Konstrukt ADHR1-nmr entspricht folgender Sequenz:

5'-**GGCAAACAGAGAAGUCAACCAGUGAAACACACGCUUCGGCGUGAUGCAUUAC**  
CUGGUACCCCCUGACAGUCCUGUUU**GCC**-3'

Diese RNA-Sequenz basiert auf dem bereits von Maurel und Mitarbeitern untersuchten RNA-Konstrukt ADHR1 (4), das durch Einfügen der hier hervorgehobenen Nukleotide für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen zusätzlich stabilisiert wurde.

RNA-Sequenz	Extinktionskoeffizient [l*mol <sup>-1</sup> *cm <sup>-1</sup> ]	Sekundärstrukturvorhersage nach <i>Mfold</i>
Modell-RNA-Konstrukt 1: 5'-CACGCUUCGGCGUG-3'	122 200	<pre>           U C                       C-G C-G                     A-U C-G                       C           </pre>
Modell-RNA-Konstrukt 2: 5'-ACCAGUGACCUGGU-3'	136 400	<pre>           U G A                         A-G C A-U                       A-U C-G C                         C C           </pre>
Modell-RNA-Konstrukt 3: 5'-UGACAUCAGUCA-3'	123 200	<pre>           U C                       A-C G-A                     U-A G-C                       A           </pre>

**Tabelle 6.1:** Modell-RNA-Konstrukte 1-3.

Die zur Vervollständigung der NMR-spektroskopischen Resonanzzuordnung verwendeten Modell-RNA-Konstrukte wurden von Dharmacon (Boulder) bezogen und aufgereinigt wie in Kapitel 2 beschrieben. Es handelte sich hierbei um die in Tabelle 6.1 dargestellten RNA-Sequenzen, deren Sekundärstrukturen mit dem Programm *Mfold* (13) überprüft wurden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels UV-Spektroskopie.

Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden, entsprechend den zuvor in biochemischen Studien eingesetzten experimentellen Bedingungen (4), unter folgenden

Pufferbedingungen durchgeführt: 40 mM HEPES, pH~7.5, 6 mM MgCl<sub>2</sub> (sofern nicht anders angegeben). Die NMR-Proben enthielten dabei jeweils 10% D<sub>2</sub>O (v/v) (sofern nicht anders angegeben).

### **Untersuchung der Salzabhängigkeit der RNA-Spaltreaktion mittels denaturierender PAGE**

Die Salzabhängigkeit der Adenin-induzierten Spaltreaktion der ADHR1-nmr RNA wurde unter denaturierenden Bedingungen mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) untersucht. Die entsprechenden Experimente wurden im Rahmen der Zusammenarbeit von Dr. M.-C. Maurel und Mitarbeitern (Universität Pierre & Marie Curie, Paris) durchgeführt. Da die Ergebnisse zum Gesamtverständnis der katalytischen Aktivität des ADHR1-nmr Ribozyms beitragen und zur Interpretation der NMR-spektroskopisch erhaltenen Ergebnisse herangezogen wurden, werden die Reaktionsbedingungen hier kurz dargestellt.

Die RNA (1 µM) wurde zur Induktion einer homogenen, monomeren Konformation einem Faltungsprotokoll unterzogen. Die RNA-Proben wurden zunächst für 1 min auf 90°C erhitzt und im Folgenden mit einer Rate von 3°C/min auf 23°C abgekühlt. Das entsprechende Salz (6 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 M NaCl oder 24 mM [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]Cl<sub>3</sub>) wurde zugegeben, und die Reaktion anschließend durch die Zugabe von Adenin (4 mM) induziert. Die Konzentrationsangaben entsprechen dabei den finalen Konzentrationen der Reaktionsmischung unter folgenden Pufferbedingungen: 40 mM HEPES, pH~7.5. Zur Untersuchung der Kinetik der Spaltung wurden nach definierten Zeitabschnitten Proben entnommen, und die Reaktion darin durch die Zugabe von einem Volumen einer Lösung von 30 mM EDTA, 80% Formamid und 0.012% Xylencyanol abgebrochen. Die Bildung der RNA-Spaltprodukte wurde anschließend mittels 10%iger denaturierender PAGE analysiert. Die UV-Visualisierung der RNA-Fragmente erfolgte durch Anfärbung mit einer Ethidiumbromid-Lösung. Die Quantifizierung der RNA-Banden wurde mittels NIH Software vorgenommen.

### **Zeitaufgelöste NMR-Experimente**

Die Aufnahme der Kinetik der Adenin-induzierten Spaltung von ADHR1-nmr erfolgte in ein- und zweidimensionalen zeitaufgelösten NMR-Experimenten. Die Zeitskala der Spaltung ermöglichte eine Initiierung der Reaktion durch die manuelle Zugabe von Adenin. Der Vergleich der NMR-Spektren vor und direkt nach der Zugabe ergab eine vollständige Deckung der Spektren und zeigte damit, dass die entstandene Reaktionszeit von ca. 2 min für die

Untersuchung der Kinetik nicht relevant war. Die hier untersuchten, durch die Spaltung hervorgerufenen strukturellen Änderungen konzentrierten sich auf die Iminoprotonensignale der RNA, die im spektralen Bereich von 10-15 ppm ( $^1\text{H}$  chemische Verschiebung) zur Resonanz kommen.

Die experimentellen Bedingungen, unter denen die Kinetik in eindimensionalen (1D) NMR-Experimenten aufgenommen wurde, setzten bei der Größe dieser RNA (80nt) für ein gutes *Signal-zu-Rausch* Verhältnis eine Mindestkonzentration der RNA von ca. 200  $\mu\text{M}$  voraus. Die Konzentrationen der weiteren Reaktionskomponenten basierten auf in biochemischen Studien von Dr. M.-C. Maurel und Mitarbeitern optimierten Bedingungen. Damit ergaben sich die Reaktionsparameter wie folgt: ADHR1-nmr (220  $\mu\text{M}$ ), Adenin (5.6 mM),  $\text{MgCl}_2$  (6 mM), 298 K (Pufferbedingungen: 40 mM HEPES,  $\text{pH}\sim 7.5$ ).

Zur Aufnahme der 1D NMR-Spektren wurden Pulsprogramme mit *jump-return-echo* Sequenzen (14) verwendet. Die kinetischen Daten wurden als pseudo-2D Experiment (800 MHz) mit einer Zeitauflösung von 4.25 min/1D Spektrum (mit jeweils 128 Scans) aufgenommen. Die Prozessierung und Analyse der Daten erfolgte mit der Software TopSpin 2.1 und SigmaPlot 11.0. Durch die Analyse der zeitabhängigen spektralen Signalveränderungen (hier: Signalintensitäten) wurden die Geschwindigkeitskonstanten  $k$  [ $\text{min}^{-1}$ ] für die individuellen Iminoprotonensignale ermittelt. Die Daten wurden normiert und mittels einer monoexponentiellen Fit-Funktion analysiert. Die Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  [min] wurden mit Hilfe der Funktion für einen Prozess erster Ordnung erhalten ( $t_{1/2}=\ln 2/k$ ).

Die zweidimensionalen (2D) Kinetiken wurden mit einer  $^{15}\text{N}$ -markierten RNA der gleichen Endkonzentration ( $^{15}\text{N}$ -ADHR1-nmr: 220  $\mu\text{M}$ ), allerdings in Gegenwart einer erhöhten  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration aufgenommen. Die weiteren experimentellen Bedingungen waren wie folgt: Adenin (5.6 mM),  $\text{MgCl}_2$  (10 mM), 298 K (Pufferbedingungen: 40 mM HEPES,  $\text{pH}\sim 7.5$ ). Das Pulsprogramm zur Aufnahme der zeitlich aufeinander folgenden  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren basierte auf einer SOFAST- (*band-selective optimized flip-angle short-transient*) HMQC-Sequenz (15), die für die Aufnahme der Kinetik als pseudo-3D Experiment modifiziert wurde. Die NMR-spektroskopischen Bedingungen (800 MHz) wurden wie folgt gewählt:  $d_1 \sim 0.1$  s, Akquisitionszeit  $\sim 58$  ms, Anzahl der Scans  $\sim 16$ , Anzahl der Punkte in der  $^1\text{H}$ -Dimension: 2048, bei einer spektralen Weite von 22 ppm, Anzahl der Punkte in der  $^{15}\text{N}$ -Dimension: 80, bei einer spektralen Weite von 20 ppm (Angaben entsprechen jeweils der Bruker-Nomenklatur). Dadurch konnte eine Zeitauflösung von 4.64 min/2D Spektrum erreicht werden. Die Zugabe des Liganden Adenin zur Reaktionsinitiierung erfolgte auch bei der Aufnahme der 2D Kinetiken manuell. Die Prozessierung und Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software TopSpin

2.1, dem Programm SPARKY (16) und SigmaPlot 11.0 analog der beschriebenen Auswertung der 1D Kinetiken.

### **Bestimmung von NMR-Linienbreiten**

Die NMR-Experimente zur Bestimmung der Ligand-Linienbreiten wurden mit verschiedenen [RNA]:[Ligand]-Verhältnissen von 5:1, 1:1 und 1:25 durchgeführt. Dabei lag die RNA nicht-isotopenmarkiert vor, während der Ligand Adenin  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markiert war (Kapitel 2). Die Ligand-Linienbreiten ( $\Gamma^{1/2}$  [Hz]) wurden aus  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC oder  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren extrahiert und mittels Dekonvolution, wie im Programm TopSpin 2.1 implementiert, analysiert. Die Linienbreiten ( $\Gamma^{1/2} (^1\text{H})$  [Hz]) der RNA-Iminoprotonensignale wurden in  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren einer  $^{15}\text{N}$ -markierten RNA in den entsprechenden konformationellen Zuständen (i) ohne  $\text{Mg}^{2+}$ , (ii) in Gegenwart von  $\text{Mg}^{2+}$  und (iii) nach der Spaltreaktion, d.h. in Anwesenheit von  $\text{Mg}^{2+}$  und Adenin bestimmt.

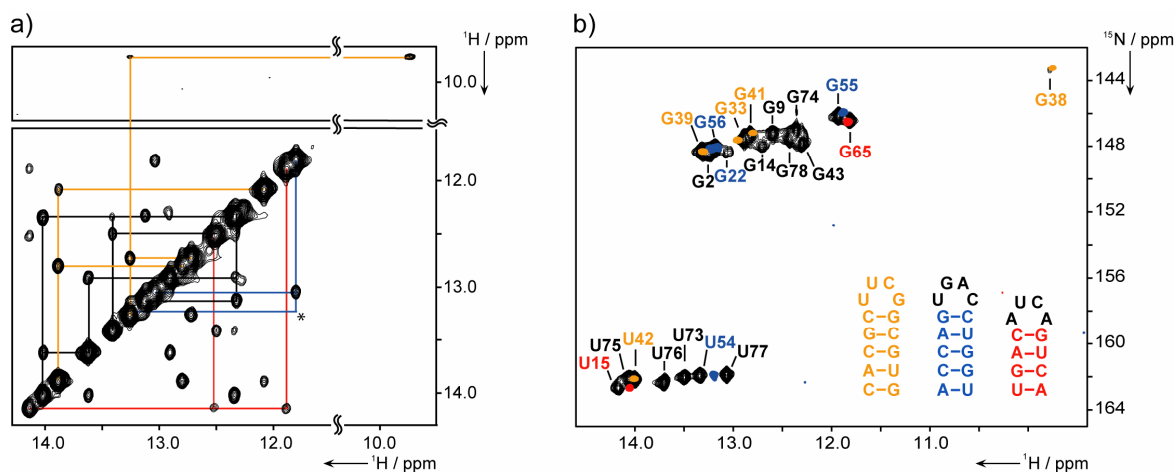


## ERGEBNISSE

### Charakterisierung der RNA-Konformation vor der katalytischen Spaltreaktion

Die strukturelle Charakterisierung der 80nt-RNA ADHR1-nmr basierte auf der NMR-spektroskopischen Resonanzzuordnung der Iminoprotonensignale. Unter Voraussetzung dieser Resonanzzuordnung sollte die hohe Sensitivität der chemischen Verschiebung und Intensität dieser Reportersignale ausgenutzt werden, um eventuelle strukturelle Konformationsänderungen auf Sekundär- oder Tertiärstrukturebene während oder als Folge der Spaltreaktion beobachten zu können.

Die Sekundärstrukturvorhersage der ADHR1-nmr RNA (Abbildung 6.1) basierte auf einem Vergleich mit dem Strukturmodell des Minimalkonstruktes des *hairpin* Ribozym-Motivs, welches im negativen RNA-Strang des *tobacco ringspot virus satellite* (TRSV) identifiziert wurde (1, 17). Die Anzahl der Iminoprotonen in helikalen Elementen der RNA und deren Typus (Guanosin- bzw. Uridin-Signal) im entsprechenden Resonanzbereich der NMR-Spektren der ADHR1-nmr RNA stimmten dabei sehr gut mit den basierend auf dem Modell erwarteten überein. Im Iminoprotonen-Resonanzbereich des  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrums der  $^{15}\text{N}$ -markierten ADHR1-nmr RNA konnten 21 aufgelöste Signale mit homogenen Linienbreiten ( $\Gamma^{1/2}(^1\text{H}) \sim 30$  Hz) identifiziert werden (Abbildung 6.2, Tabelle 6.2). Aufgrund ihrer charakteristischen chemischen Verschiebungen konnten dabei 7 Signale Uridin-Resonanzen und 14 Signale Guanosin-Resonanzen zugeordnet werden (18). Damit entspricht die Differenz von drei Iminoprotonensignalen, die basierend auf der Sekundärstrukturvorhersage zu verzeichnen ist, zwei Uridin-Resonanzen und einem Guanosin-Signal. Mit Hilfe des HNN-COSY Experimentes (19) konnte, mit Ausnahme des Guanosin-Signals bei einer chemischen Verschiebung von 9.7 ppm, für alle Signale die Beteiligung an einer Wasserstoffbrückenbindung der Form  $\text{N-H}\cdots\text{N}$  identifiziert werden. Die helikalen Elemente sind demnach, entsprechend der Sekundärstrukturvorhersage, ausschließlich aus Watson-Crick Basenpaarungen aufgebaut. Das Iminoprotonensignal bei 9.7 ppm konnte zum einen durch diese charakteristische chemische Verschiebung (20, 21) und zum anderen basierend auf der sequentiellen Konnektivität, die in den  $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY Spektren beobachtet wurde (Abbildung 6.2), dem Guanosin-Iminoproton der apikalen UUCG-Schleife von Helix 4 zugeordnet werden.



**Abbildung 6.2:** NMR-spektroskopische Resonanzzuordnung von ADHR1-nmr; **a)**  $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY Spektrum (293 K, ohne  $\text{Mg}^{2+}$ , 600 MHz, Mischzeit: 150 ms); farbig gekennzeichnet sind aufgelöste Imino-Iminoprotonen Konnektivitäten. Die Farbgebung entspricht dabei den entsprechenden Modell-RNA-Konstrukten, die das jeweilige Sekundärstrukturelement im Gesamt-Konstrukt ADHR1-nmr repräsentieren. (*Stern:* dieses NOE-Kreuzsignal wurde in einem  $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY Spektrum mit längerer Mischzeit (200 ms, 900 MHz, 6 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ) detektiert); **b)** Überlagerung von  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren (283 K) der ADHR1-nmr RNA (schwarz) und den Modell-RNA-Konstrukten. Die Resonanzzuordnung entspricht dabei derjenigen des Gesamt-Konstruktes. Das Modell-RNA-Konstrukt 1, das Helix 4 darstellt, ist in orange hervorgehoben, das Modell-RNA-Konstrukt 2 als Repräsentant der Helix 3 in blau und das Modell-RNA-Konstrukt 3, das Helix 2 darstellt, ist rot gekennzeichnet; die Sekundärstrukturen der Modell-RNA-Konstrukte sind als Teilbild eingefügt.

Die sequentielle Zuordnung der Imino-Iminoprotonen Konnektivitäten erfolgte über 2D- $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY und 3D- $^1\text{H},^1\text{H},^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC Spektren bei verschiedenen Mischzeiten und experimentellen Bedingungen, wie z.B. verschiedene Temperaturen und in An- oder Abwesenheit von  $\text{Mg}^{2+}$ . Mit Hilfe der dadurch erhaltenen Informationen konnte der Großteil der sequentiellen Konnektivitäten aufgelöst und den entsprechenden Helices zugeordnet werden. Da die Zusammensetzung der helikalen Elemente für ADHR1-nmr aber ausschließlich aus Watson-Crick Basenpaarungs-Motiven besteht, war die Dispersion der Iminoprotonensignale eingeschränkt. In Kombination mit der Größe der RNA (80nt) führte dies zu fehlenden oder überlagerten NOE-Kreuzsignalen. Um die Resonanzzuordnung des Gesamt-Konstruktes ADHR1-nmr zu vervollständigen, wurden deshalb Modell-RNA-Konstrukte hinzugezogen, die kleinere strukturelle Einheiten der Gesamt-RNA repräsentieren. Diese Strukturfragmente

wurden jeweils isoliert NMR-spektroskopisch charakterisiert und anschließend mit den spektralen Eigenschaften der Gesamt-RNA verglichen (*'divide-and-conquer Strategie'*, Kapitel 2).

Nukleotid	$\Gamma^{1/2} (^1\text{H})$ [Hz] ohne $\text{Mg}^{2+}$	$\Gamma^{1/2} (^1\text{H})$ [Hz] in Gegenwart von $\text{Mg}^{2+}$	$\Gamma^{1/2} (^1\text{H})$ [Hz] nach der Spaltung (inkl. $\text{Mg}^{2+}$ & Adenin)
U77	$28.7 \pm 0.8$	$33.4 \pm 0.6$	$33.3 \pm 0.7$
U76	$30.1 \pm 1.0$	$34.2 \pm 0.6$	$31.6 \pm 0.6$
U75	$32.7 \pm 0.7$	$30.4 \pm 1.5$	$33.8 \pm 0.8$
U42	$32.8 \pm 0.7$	$32.9 \pm 1.1$	$31.7 \pm 0.7$
G39	$32.9 \pm 0.9$	$32.1 \pm 2.2$	$31.2 \pm 1.5$

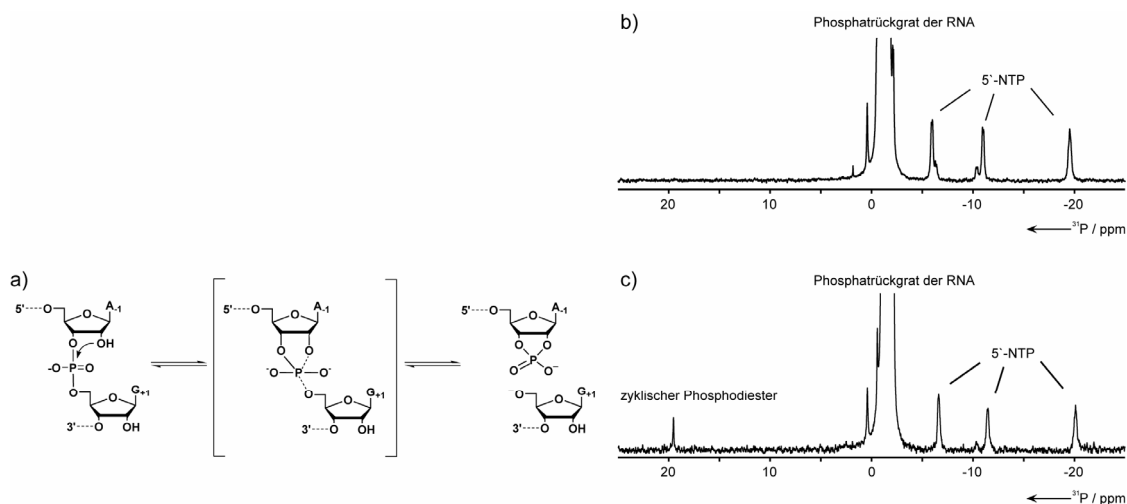
**Tabelle 6.2:** Linienbreiten ( $\Gamma^{1/2} (^1\text{H})$  [Hz]) von exemplarischen RNA-Iminprotonenresonanzen in Gegenwart der entsprechenden Cofaktoren.

Die Iminprotonen der Nukleotide in Helix 1 der ADHR1-nmr RNA konnten aufgrund ihrer NOE-Konnektivitäten und einer einmalig vorkommenden sequentiellen Abfolge von drei Uridin-Nukleotiden in den NMR-Spektren der Gesamt-RNA direkt identifiziert und zugeordnet werden. Für die *'divide-and-conquer Strategie'* wurden deshalb Modell-RNA-Konstrukte für die Helices 2, 3 und 4 gewählt (Abbildung 6.2). Die Resonanzzuordnung der Modell-RNA-Konstrukte erfolgte über die Aufnahme von  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren und  $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY Spektren mit verschiedenen Mischzeiten (in  $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$  (9:1) und  $\text{D}_2\text{O}$ ). Die Korrelation der NMR-Spektren der Gesamt-RNA und der Modell-RNA-Konstrukte zeigte eine sehr gute Übereinstimmung sowohl der chemischen Verschiebungen der Iminprotonensignale als auch der NOE-Kreuzsignale. Die Spektren der Modell-RNA-Konstrukte und deren Zuordnung konnten so zur Vervollständigung der Resonanzzuordnung von ADHR1-nmr hinzugezogen werden (Abbildung 6.2).

Zusammenfassend bestätigte die NMR-spektroskopische Charakterisierung der RNA-Konformation vor der katalytischen Spaltreaktion die Sekundärstrukturvorhersage für das ADHR1-nmr Ribozym. Basierend auf der NMR-Resonanzzuordnung sind die Signale der Nukleotide G1 (terminales Basenpaar der Helix 1) sowie U57 und U64 (Basenpaare in Helix 2 und 3, die sich jeweils am terminalen Ende hin zu der internen Cytidin-reichen Schlaufe befinden) in den NMR-Spektren von ADHR1-nmr nicht detektierbar. Dies ist auf den oft beobachteten schnellen Lösungsmittel-Austausch von terminalen Basenpaarungen zurückzuführen.

## NMR-spektroskopische Untersuchungen zur mechanistischen Aufklärung der katalytischen Spaltreaktion

Der katalytische Mechanismus der Selbstspaltung der natürlich vorkommenden Ribozym-Motiven, welche auch das *hairpin* Ribozym-Motiv einschließen (22, 23), zu Grunde liegt, verläuft über eine hydrolytische Spaltung des RNA-Phosphatrückgrates (Abbildung 6.3a). Es wird dabei angenommen, dass die Spaltung über einen  $S_N2$ -Mechanismus verläuft (24), der eine strukturelle *in-line* Orientierung der beteiligten funktionellen Gruppen voraussetzt. Diese Spaltreaktion resultiert dann in RNA-Enden mit einer freien 5'-OH-Gruppe bzw. einer 2',3'-zyklischen Phosphodiesterereinheit. NMR-spektroskopische Untersuchungen an der isolierten Domäne A des Wildtyp *hairpin* Ribozym-Motivs zeigten, dass die Orientierung der Nukleotide um das aktive Zentrum im Wesentlichen einer A-Form Konformation entspricht und somit die strukturelle Voraussetzung für eine katalytische Spaltreaktion nicht erfüllt ist (25). Im Gegensatz dazu konnte in Kristallstrukturen von Ribozym-Inhibitor Komplexen und Strukturen, die über Vanadat als Phosphatanalogon den Übergangszustand imitieren, diese für die Reaktivität strukturelle Voraussetzung der *in-line* Orientierung bei Nukleotiden um das aktive Zentrum beobachtet werden (12, 26).



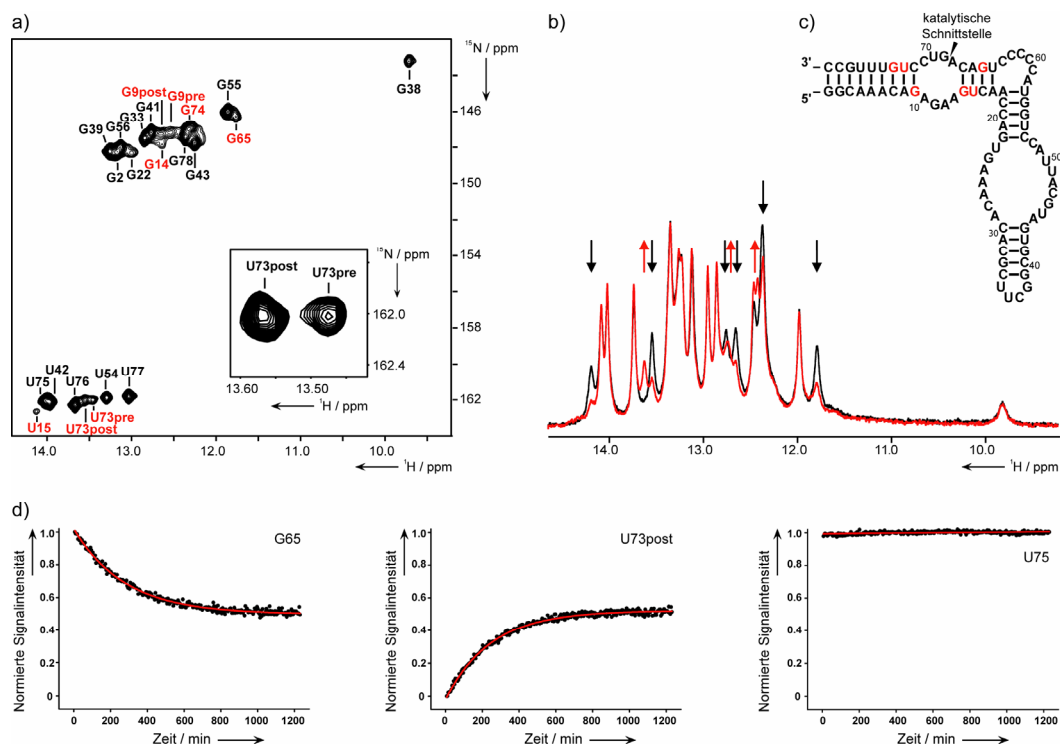
**Abbildung 6.3:** Charakterisierung der katalytischen Spaltreaktion; **a)** Schematische Darstellung des allgemeinen Mechanismus; <sup>31</sup>P-NMR-Spektren des ADHR1-nmr Ribozyms (298 K, 6 mM Mg<sup>2+</sup>) **b)** vor der Reaktion und **c)** 20 h nach Initiierung der Reaktion durch Zugabe von Adenin.

Durch den Vergleich der <sup>31</sup>P-NMR-Spektren der ADHR1-nmr RNA in den entsprechenden Konformationen vor und nach der Spaltreaktion konnte die dem *hairpin ribozyme* zu Grunde

liegende chemische Reaktion auch für das *Adenin-abhängige Hairpin Ribozym* bestätigt werden. Im  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des ADHR1-nmr Ribozyms nach der Spaltreaktion war ein zusätzliches Signal bei 19.5 ppm zu beobachten (Abbildung 6.3). Diese  $^{31}\text{P}$  chemische Verschiebung in NMR-Spektren ist charakteristisch für einen 2',3'-zyklischen Phosphodiester (27). Somit stellte dieses Signal ein, von den Phosphor-Resonanzen des RNA-Phosphatrückgrats bei  $\sim -1.5$  ppm gut separiertes Reportersignal dar und bestätigte die Bildung dieses spezifischen Produktes der katalytischen Spaltung.

Konformationelle Änderungen der ADHR1-nmr RNA als Folge der Spaltreaktion wurden auch basierend auf den NMR-Spektren der Iminoprotonenresonanzen analysiert. Die NMR-Spektren von ADHR1-nmr nach Inkubation mit dem katalytisch essentiellen Cofaktor Adenin zeigten deutliche Veränderungen im Iminoprotonen-Resonanzbereich (Abbildung 6.4). Basierend auf biochemischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die katalytische Aktivität des *Adenin-abhängigen Hairpin Ribozyms* reversibel ist, und damit auch für dieses Ribozym sowohl die Spalt- als auch die Ligationsreaktion beobachtet werden konnte (4). Die NMR-Spektren von ADHR1-nmr, die nach der Spaltreaktion aufgenommen wurden, zeigten weiterhin Signale, die der RNA-Konformation vor der Spaltung zugeordnet werden konnten (Abbildung 6.4a, mit der Nachsilbe 'pre' gekennzeichnet). Die Analyse dieser NMR-Signale zeigte eine Abnahme der Signalintensität auf  $\sim 52\%$ . Die Beobachtungen in den NMR-Spektren entsprechen damit denjenigen aus biochemischen Studien. Darin konnte mittels denaturierender PAGE auch nach 30 h noch die Gesamt-RNA vollständiger Länge detektiert werden (4).

Die Adenin-induzierte Spaltreaktion des ADHR1-nmr Ribozym-Motivs findet auf einer Zeitskala von Minuten statt und ermöglichte so eine Untersuchung mittels zeitaufgelöster NMR-spektroskopischer Methoden. Die Analyse der zeitaufgelösten NMR-Spektren zeigte neun Iminoprotonen als Reportersignale der Spaltreaktion, wovon sieben Signale in der  $^1\text{H}$ -Dimension aufgelöst waren und damit mittels 1D NMR-spektroskopischer Methoden untersucht werden konnten. Eine Ausnahme hiervon stellten die Signale der Nukleotide G14 und G9 (G9post) dar, die jeweils der abnehmenden bzw. der sich neu formierenden RNA-Konformation entsprechen. Da diese Signale ausschließlich in der  $^{15}\text{N}$ -Dimension aufgelöst waren (Abbildung 6.4a), konnten hierfür in den zeitaufgelösten 1D NMR-Experimenten keine kinetischen Daten erhalten werden. Aus diesem Grund wurde eine 2D Kinetik ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -Korrelation) einer  $^{15}\text{N}$ -markierten RNA aufgenommen (Abbildung 6.5).



**Abbildung 6.4:** NMR-spektroskopische Experimente zur Charakterisierung der Adenin-induzierten Spaltreaktion von ADHR1-nmr; **a)**  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum von ADHR1-nmr nach der Spaltung mit annotierter Iminoprotonen-Resonanzzuordnung; Die Nachsilben 'pre' (vor der Spaltreaktion) und 'post' (nach der Spaltreaktion) spezifizieren Resonanzen, die in der entsprechenden RNA-Konformation vorliegen; vergrößert dargestellt ist der spektrale Bereich, in dem die Signale des Nukleotids U73 in den entsprechenden Konformationen vor und nach der Spaltung zu sehen sind; **b)** Überlagerung der 1D Iminoprotonen NMR-Spektren von ADHR1-nmr in den Konformationen vor (schwarz) und 20 h nach der Zugabe von Adenin (rot); rote Pfeile repräsentieren Iminoprotonensignale, die erst nach Initiierung der Reaktion detektiert werden, während schwarze Pfeile Signale anzeigen, deren Intensität nach Zugabe des Cofaktors abnimmt; **c)** Sekundärstruktur von ADHR1-nmr; in rot hervorgehoben sind Nucleotide, deren korrespondierende Signale eine durch die Spaltreaktion hervorgerufene Änderung zeigen; **d)** Zeitlicher Verlauf der Signalintensitäten (normiert) der Iminoprotonensignale von G65, U73post und U75, die aus dem zeitaufgelösten 1D NMR-Experiment erhalten wurden (rot: monoexponentielle Fit-Funktion für G65 und U73post bzw. lineare Fit-Funktion für U75).

Zunächst sollen hier die Ergebnisse der zeitaufgelösten 1D NMR-Experimente dargestellt werden. Der zeitabhängige Verlauf der sieben in der  $^1\text{H}$ -Dimension aufgelösten Signale konnte mit gutem *Signal-zu-Rausch* Verhältnis aus den 1D Kinetiken extrahiert und mittels einer monoexponentiellen Funktion analysiert werden (Abbildung 6.4). Die erhaltenen Zeitkonstanten  $k$  [ $\text{min}^{-1}$ ] der Iminoprotonensignale zeigten dabei einen für die NMR-Zeitskala

langsamen Verlauf mit vergleichbaren Werten für alle Signale (Tabelle 6.3). Dabei liegt die individuelle Abweichung der einzelnen Zeitkonstanten von der gemittelten Zeitkonstante  $\Delta k_{\text{mittel}}$  unter 9%. Eine gemittelte Halbwertszeit der Spaltreaktion kann so mit  $\sim 187.2 \pm 11.1$  min bestimmt werden.

Nukleotid	k [min <sup>-1</sup> ]	$\Delta k$ [min <sup>-1</sup> ]
G9pre	0.0039	$0.71 \cdot 10^{-4}$
U15	0.0034	$0.50 \cdot 10^{-4}$
G65	0.0036	$0.53 \cdot 10^{-4}$
U73pre	0.0036	$0.48 \cdot 10^{-4}$
U73post	0.0040	$0.52 \cdot 10^{-4}$
G74pre	0.0039	$0.71 \cdot 10^{-4}$
G74post	0.0036	$0.47 \cdot 10^{-4}$

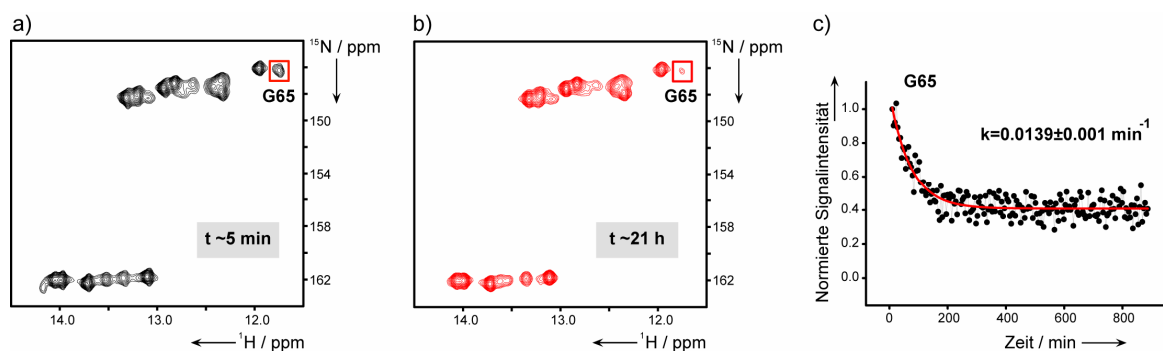
**Tabelle 6.3:** Kinetische Daten der Adenin-induzierten Spaltreaktion, die aus dem zeitaufgelösten 1D NMR-Experiment ermittelt wurden.

Die Signale, die eine zeitabhängige Veränderung der spektralen Eigenschaften aufweisen, konnten Nukleotiden in den helikalen Elementen Helix 1 und Helix 2 zugeordnet werden. Dabei handelt es sich um Nukleotide, die sich in jeweils dem aktiven Zentrum hin zugerichteten Basenpaarungen befinden, während die sechs terminalen Basenpaarungen in Helix 1 keinerlei zeitliche Veränderung aufweisen (Abbildung 6.4). Damit konnte eine Produktdissoziation des 5'-geschnittenen RNA-Stranges als Teilschritt der katalytischen Reaktion für ADHR1-nmr ausgeschlossen werden. Für die Iminoprotonensignale mit zeitlichen Signalveränderungen konnten zwei unterschiedliche Effekte beobachtet werden.

(i) Die Iminoprotonensignale der Nukleotide G14, U15 und G65 in Helix 2 zeigten einen starken Abfall der Signalintensität in den NMR-Spektren nach Induktion der Spaltreaktion. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die entsprechenden Basenpaarungen in der RNA-Konformation nach der Spaltung nicht mehr stabil ausgebildet sind. (ii) Die Signale, die den Nukleotiden G9, U73 und G74 in Helix 1 zugeordnet werden konnten, zeigten infolge der Spaltreaktion ebenfalls einen zeitabhängigen Intensitätsabfall. Allerdings konnte für diese Nukleotide jeweils ein neues Signal mit einer anderen chemischen Verschiebung beobachtet werden. Diese Signale sprechen für eine konformationelle Umorientierung der RNA in diesem

Strukturbereich und konnten der Konformation im geschnittenen Zustand zugeordnet werden. Der Unterschied der chemischen Verschiebung der Signale in den NMR-Spektren vor und nach der Spaltung ist für die Nukleotide G9 und U73 stärker ausgeprägt als für das Nukleotid G74, für welches der Unterschied der beiden Konformationen im Bereich der Signal-Linienbreiten liegt. Für das Iminoprotonensignal des in Helix 1 benachbarten Nukleotids U75 ist nach Reaktionsinitiierung weder ein Unterschied der Signalintensität noch der chemischen Verschiebung zu beobachten (Abbildung 6.4).

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen eine konformationelle Umorientierung der RNA als Folge der Adenin-induzierten Spaltreaktion auf, welche im Bereich um das aktive Zentrum stattfindet. Eine konformationelle Umorientierung in diesem Bereich könnte die Folge des katalytischen Spaltprozesses sein, der die *in-line* Orientierung der an der Reaktion beteiligten Gruppen erfordert.



**Abbildung 6.5:** Zeitaufgelöste 2D NMR-Kinetik (800 MHz, 298 K, 10 mM  $Mg^{2+}$ ); SOFAST-HMQC der ADHR1-nmr RNA **a)** 5 min und **b)** 21 h nach Reaktionsinitiierung durch die Zugabe von Adenin; **c)** Zeitlicher Verlauf der Signalintensität (normiert) des Iminoprotonensignals von G65 mit monoexponentieller Fit-Funktion (rot).

Die zeitaufgelösten 2D NMR-Kinetiken der Spaltreaktion führten prinzipiell zu entsprechenden Ergebnissen. Auch hier konnte für die Iminoprotonensignale der Nukleotide G9, G14, U15, G65, U73 und G74 eine zeitliche Veränderung der spektralen Parameter beobachtet werden. Dieser zeitliche Verlauf konnte ebenfalls mittels einer monoexponentiellen Fit-Funktion analysiert werden und ist exemplarisch für das Signal des Nukleotids G65 dargestellt (Abbildung 6.5). Aufgrund des schlechteren *Signal-zu-Rausch* Verhältnisses im Vergleich zu den 1D Kinetiken ist hier allerdings eine größere Abweichung der individuellen Zeitkonstanten vom erhaltenen Mittelwert zu verzeichnen. Der Unterschied des absoluten Wertes der

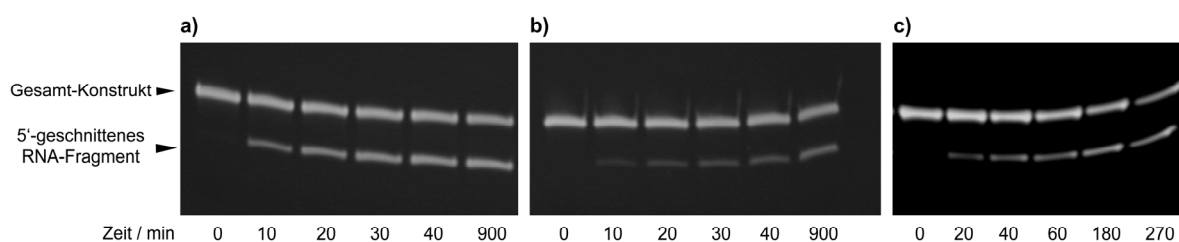


Zeitkonstanten im Vergleich zu dem aus der 1D Kinetik erhaltenen Wert ist auf das in den 2D Kinetiken erhöhte  $[RNA]:[Mg^{2+}]$ -Verhältnis ( $[Mg^{2+}] \sim 10 \text{ mM}$ ) zurückzuführen. Eine  $Mg^{2+}$ -Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit wurde bereits zuvor in biochemischen Studien für ADHR1 beobachtet (4).

### Untersuchung der Funktion der Cofaktoren zur katalytischen Aktivität

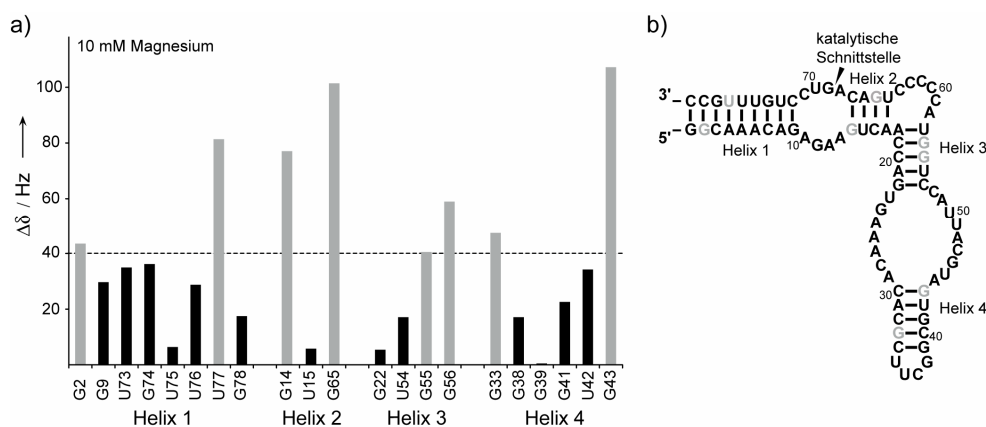
Da RNAs einen polyanionischen Charakter aufweisen, werden oft Kationen benötigt, um vollständig gefaltete und funktionale RNA-Konformationen zu erhalten (28). Dadurch gestaltet sich eine Differenzierung der spezifischen Funktion von Kationen in der RNA-Katalyse als schwierig. Sowohl eine direkte Beteiligung an der katalytischen Reaktion selbst als auch eine essentielle Stabilisierung der funktionalen Tertiärstruktur sind dabei denkbar.

Auch für die katalytische Aktivität des *Adenin-abhängigen Hairpin Ribozyms* wurden  $Mg^{2+}$ -Ionen als essentielle Cofaktoren identifiziert (4). Aus diesem Grund sollte mit Hilfe von biochemischen und NMR-spektroskopischen Experimenten deren Funktion untersucht werden. Die direkte Beteiligung von  $Mg^{2+}$ -Ionen in einer möglichen Säure/Base-Chemie der katalytische Reaktion könnte zum einen als (i) Brönsted Säure/Base über komplexierte Hydroxid-Ionen oder als (ii) Lewis-Säure bzw. durch Aktivierung eines Nukleophils über eine Innersphären-Koordination erfolgen. Eine Untersuchung dieser beiden denkbaren Funktionen sollte durch die Variation der Kationen und deren Auswirkung auf die katalytische Reaktion erfolgen. Die Adenin-induzierte Spaltreaktion des ADHR1-nmr Ribozyms wurde deshalb in Gegenwart von  $Na^+$ - (29, 30) bzw.  $[Co(NH_3)_6]^{3+}$ -Ionen (31) durchgeführt (Abbildung 6.6). Letztere sind strukturell analog zu hexahydratisierten  $Mg^{2+}$ -Ionen, wobei im Gegensatz zu diesen die erste Koordinationssphäre kinetisch inert ist und deshalb eine mögliche Assoziation nur über elektrostatische Wechselwirkungen bzw. Koordination der äußeren Ligandensphäre stattfinden kann.



**Abbildung 6.6:** Salzabhängigkeit der Adenin-induzierten katalytischen Spaltreaktion des ADHR1-nmr Ribozym-Motivs, analysiert mittels denaturierender PAGE; **a)** 6 mM  $MgCl_2$ ; **b)** 24 mM  $[Co(NH_3)_6]Cl_3$  und **c)** 4 M  $NaCl$ .

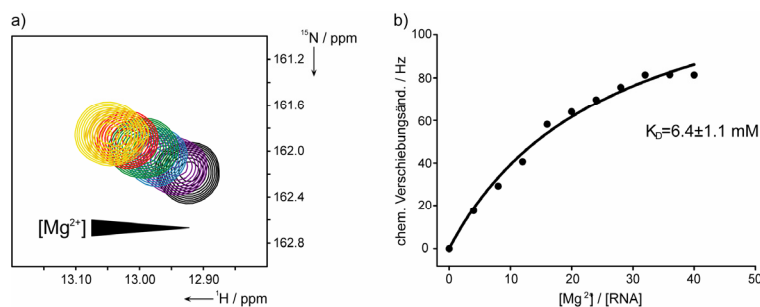
Abbildung 6.6 zeigt die Salzabhängigkeit der Spaltreaktion, die mittels denaturierender PAGE untersucht wurde. Der Umsatz der Spaltreaktion in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen (6 mM) konnte sowohl bei der Analyse der denaturierenden PAGE als auch der zeitaufgelösten NMR-Experimente auf  $\sim 48\%$  bestimmt werden. Eine Adenin-induzierte katalytische Spaltung von ADHR1-nmr konnte aber auch in Gegenwart von  $Na^+$ - bzw.  $[Co(NH_3)_6]^{3+}$ -Ionen beobachtet werden. Der Umsatz der Reaktion war hier allerdings mit  $\sim 40\%$  (4 M NaCl) bzw.  $\sim 30\%$  (24 mM  $[Co(NH_3)_6]Cl_3$ ) trotz höherer Salzkonzentrationen etwas reduziert. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte ausgeschlossen werden, dass eine direkte Metallkoordination zu an der Reaktion beteiligten funktionellen Gruppen für die katalytische Aktivität des ADHR1-nmr Ribozyms essentiell erforderlich ist. Allerdings kann eine mögliche Funktion der  $Mg^{2+}$ -Ionen als Teil der katalytischen Strategie dieses Ribozyms, z. B. durch elektrostatische Stabilisierung des Übergangszustandes (32) nicht ausgeschlossen werden.



**Abbildung 6.7:** NMR-spektroskopische Analyse der  $Mg^{2+}$ -induzierten Effekte; **a)** Chemische Verschiebungsänderung  $\Delta\delta$  [Hz] der Iminoprotonensignale des ADHR1-nmr Ribozyms; **b)** Signale der Nucleotide mit  $\Delta\delta > 40$  Hz sind in der Sekundärstruktur grau hervorgehoben.

Mögliche strukturelle Effekte von  $Mg^{2+}$ -Ionen auf die RNA-Konformation wurden mittels NMR-spektroskopischer Methoden untersucht. Als Reportersignale fungieren dabei Iminoprotonen, deren spektrale Eigenschaften in  $^1H, ^{15}N$ -HSQC und  $^1H, ^1H$ -NOESY Spektren in Abhängigkeit der Salzkonzentration untersucht wurden. Der Vergleich der NMR-Spektren von ADHR1-nmr vor und nach Zugabe von  $MgCl_2$  zeigte chemische Verschiebungsänderungen (*chemical shift perturbation*, CSP) von zahlreichen Iminoprotonensignalen (Abbildung 6.7). Im Gegensatz dazu konnten weder zusätzliche Iminoprotonensignale detektiert werden, noch

konnte durch Analyse der Distanzinformation in NOESY Spektren auf Veränderungen der Tertiärstruktur geschlossen werden. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Sekundärstrukturelemente der ADHR1-nmr RNA bereits ohne  $Mg^{2+}$  stabil ausgebildet sind.

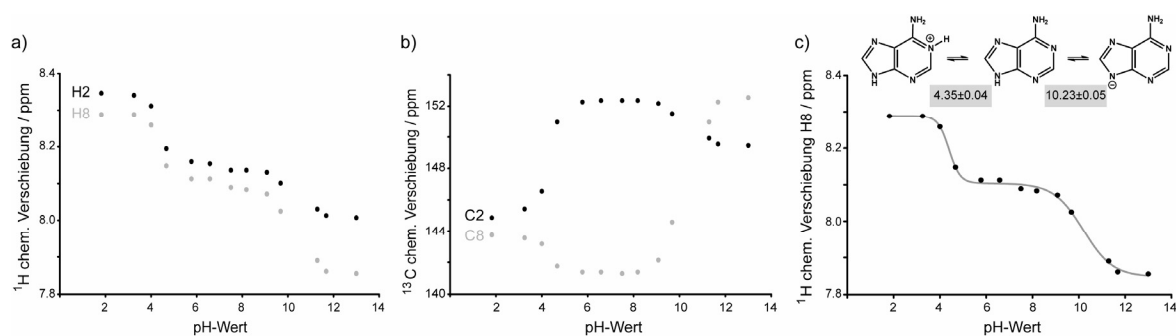


**Abbildung 6.8:**  $Mg^{2+}$ -abhängige chemische Verschiebungsänderungen des Iminoprotonensignals des Nukleotids U77; **a)** Überlagerung von  $^1H,^{15}N$ -HSQC Spektren (293 K, 800 MHz,  $[Mg^{2+}] \sim 0-10$  mM); **b)** Korrelation der chemischen Verschiebungsänderung [Hz] als Funktion des  $[Mg^{2+}]:[RNA]$ -Quotienten und daraus resultierend eine Dissoziationskonstante  $K_D(Mg^{2+})$  von  $6.4 \pm 1.1$  mM.

Die Analyse einer schrittweise Zugabe von  $MgCl_2$  ergab allerdings  $Mg^{2+}$ -abhängige chemische Verschiebungsänderungen der Iminoprotonenresonanzen. Für ADHR1-nmr konnten dadurch  $Mg^{2+}$ -Bindungsstellen in allen helikalen Elementen und deren Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) ermittelt werden, die im millimolaren Bereich liegen. In Abbildung 6.8 ist diese Analyse der  $Mg^{2+}$ -Abhängigkeit für das Signal des Nukleotids U77 exemplarisch dargestellt. Für das Iminoprotonensignal von U77 ergibt sich eine Dissoziationskonstante  $K_D(Mg^{2+})$  von  $6.4 \pm 1.1$  mM.

Wie bereits zuvor gezeigt, findet in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  keine katalytische Reaktion des ADHR1-nmr Ribozyms statt. Sowohl die biophysikalischen als auch die NMR-spektroskopischen Untersuchungen unterstützen die Annahme, dass eine direkte Metallkoordination zu funktionellen Gruppen im aktiven Zentrum für die Aktivität dieses Ribozyms nicht essentiell ist. Basierend auf den hier beschriebenen Experimenten kann angenommen werden, dass elektrostatische Wechselwirkungen der RNA mit  $Mg^{2+}$  wesentlich dazu beitragen, eine funktional aktive RNA-Konformation des *Adenin-abhängigen Hairpin Ribozyms* zu stabilisieren.

Im Gegensatz zum natürlich vorkommenden *hairpin ribozyme* zeigt das *Adenin-abhängige Hairpin Ribozym* die katalytische Aktivität nicht bereits mit  $Mg^{2+}$ , sondern ausschließlich in Gegenwart eines weiteren Cofaktors. Dieser zusätzliche Cofaktor ist die Nukleobase Adenin, deren Zugabe zum Wiedererhalt der katalytischen Aktivität eines zuvor durch die Einführung der Mutationen nicht reaktiven Ribozym-Motivs führt. Dabei sind verschiedene Funktionen der Nukleobase in der katalytischen Reaktion denkbar. Zum einen könnte die Funktion von Adenin in einer strukturellen Stabilisierung der Architektur des aktiven Zentrums liegen. Da das ADHR1-nmr Ribozym im Gegensatz zum *hairpin ribozyme* in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  allein keine Aktivität zeigt, ist eine mögliche Orientierung der funktionellen Gruppen durch den Cofaktor Adenin bzw. eine Stabilisierung des Übergangszustandes denkbar. Zum anderen könnte Adenin direkt an der katalytischen Reaktion selbst beteiligt sein.

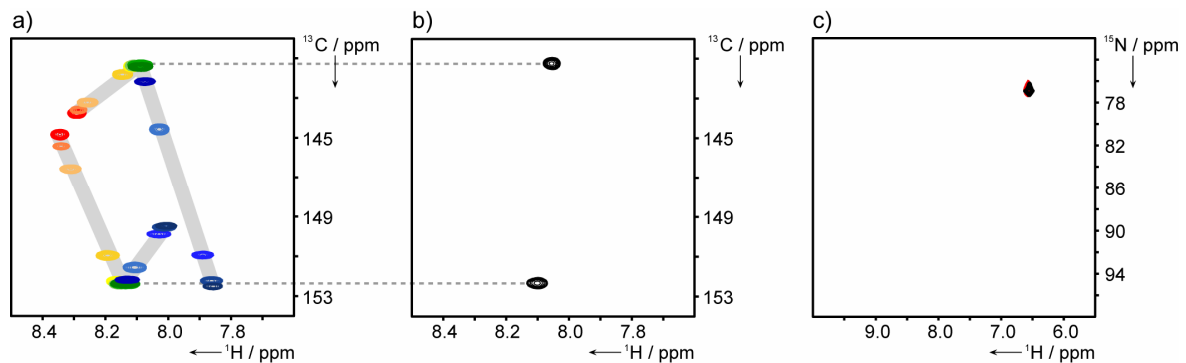


**Abbildung 6.9:** Chemische Verschiebungsänderungen der NMR-Signale (C2-H2 und C8-H8) von  $^{13}C,^{15}N$ -markiertem Adenin aus pH-abhängigen  $^1H,^{13}C$ -HSQC Spektren (600 MHz); **a)**  $^1H$  chemische Verschiebung; **b)**  $^{13}C$  chemische Verschiebung; **c)**  $^1H$  chemische Verschiebung des Signals H8 mit Fit-Funktion (grau) und den sich daraus für die verschiedenen Protonierungszustände von Adenin ergebenden Strukturformeln und ermittelten  $pK_a$ -Werten.

Mittels NMR-spektroskopischer Methoden sollten diese möglichen Funktionen des Cofaktors Adenin untersucht werden. Durch die Verwendung eines selektiven Isotopenmarkierungsmusters sollten mögliche spezifische oder nicht-spezifische RNA-Cofaktor-Wechselwirkungen NMR-spektroskopisch analysiert werden. Der Einsatz von  $^{13}C,^{15}N$ -markiertem Adenin in Gegenwart von nicht-isotopenmarkierter RNA ermöglichte es, in NMR-Experimenten selektiv die Veränderungen der spektralen Eigenschaften des Cofaktors zu untersuchen.

Eine funktionelle Beteiligung von Adenin an der chemischen Reaktion selbst könnte möglicherweise durch Modifikationen seiner Funktionalitäten charakterisiert sein (33).

Informationen von pH-abhängigen chemischen Verschiebungsänderungen (34) sollten deshalb Aufschluss über einen eventuell vorliegenden ungewöhnlichen Protonierungszustand des Cofaktors in Gegenwart der RNA geben. Als Referenz dazu wurde unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen eine NMR-spektroskopische pH-Titration mit freiem  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markiertem Adenin durchgeführt (Abbildungen 6.9 und 6.10).



**Abbildung 6.10:** Untersuchung der spektralen Eigenschaften des Cofaktors in Gegenwart der ADHR1-nmr RNA; **a)** Überlagerung von  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC Spektren (298 K, 600 MHz) einer pH-Titration von  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markiertem Adenin (die Farbgebung entspricht dabei dem jeweiligen pH-Wert, rot:~1.8, grün:~7.5, dunkelblau:~13); **b)**  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC Spektrum von  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markiertem Adenin in Gegenwart von ADHR1-nmr (298 K, ohne  $\text{Mg}^{2+}$ , 600 MHz); **c)** Überlagerung der spektralen Bereiche der Aminoresonanzen in  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren von  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markiertem Adenin (rot) und  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markiertem Adenin in Gegenwart (schwarz) von ADHR1-nmr (ohne  $\text{Mg}^{2+}$ ).

Die chemischen Verschiebungsänderungen der NMR-Signale C2-H2 und C8-H8 in den  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC Spektren von  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markiertem Adenin zeigten dabei einen jeweils analogen und sensitiven pH-abhängigen Verlauf sowohl in der  $^1\text{H}$ - als auch der  $^{13}\text{C}$ -Dimension (Abbildung 6.9). Die  $\text{pK}_a$ -Werte für die beiden Protonierungsübergänge von Adenin an den Positionen N1 bzw. N9 konnten so unter den hier vorliegenden experimentellen Bedingungen mit  $4.35 \pm 0.04$  bzw.  $10.23 \pm 0.05$  ermittelt werden und entsprechen damit weitestgehend in der Literatur angegebenen Werten (35).

Die NMR-spektroskopischen Experimente zur Untersuchung von möglichen RNA-Cofaktor-Wechselwirkungen wurden mit [RNA]:[Adenin]-Verhältnissen von 5:1, 1:1 und um ein katalytisch aktives Konzentrationsverhältnis zu erhalten mit einem 25-fachen Überschuss an Adenin durchgeführt. Obwohl das genannte Isotopenmarkierungsmuster den NMR-

spektroskopischen Nachweis von verschiedenen potentiell in eine Bindung involvierten funktionellen Gruppen des Cofaktors Adenin (N9-H9,  $\sim\text{NH}_2$ , C2-H2, C8-H8) ermöglichen würde, konnten bei allen [RNA]:[Adenin]-Verhältnissen, auch in Gegenwart eines Überschusses des ADHR1-nmr Ribozym-Motivs nur die NMR-Resonanzen des freien Cofaktors detektiert werden. Weder zusätzliche Signale noch chemische Verschiebungsänderungen als Folge einer spezifischen RNA-Cofaktor-Wechselwirkung oder eines ungewöhnlichen Protonierungszustandes des Cofaktors konnten in  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC und  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC Spektren weder während noch nach Ablauf der katalytischen Reaktion beobachtet werden (Abbildung 6.10).

Probenzusammensetzung	$\Gamma^{1/2}(\text{H2})$ [Hz]	$\Gamma^{1/2}(\text{H8})$ [Hz]	$\Gamma^{1/2}(\sim\text{NH}_2)$ [Hz]
Adenin	$4.09 \pm 0.1$	$4.66 \pm 0.1$	--
Adenin, $\text{Mg}^{2+}$	$3.91 \pm 0.1$	$4.48 \pm 0.1$	$33.46 \pm 0.3$
Adenin, ADHR1-nmr	$4.58 \pm 0.1$	$5.08 \pm 0.2$	--
Adenin, ADHR1-nmr, $\text{Mg}^{2+}$	$3.92 \pm 0.1$	$4.37 \pm 0.2$	$35.55 \pm 0.3$

**Tabelle 6.4:** NMR-Linienbreiten ( $\Gamma^{1/2}$  [Hz]) von Signalen des  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markierten Cofaktors Adenin unter verschiedenen experimentellen Bedingungen.

Bei einer möglichen nicht-spezifischen Wechselwirkung zwischen dem Cofaktor und der RNA, die auf der NMR-Zeitskala stattfindet, würde man aufgrund der dann veränderten Relaxationseigenschaften des Cofaktors Linienverbreiterungen auf dessen NMR-Signalen erwarten (36). Die NMR-Experimente zur Bestimmung der Linienbreiten der Cofaktor NMR-Resonanzen (C2-H2, C8-H8,  $\sim\text{NH}_2$ ) wurden ebenfalls sowohl während als auch nach der katalytischen Reaktion aufgenommen. Die Analyse der NMR-Linienbreiten von freiem Adenin im Vergleich zu den Cofaktor-Signalen in Gegenwart des ADHR1-nmr Ribozym-Motivs ergab allerdings nur sehr geringe Veränderungen, welche als nicht signifikant bewertet wurden (Tabelle 6.4). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ein möglicher nicht-spezifischer Bindungsprozess auf der untersuchten Zeitskala nicht stattfindet oder für einen NMR-spektroskopischen Nachweis zu gering populiert ist.

## DISKUSSION

Das *Adenin-abhängige Hairpin Ribozym* stellt ein Modellsystem eines Ribozyms dar, bei dem katalytische Aktivität durch einen exogenen Liganden induziert wird. Das Verständnis der Katalyse des ADHR1-nmr Ribozyms erfordert daher die Beantwortung der Fragen, wie die katalytische Aktivität, das heißt die Selbstspaltung der RNA im Detail verwirklicht wird und welche strukturellen Konformationsänderungen mit dem Spaltprozess verbunden sind.

Die NMR-Resonanzzuordnung der Iminoprotonensignale konnte erfolgreich für das ADHR1-nmr RNA-Motiv in den Konformationen vor und nach der Spaltung durchgeführt werden. Um durch die Größe der RNA und ihre intrinsischen Eigenschaften hervorgerufene, fehlende Konnektivitäten in den NMR-Spektren zu überwinden, wurde dabei eine 'divide-and-conquer Strategie' verfolgt. Die Gesamt-RNA wurde in kleinere strukturelle Fragmente unterteilt und diese dann separat NMR-spektroskopisch analysiert. Die Korrelation der spektralen Eigenschaften der Modell-RNA-Konstrukte mit denjenigen der Gesamt-RNA zeigte sehr gute Übereinstimmungen und ermöglichte so die Vervollständigung der Resonanzzuordnung. Basierend auf der Charakterisierung der RNA-Konformationen vor und nach der Reaktion konnte der Ligand-abhängige katalytische Prozess der RNA-Spaltung untersucht werden.

Der Vergleich der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren vor und nach der Adenin-induzierten RNA-Spaltung zeigte ein zusätzliches Signal bei einer chemischen Verschiebung von 19.5 ppm. Diese  $^{31}\text{P}$  chemische Verschiebung ist charakteristisch für einen zyklischen Phosphodiester und bestätigt damit eine spezifische Spaltung des Phosphatrückgrates für ADHR1-nmr über eine zum *hairpin ribozyme* analoge katalytische Reaktion.

Um die katalytische Aktivität des ADHR1-nmr Ribozyms zu realisieren, ist die Beteiligung von verschiedenen Faktoren denkbar, zu welchen (i) die Positionierung des Substrates, (ii) die Aktivierung des Nukleophils bzw. Protonierung der Abgangsgruppe (Säure/Base-Chemie) und (iii) die Stabilisierung des Übergangszustandes bzw. Destabilisierung des Grundzustandes zählen.

(i) Die im Wildtyp *hairpin ribozyme* beobachtete A-Form Geometrie in den Bereichen um das aktive Zentrum (25) entspricht nicht einer reaktiven RNA-Konformation, die für die  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion der Phosphodiesterhydrolyse erforderlich ist. Die NMR-spektroskopischen Daten des Grundzustandes der ADHR1-nmr RNA sprechen auch in diesem Ribozym für das Vorhandensein einer A-Form RNA-Konformation. Zur Realisierung der katalytischen Reaktion

ist deshalb analog der Situation im Wildtyp *hairpin ribozyme* eine lokale Konformationsänderung erforderlich, um eine Positionierung der funktionellen Gruppen zu erreichen.

(ii) Zahlreiche funktionelle Gruppen des Ribozyms sind mögliche Kandidaten für einen Protonentransfer entsprechend einer Säure/Base-Chemie. Zusätzlich könnten  $Mg^{2+}$ -Ionen oder im Fall des ADHR1-nmr Ribozyms auch der Cofaktor Adenin an einer Reaktion beteiligt sein.

(iii) Der Vergleich von Kristallstrukturen des *hairpin ribozyme* Motivs in den verschiedenen Konformationen ergab (12), dass ein wahrscheinlicher Beitrag zur katalytischen Effizienz die Stabilisierung eines möglichen Übergangszustandes darstellt.

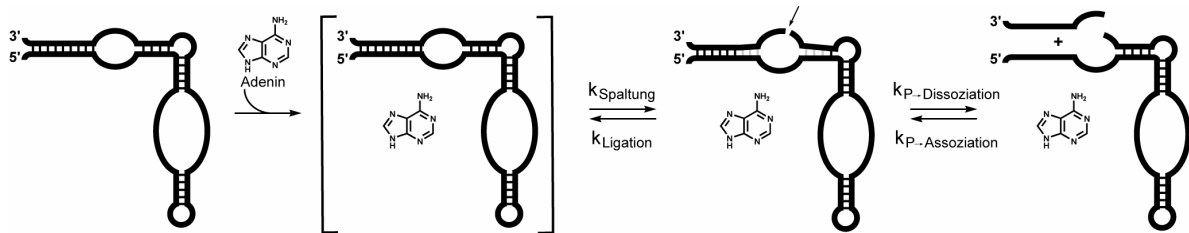
Basierend auf der Sequenzhomologie von ADHR1-nmr mit dem *hairpin* Ribozym-Motiv in den Regionen um das aktive Zentrum kann angenommen werden, dass hier auch die RNA-Konformation derjenigen des *hairpin* Ribozym-Motivs entspricht. Die Beobachtung, dass sowohl die chemischen Verschiebungen als auch die NOE-Konnektivitäten der Modell-RNA-Konstrukte sehr gut mit denjenigen der ADHR1-nmr RNA übereinstimmen, lässt vermuten, dass die helikalen Elemente im ADHR1-nmr Ribozym in A-Form Konformationen vorliegen und nicht in zusätzliche Tertiärstrukturelemente involviert sind. Damit entspricht der Grundzustand des ADHR1-nmr Ribozyms einer für eine Phosphodiesterhydrolyse nicht-reaktiven RNA-Konformation.

Weitere Aufschlüsse über den katalytischen Mechanismus konnten mittels statischer und zeitaufgelöster NMR-Experimente erhalten werden. Der Vergleich der Iminoprotonen NMR-Spektren von ADHR1-nmr vor und nach der Spaltung zeigte, dass im Rahmen der katalytischen Reaktion keine Dissoziation des 5'-geschnittenen RNA-Stranges stattfindet. Mit Ausnahme der Signale der Nukleotide G9, U73 und G74 konnten keine weiteren spektralen Veränderungen als Folge der katalytischen Spaltreaktion in Helix 1 detektiert werden. Die Stabilisierung dieser Helix durch die sechs terminalen, nicht durch die Spaltung beeinflussten Basenpaarungen kann demnach in der Reaktion nicht kompensiert werden und führt damit im Ganzen nicht zu einer Produktdissoziation. Die zeitaufgelösten NMR-Experimente reflektieren demnach ausschließlich die Spaltreaktion (Abbildung 6.11). Die Kinetik der Spaltung kann für Signale in Helices 1 und 2, die um das aktive Zentrum lokalisiert sind, beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurden für Signale der Nukleotide in Helices 3 und 4 infolge der Spaltreaktion keine Veränderungen der NMR-spektroskopischen Eigenschaften beobachtet. Unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen ergab sich aus den zeitaufgelösten NMR-Kinetiken eine Halbwertszeit der Reaktion von  $\sim 187.2 \pm 11.1$  min. Die kinetischen Daten konnten mittels einer monoexponentiellen Funktion analysiert werden; dies lässt auf einen kinetischen Prozess erster Ordnung schließen. Da die Iminoprotonen-Reportersignale analoge zeitabhängige



Eigenschaften aufweisen, kann auf einen konzertierten Reaktionsmechanismus geschlossen werden.

Der reversible Reaktionsmechanismus von Ribozym-Motiven stellt ein Gleichgewicht zwischen Spaltung und Produktdissoziation und den entsprechenden Rückreaktionen, das heißt Ligation und Assoziation dar (Abbildung 6.11). Die Analyse der Spalt- und Ligationsreaktionen für das ADHR1-nmr Ribozym mittels denaturierender PAGE ergab auch hier eine Reversibilität der Reaktion und keinen vollständigen Übergang in den entsprechenden komplementären Zustand (4). Obwohl mittels NMR-spektroskopischer Studien ausschließlich die Spaltreaktion untersucht wurde, ist diese Beobachtung auch hier konsistent. Die NMR-Spektren der RNA nach der Spaltung zeigten ebenfalls Signale der RNA in der Konformation vor der Spaltung. Damit entsprechen die kinetischen Untersuchungen möglicherweise dem Gleichgewicht zwischen Spaltung und Ligation.



**Abbildung 6.11:** Schematische Darstellung des kinetischen Modells der katalytischen Reaktion des ADHR1-nmr Ribozym-Motivs. Eine Produktdissoziation konnte in den NMR-spektroskopischen Untersuchungen nicht detektiert werden.

Für das Wildtyp *hairpin ribozyme* wird eine Teilnahme von funktionellen Gruppen der RNA an einer möglichen Säure/Base-Chemie und an der Stabilisierung des Übergangszustandes diskutiert (37). Als wahrscheinliche Kandidaten hierfür wurden Nukleotide der Schlaufenregionen A und B ermittelt. Nukleotide in der Schlaufe B sind an einer intramolekularen Wechselwirkung der beiden Domänen beteiligt, welche als essentielle Voraussetzung für die katalytische Aktivität identifiziert werden konnte (3). Kristallstrukturen eines Ribozym-Inhibitor Komplexes bestätigten ebenfalls eine Interdomänen-Wechselwirkung, die durch verschiedene Tertiärkontakte, darunter auch eine Watson-Crick Wechselwirkung charakterisiert wird (26). Kinetische Untersuchungen ergaben für die Katalyse des *hairpin ribozyme* einen komplexen Mechanismus, für welchen auch Zeitkonstanten für die kinetischen Prozesse der Bildung und Auflösung der Interdomänen-Wechselwirkung ermittelt

werden konnten. Diese Daten lassen vermuten, dass die Interdomänen-Wechselwirkung stabil genug ist, um eine Gleichgewichtsbildung zwischen Spaltung und Ligation zu ermöglichen, bevor dann die Auflösung der Interdomänen-Wechselwirkung stattfindet (38-40).

Basierend auf den Iminoprotonen-Reportersignalen konnte für das ADHR1-nmr Ribozym keine stabile Intermediat-RNA-Konformation detektiert werden. Weder in der Konformation vor noch nach der Spaltung konnten Tertiärkontakte zwischen den Domänen detektiert werden. Die Iminoprotonensignale des ADHR1-nmr Ribozyms weisen sowohl vor als auch nach Zugabe des Cofaktors Adenin homogene Linienbreiten auf und speziell Signale der Helices 3 und 4 zeigten keinerlei Veränderungen in ihren spektralen Eigenschaften. Eine potentielle Interdomänen- Wechselwirkung kann allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden. Das Fehlen von NMR-Resonanzen, die einer stabilen Intermediat-Konformation zugeordnet werden könnten, lässt aber darauf schließen, dass mögliche Interaktionen nur transient populiert sind und deshalb nicht zu detektierbaren Veränderungen der gemittelten Konformation des RNA-Ensembles auf der Zeitskala der NMR-Experimente führen.

Die katalytische Aktivität des ADHR1-nmr Ribozym-Motivs ist abhängig von der Konzentration der Cofaktoren Adenin und  $Mg^{2+}$  (4). Die NMR-spektroskopische Titration der RNA mit  $Mg^{2+}$  ergab  $Mg^{2+}$ -Bindungsstellen im millimolaren Bereich für verschiedene Nukleotide in den helikalen Elementen. Eine katalytische Aktivität des Ribozyms konnte auch in Gegenwart hoher Konzentrationen von monovalenten Ionen (4 M  $Na^+$ ) oder von  $[Co(NH_3)_6]^{3+}$  (24 mM) beobachtet werden. Durch diese möglichen Substitutionen der  $Mg^{2+}$ -Ionen in der Reaktion kann ausgeschlossen werden, dass eine direkte Metallkoordination zu funktionellen Gruppen im aktiven Zentrum für den Erhalt der katalytischen Aktivität essentiell sind. Stattdessen lassen diese Ergebnisse vermuten, dass  $Mg^{2+}$  die RNA-Konformationen des Grund- oder Übergangszustandes durch unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert. Diese Stabilisierung stellt dabei wahrscheinlich eine essentielle Voraussetzung dar, um eine negative Ladungsverteilung zu kompensieren oder funktionelle Gruppen für die katalytische Reaktion zu positionieren.

Verschiedene Untersuchungen zu Struktur und katalytischer Aktivität des *hairpin* Ribozym-Motivs ermittelten hierfür essentielle Funktionen der Nukleobasen G8 und A38. In Kristallstrukturen konnte gezeigt werden, dass diese Nukleobasen strukturell nahe der katalytischen Schnittstelle positioniert sind und die Mutation oder abasische Substitution dieser Reste führte zu einem erheblichen Aktivitätsverlust (10, 41, 42). Unter der Annahme, dass die Mutation an Position 38 im Wildtyp *hairpin ribozyme* (A38wt) durch ein Guanosin im ADHR1-nmr Ribozym kritisch für den Verlust dessen katalytischer Aktivität ist, kann vermutet werden,

dass die Funktion des Nukleotids an dieser Sequenzposition im Falle des ADHR1-nmr Ribozyms durch den Cofaktor Adenin eingenommen wird, welcher dann die katalytische Aktivität wiederherstellt. Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen zur Überprüfung dieser Hypothese zeigten allerdings weder eine spezifische Wechselwirkung von Adenin mit der RNA noch die Bildung eines schwach assoziierten RNA-Cofaktor Komplexes. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass mögliche Interaktionen des ADHR1-nmr Ribozym-Motivs mit dem Cofaktor Adenin nur schwach und transient populiert sind und daher weder die spektralen Eigenschaften der RNA noch die des Cofaktors beeinflussen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse lassen vermuten, dass die Barrieren hin zum Übergangszustand für das *Adenin-abhängige Hairpin Ribozym* wesentlich höher sind als für das Wildtyp *hairpin ribozyme*, was so zu einer Abnahme der katalytischen Aktivität führt. Während des katalytischen Mechanismus wird die aktive Konformation nur kurzzeitig populiert; in dieser Konformation kann aber im Falle ihrer Ausbildung die katalytische Reaktion, analog der in natürlich vorkommenden Ribozymen beobachteten Hydrolyse des Phosphatrückgrates, stattfinden. Daher kann vermutet werden, dass für die katalytische Aktivität des ADHR1-nmr Ribozym-Motivs die konformationelle Dynamik und Aktivierung des RNA-Ensembles im Grundzustand und nicht der Prozess der RNA-Spaltreaktion selbst die raten-limitierenden Schritte darstellen.

Das RNA-Ensemble, welches den Grundzustand des ADHR1-nmr Ribozyms charakterisiert, führt zu homogenen NMR-Spektren. Obwohl die strukturellen Unterschiede, die auf den Iminoprotonensignalen detektiert wurden, eher gering sind, muss die katalytisch aktive RNA-Konformation durch Kationen induziert werden. Die katalytische Reaktion selbst, nämlich die Hydrolyse des RNA-Phosphatrückgrates, ist analog zu derjenigen des Wildtyp *hairpin* Ribozym-Motivs. Im Gegensatz zu diesem benötigt das ADHR1-nmr Ribozym allerdings einen zusätzlichen Cofaktor zum Erreichen der katalytischen Aktivität. Betrachtet man die Effizienz und Geschwindigkeit der katalytischen Reaktion, so könnte in der evolutionären Entwicklung die Funktion eines potentiell prebiotischen Cofaktors dann durch funktionelle Gruppen des Ribozyms selbst übernommen worden sein. Adenin kann jedoch im Falle des ADHR1-nmr Ribozyms funktionelle Eigenschaften in der katalytischen Reaktion übernehmen. Damit könnte das ADHR1-nmr Ribozym-Motiv ein Modell für eine katalytische Reaktion in einer prebiotischen 'RNA Welt' darstellen, in welcher Interaktionen von RNA-Molekülen mit Adenin zu einer ersten Entwicklung von effizienten Ribozymen geführt und somit biochemische Reaktionen katalysiert haben könnten.

## LITERATUR

1. Hampel, A., Tritz, R. (1989) RNA catalytic properties of the minimum (-) sTRSV sequence. *Biochemistry*, **28**, 4929-33.
2. Esteban, J.A., Banerjee, A.R., Burke, J.M. (1997) Kinetic mechanism of the hairpin ribozyme. Identification and characterization of two nonexchangeable conformations. *J. Biol. Chem.*, **272**, 13629-39.
3. Walter, N.G., Hampel, K.J., Brown, K.M., Burke, J.M. (1998) Tertiary structure formation in the hairpin ribozyme monitored by fluorescence resonance energy transfer. *EMBO J.*, **17**, 2378-91.
4. Meli, M., Vergne, J., Maurel, M.C. (2003) In vitro selection of adenine-dependent hairpin ribozymes. *J. Biol. Chem.*, **278**, 9835-42.
5. Denessiouk, K.A., Rantanen, V.-V., Johnson, M.S. (2001) Adenine recognition: a motif present in ATP-, CoA-, NAD-, NADP-, and FAD-dependent proteins. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **44**, 282-91.
6. Mandal, M., Breaker, R.R. (2004) Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 29-35.
7. Klug, S.J., Famulok, M. (1994) All you want to know about SELEX. *Mol. Biol. Reports*, **20**, 97-107.
8. Tuerk, C., Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, **249**, 505-10.
9. Berzal-Herranz, A., Joseph, S., Chowrira, B.M., Butcher, S.E., Burke, J.M. (1993) Essential nucleotide sequences and secondary structure elements of the hairpin ribozyme. *EMBO J.*, **12**, 2567-73.
10. Kuzmin, Y.I., Da Costa, C.P., Cottrell, J.W., Fedor, M.J. (2005) Role of an active site adenine in hairpin ribozyme catalysis. *J. Mol. Biol.*, **349**, 989-1010.
11. MacElrevey, C., Salter, J.D., Krucinska, J., Wedekind, J.E. (2008) Structural effects of nucleobase variations at key active site residue Ade38 in the hairpin ribozyme. *RNA*, **14**, 1600-16.
12. Rupert, P.B., Massey, A.P., Sigurdsson, S.T., Ferre-D'Amaré, A.R. (2002) Transition state stabilization by a catalytic RNA. *Science*, **298**, 1421-4.
13. Zucker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3406-15.
14. Sklenar, V., Bax, A. (1987) A new water suppression technique for generating pure-phase spectra with equal excitation over a wide bandwidth. *J. Magn. Reson.*, **75**, 378-83.

15. Schanda, P., Kupce, E., Brutscher, B. (2005) SOFAST-HMQC experiments for recording two-dimensional heteronuclear correlation spectra of proteins within a few seconds. *J. Biomol. NMR*, **33**, 199-211.
16. Goddard, T.D., Kneller, D.G. SPARKY 3. University of California, San Francisco.
17. Butcher, S.E., Burke, J.M. (1994) Structure-mapping of the hairpin ribozyme. Magnesium-dependent folding and evidence for tertiary interactions within the ribozyme-substrate complex. *J. Mol. Biol.*, **244**, 52-63.
18. Fürtig, B., Richter, C., Wöhnert, J., Schwalbe, H. (2003) NMR spectroscopy of RNA. *Chembiochem*, **4**, 936-62.
19. Dingley, A.J., Grzesiek, S. (1998) Direct observation of hydrogen bonds in nucleic acid base pairs by internucleotide  $^2J_{\text{NN}}$  couplings. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 8293-7.
20. Cheong, C., Varani, G., Tinoco, I., Jr. (1990) Solution structure of an unusually stable RNA hairpin, 5'GGAC(UUCG)GUCC. *Nature*, **346**, 680-2.
21. Fürtig, B., Richter, C., Bermel, W., Schwalbe, H. (2004) New NMR experiments for RNA nucleobase resonance assignment and chemical shift analysis of an RNA UUCG tetraloop. *J. Biomol. NMR*, **28**, 69-79.
22. Fedor, M.J. (2002) The catalytic mechanism of the hairpin ribozyme. *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 1109-15.
23. Ferré-D'Amaré, A.R., Rupert, P.B. (2002) The hairpin ribozyme: from crystal structure to function. *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 1105-9.
24. van Tol, H., Buzayan, J.M., Feldstein, P.A., Eckstein, F., Bruening, G. (1990) Two autolytic processing reactions of a satellite RNA proceed with inversion of configuration. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 1971-5.
25. Cai, Z., Tinoco, I., Jr. (1996) Solution structure of loop A from the hairpin ribozyme from tobacco ringspot virus satellite. *Biochemistry*, **35**, 6026-36.
26. Rupert, P.B., Ferré-D'Amaré, A.R. (2001) Crystal structure of a hairpin ribozyme-inhibitor complex with implications for catalysis. *Nature*, **410**, 780-6.
27. Gorenstein, D.G. (1981) Nucleotide conformational analysis by  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **10**, 355-86.
28. Draper, D.E., Grilley, D., Soto, A.M. (2005) Ions and RNA folding. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **34**, 221-43.
29. Hampel, A., Cowan, J.A. (1997) A unique mechanism for RNA catalysis: the role of metal cofactors in hairpin ribozyme cleavage. *Chem. Biol.*, **4**, 513-7.
30. Murray, J.B., Seyhan, A.A., Walter, N.G., Burke, J.M., Scott, W.G. (1998) The hammerhead, hairpin and VS ribozymes are catalytically proficient in monovalent cations alone. *Chem. Biol.*, **5**, 587-95.

31. Cowan, J.A. (1993) Metallobiochemistry of RNA.  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  as a probe for  $\text{Mg}^{2+}(\text{aq})$  binding sites. *J. Inorg. Biochem.*, **49**, 171-5.
32. Sigel, R.K., Pyle, A.M. (2007) Alternative roles for metal ions in enzyme catalysis and the implications for ribozyme chemistry. *Chem. Rev.*, **107**, 97-113.
33. Bevilacqua, P.C., Brown, T.S., Nakano, S., Yajima, R. (2004) Catalytic roles for proton transfer and protonation in ribozymes. *Biopolymers*, **73**, 90-109.
34. Legault, P., Pardi, A. (1997) Unusual dynamics and  $\text{pK}_a$  shift at the active site of a lead-dependent ribozyme. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 6621-8.
35. Jordan, D.O. (1952) Nucleic acids, purines, and pyrimidines. *Annu. Rev. Biochem.*, **21**, 209-44.
36. Buck, J., Fürtig, B., Noeske, J., Wöhnert, J., Schwalbe, H. (2007) Time-resolved NMR methods resolving ligand-induced RNA folding at atomic resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 15699-704.
37. Fedor, M.J. (2009) Comparative Enzymology and Structural Biology of RNA Self-Cleavage. *Annu. Rev. Biophys.*, **38**, 271-99.
38. Bokinsky, G., Rueda, D., Misra, V.K., Rhodes, M.M., Gordus, A., Babcock, H.P., Walter, N.G., Zhuang, X. (2003) Single-molecule transition-state analysis of RNA folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 9302-7.
39. Liu, S., Bokinsky, G., Walter, N.G., Zhuang, X. (2007) Dissecting the multistep reaction pathway of an RNA enzyme by single-molecule kinetic "fingerprinting". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 12634-9.
40. Zhuang, X., Kim, H., Pereira, M.J., Babcock, H.P., Walter, N.G., Chu, S. (2002) Correlating structural dynamics and function in single ribozyme molecules. *Science*, **296**, 1473-6.
41. Fedor, M.J. (2000) Structure and function of the hairpin ribozyme. *J. Mol. Biol.*, **297**, 269-91.
42. Lebruska, L.L., Kuzmine, I.I., Fedor, M.J. (2002) Rescue of an abasic hairpin ribozyme by cationic nucleobases: evidence for a novel mechanism of RNA catalysis. *Chem. Biol.*, **9**, 465-73.

# ANHANG

## ANHANG ZU KAPITEL 2

### Analyse der zeitaufgelösten *real time* NMR-Kinetiken

Die pseudo-3D Datensätze der zeitaufgelösten *real time* NMR-Experimente wurden mit Hilfe des Programms TopSpin 2.1 prozessiert. Die weitere Analyse erfolgte mittels der Software felix2000. Im Folgenden sind die entsprechend verwendeten Makros für die Analyse von Kinetiken nicht-isotopenmarkierter RNA und für die Analyse der *X-filter* Kinetiken von selektiv isotopenmarkierter RNA aufgeführt.

---

```

cfg 2048 8 ; Matrixgröße
cl
set 0
stb 1
def matpfx /home/janina/ ; Matrixpfad
def macpfx /home/janina/mac/ ; Makropfad
get 'input kin-matrix (3dmat-file)' input ; Input 3D Matrix
get 'output name kin-matrix (2dmat-file)' output ; Output 2D Matrix
get 'number of experiments' num_exp ; Anzahl der Ebenen k (F1)
eva num_exp2 ((&num_exp)-1)
bld &output 2 2048 512 0 ; Größe der 2D Matrix (F3/n*k)
for kkk 0 &num_exp2
eva kkm ((&kkk)*256) ; Anzahl der 1Ds/Ebene (n, F2)
eva kkj ((&kkk)+1)
for iii 1 256 ; Anzahl der 1Ds/Ebene (n, F2)
eva kkn ((&kkm)+(&iii))
mat &input
loa 0 &iii &kkj
cmx
mat &output w
sto 0 &kkn
ty &iii &kkn $
cmx
nex
ty
ty &kkk &kkj
nex
end

```

---

**Makro 1:** Konvertiert eine pseudo-3D Matrix (n aufeinanderfolgende 1D Spektren/Ebene, k Ebenen in F1) in eine pseudo-2D Matrix (n\*k 1D Spektren in einer Ebene).



---

```

cfg 2048 8 ; Matrixgröße
cl
set 0
stb 1
def matpfx /home/janina/ ; Matrixpfad
def macpfx /home/janina/mac/ ; Makropfad
get 'input kin-matrix (3dmat-file)' input ; Input 3D Matrix
get 'output kin-matrix (2dmat-file)' output ; Output 2D Matrix
bld &output 2 2048 512 0 ; Größe der 2D Matrix
for iii 1 256 ; Anzahl der 1Ds/Ebene (n, F2)
mat &input
set 0
stb 1
set 0
stb 2
set 0
stb 3
loa 0 &iii 1
stb 2
loa 0 &iii 2
stb 3
cmx
mat &output w
ldb 2
mul -1.0 ; 15N-editierte Kinetik, entfällt für 14N
stb 1
ldb 3
adb 1
ldb 1
sto 0 &iii
cmx
nex
end

```

---

**Makro 2:** Extrahiert die <sup>15</sup>N- bzw. <sup>14</sup>N-editierte Kinetik (*X-filter* Kinetik, Abbildung 2.2) aus der pseudo-3D Matrix und schreibt diese in eine pseudo-2D Matrix. Jeweils zwei aufeinander folgende 1D NMR-Spektren werden dabei addiert bzw. subtrahiert und ergeben den jeweils ersten Datenpunkt der <sup>15</sup>N- bzw. der <sup>14</sup>N-editierten pseudo-2D Matrix.

## ANHANG ZU KAPITEL 4

	Nukleotid	Gsw <sup>loop</sup> (ohne Mg <sup>2+</sup> )		Gsw <sup>loop</sup> (8 eq Mg <sup>2+</sup> )		Gsw <sup>loop</sup> (33 eq Mg <sup>2+</sup> )	
		$\delta$ ( <sup>1</sup> H)	$\delta$ ( <sup>15</sup> N)	$\delta$ ( <sup>1</sup> H)	$\delta$ ( <sup>15</sup> N)	$\delta$ ( <sup>1</sup> H)	$\delta$ ( <sup>15</sup> N)
Helix P1	G12	--	--	--	--	--	--
	G13	12.74	147.57	12.80	147.65	12.88	147.52
	G14	12.38	147.48	12.48	147.38	12.48	147.32
	U17	12.20	158.26	12.17	158.26	12.11	158.26
	U20	13.54	161.82	13.55	161.82	--	--
	U75	--	--	--	--	--	--
	U77	13.89	161.82	13.40	161.82	13.38	161.73
	G78	11.94	147.20	11.94	147.10	11.93	147.01
	G79	10.81	143.35	10.79	143.35	10.77	143.26
	G80	13.45	148.32	13.43	148.23	13.42	148.13
	U81	14.37	162.85	14.43	162.85	14.45	162.76
Helix P2	U26	13.57	162.10	13.68	162.10	13.40	162.29
	G27	12.40	147.48	12.44	147.38	12.39	147.37
	G29	12.84	147.43	12.87	147.37	12.94	147.50
	U30	13.86	162.29	13.86	162.10	13.50	161.35
	G31	12.30	147.48	12.33	147.38	12.17	146.26
	G42	12.82	147.65	12.86	147.65	12.82	147.68
	G45	--	--	--	--	13.11	147.38
Helix P3	G55	12.28	146.63	12.35	146.54	12.65	147.48
	G56	12.84	148.60	12.89	148.41	12.90	148.23
	G57	11.38	145.51	11.36	145.41	11.28	145.70
	U67	--	--	--	--	13.06	162.57
	G68	12.61	147.38	12.62	147.38	12.47	147.32
	U69	12.32	158.82	12.34	158.73	12.31	158.73
	G72	--	--	--	--	--	--
	G72	--	--	--	--	--	--
Schlaufen L2 & L3	G32	--	--	--	--	9.78	146.16
	U34	--	--	--	--	13.78	162.57
	G38	--	--	--	--	13.24	148.32
	U61	--	--	--	--	13.55	160.04

**Tabelle A4.1:** Iminoprotonen NMR-Resonanzzuordnung von Gsw<sup>loop</sup> im Ligand-freien Zustand in Gegenwart unterschiedlicher Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen (T ~283 K, NMR-Puffer (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O ~9:1), alle Angaben der chemischen Verschiebungen  $\delta$  sind in [ppm] angegeben, externe Referenzierung anhand von DSS, --: kein Signal detektierbar).

## ANHANG ZU KAPITEL 6

Nukleotid	ADHR1-nmr (ohne Mg <sup>2+</sup> )		ADHR1-nmr (6 mM Mg <sup>2+</sup> )		ADHR1-nmr & Adenin (6 mM Mg <sup>2+</sup> )		
	$\delta$ ( <sup>1</sup> H)	$\delta$ ( <sup>15</sup> N)	$\delta$ ( <sup>1</sup> H)	$\delta$ ( <sup>15</sup> N)	$\delta$ ( <sup>1</sup> H)	$\delta$ ( <sup>15</sup> N)	
G1	--	--	--	--	--	--	
G2	13.14	148.29	13.21	148.31	13.19	148.29	
G9	12.52	147.16	12.56	147.12	<i>pre</i> 12.56 <i>post</i> 12.68	<i>pre</i> 147.26 <i>post</i> 147.26	
U73	13.42	162.12	13.46	161.98	<i>pre</i> 13.48 <i>post</i> 13.56	<i>pre</i> 162.02 <i>post</i> 162.02	
G74	12.36	147.16	12.31	146.93	<i>pre</i> 12.34 <sup>a</sup> <i>post</i> 12.34 <sup>a</sup>	<i>pre</i> 147.02 <sup>a</sup> <i>post</i> 147.02 <sup>a</sup>	
U75	14.03	162.17	14.03	162.07	14.03	162.07	
U76	13.64	162.54	13.68	162.31	13.68	162.31	
U77	12.93	162.17	13.06	161.84	13.06	161.84	
G78	12.35	147.49	12.39	147.44	12.38	147.44	
Helix 2	G14	12.54	147.91	12.67	147.91	12.64	147.91
	U15	14.15	162.73	14.14	162.68	14.15	162.63
	U64	--	--	--	--	--	--
	G65	11.90	146.65	11.80	146.37	11.79	146.37
Helix 3	G22	12.98	148.34	13.02	148.34	13.02	148.34
	U54	13.26	162.07	13.31	161.93	13.31	161.88
	G55	11.82	146.32	11.89	146.04	11.89	146.04
	G56	13.06	148.10	13.15	148.01	13.15	148.05
	U57	--	--	--	--	--	--
Helix 4	G33	12.73	147.59	12.87	147.49	12.86	147.54
	G38	9.75	143.18	9.75	143.23	9.74	143.23
	G39	13.27	148.10	13.27	148.24	13.27	148.24
	G41	12.81	147.49	12.79	147.21	12.79	147.21
	U42	13.89	162.45	13.98	162.12	13.99	162.12
	G43	12.10	147.49	12.27	147.77	12.27	147.77

**Tabelle A6.1:** Iminoprotonen NMR-Resonanzzuordnungen der RNA-Konformationen von ADHR1-nmr in Gegenwart verschiedener Cofaktoren (800 MHz, T ~293 K, HEPES-Puffer (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O ~9:1), alle Angaben der chemischen Verschiebungen  $\delta$  sind in [ppm] angegeben, --: kein Signal detektierbar, a: Signale der entsprechenden RNA-Konformationen können nicht aufgelöst werden, *pre*: entspricht der RNA-Konformation vor der katalytischen Spaltreaktion, *post*: entspricht der RNA-Konformation nach Ablauf der katalytischen Spaltreaktion).



## ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl zahlreiche zelluläre Funktionen von RNAs in direktem Zusammenhang mit Proteinen stehen, wurde auch eine Vielzahl von, unter anderem regulatorischen, RNA-Motiven identifiziert, die ihre Funktion ohne eine initiale Beteiligung von Proteinen ausüben. Das detaillierte Verständnis der zu Grunde liegenden Regulationsmechanismen beinhaltet die Charakterisierung von beteiligten RNA-Architekturen und deren funktionaler Stabilitäten, von dynamischen Aspekten der RNA-Faltungsprozesse sowie die Korrelation dieser Charakteristika mit zellulären Funktionen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden strukturelle, thermodynamische und kinetische Aspekte der Ligand-bindenden Guanin Riboswitch-RNA Aptamerdomäne des *xpt-pbuX* Operons aus *B. subtilis* und eines Cofaktor-abhängigen katalytischen RNA-Motivs, des 'Adenin-abhängigen Hairpin Ribozym', untersucht.

Dem Modell der durch Riboswitch-RNA Elemente vermittelten Genregulation zufolge werden in Abhängigkeit der Konzentration eines jeweils spezifischen Liganden alternative RNA-Konformationen der Ligand-Bindungsdomäne (Aptamerdomäne) stabilisiert, welche die Ausbildung eines 3'-nachfolgenden Strukturelementes und infolge die Genexpression beeinflussen. Die Untersuchung der Ligand-induzierten Faltungsprozesse der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne wurde durch die Licht-induzierte Aktivierung des chemisch synthetisierten, photogeschützten Liganden und anschließender Detektion mittels zeit-aufgelöster NMR-Methoden erreicht. Um bei der Größe der untersuchten RNA die Analyse der Geschwindigkeitskonstanten individueller Signale zu ermöglichen, wurde eine Kombination aus selektiver Isotopenmarkierung und NMR-Filtermethoden entwickelt. Auf der Basis der Analyse von NMR-Linienbreiten wurde zusätzlich eine schwach affine und nicht-spezifische Ligandbindung der Riboswitch-RNA postuliert. Das Einbeziehen der NMR-spektroskopischen Daten in MD-Simulationen ermöglichte einen Einblick in den Ligand-Bindungsprozess involvierte RNA-Strukturensembles und damit die Beschreibung eines Modells dieses Ligand-induzierten RNA-Faltungsprozesses. Mittels NMR-spektroskopischer und biophysikalischer Methoden wurde der Einfluss von RNA-Mg<sup>2+</sup>-Interaktionen auf die RNA-Konformationen der Guanin Riboswitch Aptamerdomäne (Gsw<sup>ap</sup>) und der G37A/C61U-Mutante (Gsw<sup>loop</sup>) im Ligand-freien und -gebundenen Zustand und auf die Stabilitäten individueller Strukturelemente untersucht. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Funktion des interhelikalen Tertiärstrukturelementes, die Verknüpfung der Tertiärstrukturausbildung mit Ligand-Bindungscharakteristika und die funktionalen Stabilitäten der Riboswitch-RNAs analysiert. RNA-Mg<sup>2+</sup>-Interaktionen beeinflussen zum einen wesentlich die Temperaturabhängigkeit der

funktionalen Stabilitäten von  $Gsw^{apt}$  und  $Gsw^{loop}$ . Zum anderen variiert die konformationelle Dynamik der  $Gsw^{loop}$ -RNA im freien Zustand in Abhängigkeit der  $Mg^{2+}$ -Konzentration, was infolge die Eigenschaften der  $Gsw^{loop}$ -Ligand Komplexbildung beeinflusst. Dies betrifft sowohl nicht-spezifische Ligand-Bindungsprozesse als auch die spezifische RNA-Ligand Komplexbildung. Durch die Nukleotid-spezifische Auflösung der zeitaufgelösten NMR-Kinetiken konnte sowohl die Cofaktor-Abhängigkeit der Strukturausbildung der Ligand-Bindungstasche als auch der Strukturveränderungen entfernt lokalisierter Tertiärstrukturbereiche differenziert analysiert werden. Die unterschiedlichen Charakteristika der RNA-Ensembles der Ausgangs- und Endzustände der RNA-Faltungsprozesse ermöglichte die Analyse der Zusammenhänge zwischen Ladungskompensation, Tertiärstrukturausbildung und konformationeller Dynamik und der spezifischen Ligand-induzierten RNA-Faltungsprozesse. Die zeitaufgelösten NMR-Untersuchungen der Faltungsprozesse der Guanin Riboswitch Aptamerdomänen und deren  $Mg^{2+}$ -Abhängigkeiten zeigten, dass die Geschwindigkeit des Ligand-Bindungsprozesses sensitiv reguliert und wesentlich von strukturellen und Kationen-induzierten Eigenschaften des RNA-Ensembles der Ligand-freien Konformation abhängig ist. Die Ausbildung des interhelikalen Tertiärstrukturelementes und RNA- $Mg^{2+}$ -Interaktionen beeinflussen nicht nur die Stabilität der RNA-Struktur, sondern auch die Kinetik des Ligand-Bindungsprozesses.

Das '*Adenin-abhängige Hairpin Ribozym*'-Motiv stellt ein Modellsystem eines Ribozyms dar, bei dem katalytische Aktivität durch den exogenen Liganden Adenin induziert wird. Das Verständnis dessen Katalyse erfordert daher die Beantwortung der Fragen, wie die katalytische Aktivität, d. h. die hydrolytische Spaltung des RNA-Phosphatrückgrats, im Detail verwirklicht wird und welche strukturellen Konformationsänderungen mit dem katalytischen Spaltprozess verbunden sind. Mittels NMR-spektroskopischer Methoden wurden die RNA-Konformationen vor und nach der katalytischen Spaltreaktion charakterisiert. Eine dem natürlich vorkommenden *hairpin ribozyme* analoge chemische Spaltreaktion des RNA-Phosphatrückgrats konnte basierend auf der Charakterisierung des 2',3'-zyklischen Phosphodiester als Reaktionsprodukt mittels  $^{31}P$ -NMR-Spektroskopie für das '*Adenin-abhängige Hairpin Ribozym*' bestätigt werden. Der strukturelle und funktionelle Einfluss der essentiellen Cofaktoren Adenin und  $Mg^{2+}$  auf die Katalyse des Ribozym-Motivs wurde mittels NMR-spektroskopischer und biophysikalischer Methoden untersucht. Die Zeitskala der katalytischen Reaktion, die über Minuten stattfindet, ermöglichte die Untersuchung des katalytischen RNA-Spaltprozesses mittels zeitaufgelöster NMR-Methoden. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen eine konformationelle Umorientierung der RNA als Folge des Adenin-induzierten Spaltprozesses die im Bereich um das aktive Zentrum erfolgt.



# DANKSAGUNG

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich bei allen ganz herzlich bedanken, die mich während der letzten Jahre unterstützt und begleitet und auf unterschiedlichste Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt zuerst Prof. Dr. Harald Schwalbe für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und für die interessanten und vielseitigen Themenstellungen. Ich möchte mich besonders herzlich bedanken für zahlreiche wertvolle Anregungen und Diskussionen und nicht zuletzt für die wissenschaftliche Freiheit und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Bedanken möchte ich mich besonders auch bei Prof. Dr. Jens Wöhnert für hilfreiche Ratschläge und viele Diskussionen rund um '*NMR von RNA*' im Allgemeinen und '*Riboswitch-RNAs*' im Besonderen.

Christian danke ich für die unschätzbare Hilfe in allen NMR-Fragen, insbesondere für die Zusammenarbeit am '*<sup>13</sup>C-direct detection*'-Projekt und nicht zuletzt für die äußerst lustige Zeit neben der NMR. Danke auch an Gottfried für allerlei kreative Ideen und Hilfe bei verschiedensten Problemen rund um das Spektrometer und die ansteckend gute Laune. Ein besonderer Dank geht an Boris für zahlreiche fachliche Diskussionen, für die ständige Hilfsbereitschaft, die unterhaltsamen Zeiten am Spektrometer und amüsante Abende auf verschiedensten Konferenzen.

Dr. Marie-Christine Maurel und Dr. Yan-Li Li (University Pierre & Marie Curie, Paris) danke ich für die Bereitstellung der NMR-Proben und die Kooperation im Rahmen des Projektes am '*Adenin-abhängigen Hairpin Ribozym*'.

Mein Dank geht auch an Prof. Dr. Volker Dötsch, Robert Hänsel und Dr. Frank Löhr (Goethe-Universität, Frankfurt a. M.) für die interessante und erfolgreiche Kooperation im Rahmen des '*in-cell NMR*'-Projektes.

Anna und Elena danke ich für die freundliche, jederzeit hilfsbereite und kompetente Unterstützung im organisatorischen Alltag. Ich danke Euch außerdem für Kekse und Cola in letzter Minute und interessante Gespräche über alles Mögliche ob bei Kaffee oder zu späterer Stunde.



Bei Elke möchte ich mich für zahlreiche HPLC-Aufreinigungen bedanken, dafür, dass ich diese in *Notzeiten* auch selbst durchführen durfte und die nette Gesellschaft beim frühmorgendlichen Kaffee.

Herrn Klaus Müller und seinem Werkstattteam möchte ich herzlich danken für die freundliche, professionelle und kreative *Übersetzung* meiner eher vagen Beschreibungen einer Mischapparatur.

Danken möchte ich auch Martin, der in dieser *Zeit* der Ansprechpartner für alle Computerprobleme war und -glücklicherweise- auch immer Antworten hatte.

Ich danke allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit und die fachlichen Diskussionen, die das ein oder andere mal an der Lösung kleiner und größerer Probleme beteiligt waren und natürlich danke ich Euch für das *darüber hinaus*. Die Konferenzen, zahlreiche sehr abwechslungsreiche Kaffeepausen, allerlei ereignisreiche Tage, Grill- und Weinabende und *group trips* werden mir in guter Erinnerung bleiben.

Ich danke vor allem den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des *Girls room* für zahlreiche lustige Momente und amüsante Gespräche, die für die nötige Abwechslung im Alltag sorgten. Ein besonderer Dank geht an meine direkten *Nachbarn*: Gerd -thanks, for being in the same universe and for 'es könnte schlimmer kommen', Karla und Anna Lena -wir sehen uns dann auf Bora-Bora.... Ein herzliches Dankeschön geht besonders auch an Anna - für 'Kaffee und Cappuccino', Gespräche über Wissenschaft oder anderes und das kritische Korrekturlesen; an Steffen - für *bench meetings*, das Korrekturlesen dieser Arbeit, für *Kängurus* und andere Geschichten; an Jonas - für alles rund um die Riboswitch-RNAs; natürlich an das *Weinkomitee* (ihr wisst schon, wer gemeint ist....) - für Jaques, *chez Rehm* und alles darum herum und an die *üblichen Verdächtigen* für zahlreiche unentbehrliche Abwechslungen zwischendurch.

Ich danke Hannes, Martin, Michaela und Momo für die wöchentlichen Treffen, die unterhaltenden Gespräche über *dies und das* und alles darüber hinaus.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Familie und meine Freunde. Ich danke Euch von ganzem Herzen für Eure unschätzbar wertvolle Unterstützung, Euer Verständnis, die Ablenkung in der Welt neben der Chemie und *alles* andere. Vielen Dank.



## PUBLIKATIONEN

- (1) **J. Buck**, B. Fürtig, J. Noeske, J. Wöhnert, H. Schwalbe, 2007, Time-resolved NMR methods resolving ligand-induced RNA folding at atomic resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 15699-704.
- (2) J. Noeske, **J. Buck**, B. Fürtig, H. Nasiri, H. Schwalbe, J. Wöhnert, 2007, Interplay of 'induced fit' and preorganization in the ligand induced folding of the aptamer domain of the guanine binding riboswitch, *Nucleic Acids Res.*, 35, 572-83.
- (3) H. Schwalbe, **J. Buck**, B. Fürtig, J. Noeske, J. Wöhnert, 2007, Structures of RNA switches: insight into molecular recognition and tertiary structure, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 1212-19.
- (4) B. Fürtig, **J. Buck**, V. Manoharan, W. Bermel, A. Jäschke, P. Wenter, S. Pitsch, H. Schwalbe, 2007, Time-resolved NMR studies of RNA folding, *Biopolymers*, 86, 360-83.
- (5) **J. Buck**, B. Fürtig, J. Noeske, J. Wöhnert, H. Schwalbe, 2009, Time-resolved NMR spectroscopy: ligand-induced refolding of riboswitches, *Methods of Molecular Biology*, (Riboswitches, A. Serganov (ed.)), 540, 161-71.
- (6) J. Noeske, **J. Buck**, J. Wöhnert, H. Schwalbe, 2009, Ligand binding and conformational changes in the purine-binding riboswitch aptamer domains, *Springer Series in Biophysics 13 (Non-Protein Coding RNAs, N. G. Walter, S. Woodson, R. T. Batey (ed.))*, 229-47.
- (7) **J. Buck**, Y.-L. Li, C. Richter, J. Vergne, M.-C. Maurel, H. Schwalbe, 2009, NMR-spectroscopic characterization of the adenine-dependent hairpin ribozyme, *ChemBiochem*, 10, 2100-10.
- (8) R. Hänsel, S. Foldynová-Trantírková, F. Löhr, **J. Buck**, E. Bongartz, E. Bamberg, H. Schwalbe, V. Dötsch, L. Trantírek, 2009, Evaluation of parameters critical for observing nucleic acids inside living *Xenopus laevis* oocytes by in-cell NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 15761-8.
- (9) **J. Buck**, J. Noeske, J. Wöhnert, H. Schwalbe, 2010, Dissecting the influence of Mg<sup>2+</sup> on 3D architecture and ligand-binding of the guanine-sensing riboswitch aptamer domain, *Nucleic Acids Res.*, 38, 4143-53.
- (10) C. Richter, H. Kovacs, **J. Buck**, A. Wacker, B. Fürtig, W. Bermel, H. Schwalbe, 2010, <sup>13</sup>C-direct detected NMR experiments for the sequential J-based resonance assignment of RNA oligonucleotides, *J. Biomol. NMR*, 47, 259-69.
- (11) **J. Buck**, H. Schwalbe, 2010, Influence of ground-state structure and Mg<sup>2+</sup> binding on folding kinetics of the guanine-sensing riboswitch aptamer domain, in preparation.



# CURRICULUM VITAE

## JANINA BUCK

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Geburtsdatum	06. April 1980
Geburtsort	VS-Villingen
Nationalität	deutsch

### SCHULAUSSBILDUNG

---

09/1986 - 07/1990	Grund- und Hauptschule Tannheim
09/1990 - 06/1999	Gymnasium am Romäusring, VS-Villingen (Abitur)

### STUDIUM

---

10/1999 - 03/2005	Studium der Chemie, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main (Diplom im Fach Chemie)
11/2001	Vordiplom im Fach Chemie, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main
09/2002 - 12/2002	Auslandsaufenthalt an der University of Sheffield, Großbritannien, in der Gruppe von Prof. G. M. Blackburn
10/2004 - 03/2005	Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main (Betreuer: Prof. Dr. H. Schwalbe) <i>Titel: Chemische, biochemische und NMR-spektroskopische Untersuchungen der Kinetik der ligandinduzierten Umfaltung von Riboswitch-RNA</i>
06/2005 - 10/2010	Dissertation am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main (Betreuer: Prof. Dr. H. Schwalbe) <i>Titel: Struktur und Dynamik Ligand-abhängiger regulatorischer RNA-Motive</i>

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. C. Griesinger, Prof. Dr. A.S.K. Hashmi, Prof. Dr. G. Kauert, Prof. Dr. B.O. Kolbesen, Prof. Dr. D. Rehm, Prof. Dr. E.-A. Reinsch, Prof. Dr. H. Roskos, Prof. Dr. M.U. Schmidt, Prof. Dr. H. Schmidt-Böcking, Prof. Dr. H. Schwalbe, Prof. Dr. T. Prisner, Prof. Dr. J. Wachtveitl, Prof. Dr. M. Wagner, Prof. Dr. V. Wittmann, Prof. Dr. J. Wöhnert