

Struktur-, Dynamik- und Stabilitätsuntersuchungen an RNA mittels NMR-Spektroskopie

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Jörg Rinnenthal
aus Frankfurt am Main

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 und Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Datum der Disputation: 19.10.2010

„Freude am Schauen und Begreifen ist die schönste Gabe der Natur.“

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-------------|
| | Abkürzungsverzeichnis..... | XII |
| 1 | Einleitung..... | 1-1 |
| 1.1 | <i>Strukturbiologie</i> | <i>1-1</i> |
| 1.2 | <i>NMR-Spektroskopie.....</i> | <i>1-3</i> |
| 1.2.1 | Resonanzzuordnung..... | 1-3 |
| 1.2.2 | Strukturaufklärung | 1-4 |
| 1.2.2.1 | Chemische Verschiebung (CSI, TALOS)..... | 1-5 |
| 1.2.2.2 | NOE bzw. ROE..... | 1-5 |
| 1.2.2.3 | Skalare ³ J-Kopplungen..... | 1-6 |
| 1.2.2.4 | Residuale dipolare Kopplungen (RDCs)..... | 1-8 |
| 1.2.2.5 | Residuale chemische Verschiebungsanisotropie (rCSA)..... | 1-9 |
| 1.2.2.6 | Kreuzkorrelierte Relaxationsraten (Γ^c) | 1-9 |
| 1.2.2.7 | Skalare ^h J-Kopplungen..... | 1-10 |
| 1.2.2.8 | Austausch mit dem Lösungsmittel..... | 1-11 |
| 1.2.2.9 | Paramagnetische Relaxationsbeschleunigung (PRE)..... | 1-12 |
| 1.2.3 | Funktion, Dynamik und Stabilität | 1-12 |
| 1.2.3.1 | Schnelle Dynamik..... | 1-13 |
| 1.2.3.2 | Schneller Austausch..... | 1-14 |
| 1.2.3.3 | Mittlerer Austausch..... | 1-16 |
| 1.2.3.4 | Langsamer Austausch | 1-17 |
| 2 | FourU RNA-Thermometer: Beschreibung der temperaturabhängigen Basenpaarstabilitäten sowie des Schmelzvorgangs des <i>Salmonella</i> FourU RNA-Thermometers..... | 2-20 |
| 2.1 | <i>Einleitung.....</i> | <i>2-20</i> |
| 2.2 | <i>Material und Methoden.....</i> | <i>2-24</i> |
| 2.2.1 | NMR-Spektroskopie | 2-24 |
| 2.2.1.1 | Resonanzzuordnung der Iminoprotonen | 2-24 |
| 2.2.1.2 | Resonanzzuordnung aller NMR-aktiven Kerne der 4U-hp2-wt RNA | 2-25 |
| 2.2.1.3 | „ <i>Inversion Recovery</i> “ Experimente..... | 2-30 |
| 2.2.2 | RNA-Präparation | 2-31 |
| 2.2.3 | Native Gelelektrophorese..... | 2-31 |
| 2.2.4 | Denaturierende Gelelektrophorese..... | 2-32 |

| | | |
|----------|---|--------------|
| 2.2.5 | CD-Spektroskopie..... | 2-32 |
| 2.2.6 | Analyse der Iminoprotonenaustauschraten | 2-35 |
| 2.2.7 | Bestimmung der Mononukleotid-Iminoprotonenaustauschraten | 2-44 |
| 2.2.8 | Nachweis und Lokalisierung von Mg ²⁺ -Bindestellen | 2-45 |
| 2.2.8.1 | Analyse der Änderungen der Chemischen Verschiebung..... | 2-45 |
| 2.2.8.2 | Linienverbreiterung durch paramagnetische Ionen..... | 2-46 |
| 2.2.8.3 | Lokalisierung von Mg ²⁺ -Bindestellen mit Hilfe von Co(NH ₃) ³⁺ | 2-49 |
| 2.2.8.4 | Die Mg ²⁺ -Abhängigkeit des Schmelzpunktes T _m der RNA | 2-50 |
| 2.3 | <i>Ergebnisse und Diskussion</i> | 2-51 |
| 2.3.1 | Probenpräparation | 2-51 |
| 2.3.2 | NMR-Resonanzzuordnung..... | 2-52 |
| 2.3.2.1 | NMR-Resonanzzuordnung Iminoprotonen..... | 2-52 |
| 2.3.2.2 | Resonanzzuordnung aller NMR-aktiver Kerne der 4U-hp2-wt RNA..... | 2-56 |
| 2.3.3 | Temperaturabhängige Austauschraten der offenen Konformation..... | 2-64 |
| 2.3.4 | Bestimmung der Iminoprotonenaustauschraten und deren Temperaturabhängigkeit mittels NMR-Spektroskopie..... | 2-65 |
| 2.3.5 | Thermodynamische Stabilität der einzelnen Nucleobasen..... | 2-69 |
| 2.3.5.1 | Einfluss von MgCl ₂ auf die thermodynamische Stabilität einzelner Nucleobasen..... | 2-72 |
| 2.3.6 | Der thermische Entfaltungsübergang des RNA-Thermometers..... | 2-78 |
| 2.3.7 | Enthalpie-Entropie-Korrelationen und deren Auswirkungen..... | 2-83 |
| 2.3.7.1 | Signifikanz der Enthalpie-Entropie-Korrelationen (EEK)..... | 2-89 |
| 2.3.8 | Thermodynamische Analyse der globalen Entfaltung des Wildtyps sowie zweier Mutanten des FourU RNA-Thermometers | 2-90 |
| 2.3.9 | Nachweis und Lokalisierung von Mg ²⁺ -Bindestellen innerhalb des FourU RNA-Thermometers..... | 2-93 |
| 2.3.9.1 | Mg ²⁺ -Titration der 4U-hp2-wt RNA | 2-93 |
| 2.3.9.2 | Lokalisierung der Mg ²⁺ -Bindestelle der 4U-hp2-wt RNA über Analyse der Linienverbreiterungen ausgelöst durch paramagnetische Mn ²⁺ -Ionen..... | 2-96 |
| 2.3.9.3 | Lokalisierung von Mg ²⁺ -Bindestellen mit Hilfe von Co(NH ₃) ³⁺ | 2-98 |
| 2.3.9.4 | Bestimmung der Mg ²⁺ -Dissoziationskonstante K _{Mg} mittels CD-Spektroskopie..... | 2-100 |
| 3 | Dynamische Untersuchungen am Phosphodiesterückgrat einer perdeutierten cUUCGg-tetraloop-RNA mittels ³¹P-NMR-Relaxationsanalyse..... | 3-102 |

| | | |
|----------|--|--------------|
| 3.1 | <i>Einleitung</i> | 3-102 |
| 3.2 | <i>Methoden</i> | 3-105 |
| 3.2.1 | Probenpräparation | 3-105 |
| 3.2.2 | Native Gelelektrophorese..... | 3-107 |
| 3.2.3 | Flüssig-NMR-Spektroskopie..... | 3-108 |
| 3.2.4 | Festkörper-NMR-Spektroskopie | 3-109 |
| 3.2.5 | Datenanalyse | 3-109 |
| 3.2.5.1 | Festkörper-NMR-Spektren..... | 3-109 |
| 3.2.5.2 | Flüssig-NMR-Spektren | 3-110 |
| 3.3 | <i>Ergebnisse und Diskussion</i> | 3-112 |
| 3.3.1 | Native Gelelektrophorese..... | 3-112 |
| 3.3.2 | R ₁ - und R ₂ -Relaxation in Lösung..... | 3-112 |
| 3.3.3 | Dipolare Beiträge zur Relaxation..... | 3-113 |
| 3.3.4 | CSA-Relaxationsbeiträge..... | 3-114 |
| 3.3.5 | Der ³¹ P-CSA-Tensor: Größe und Orientierung..... | 3-115 |
| 3.3.6 | Relaxationsanalyse der perdeuterierten RNA | 3-120 |
| 3.3.7 | Modelfree-Analyse..... | 3-123 |
| 3.4 | <i>Fazit</i> | 3-131 |
| 4 | Analyse kreuzkorrelierter Relaxationsraten | 4-133 |
| 4.1 | <i>Das quantitative Γ-HCNCH-Experiment: Bestimmung des glykosidischen Torsionswinkels χ in RNA-Oligonukleotiden über die Analyse CH-dipolarer kreuzkorrelierter Relaxationsraten</i> | <i>4-133</i> |
| 4.1.1 | Einleitung..... | 4-133 |
| 4.1.2 | Material und Methoden..... | 4-135 |
| 4.1.2.1 | NMR-Spektroskopie | 4-135 |
| 4.1.2.2 | MD-Simulation | 4-136 |
| 4.1.3 | Theorie | 4-137 |
| 4.1.3.1 | Einfluss anisotroper Rotationsdiffusion des RNA-Moleküls..... | 4-141 |
| 4.1.3.2 | Pulssequenz..... | 4-144 |
| 4.1.4 | Resultate und Diskussion | 4-152 |
| 4.1.4.1 | cUUCGg-tetra ^{loop} -14mer-RNA | 4-152 |
| 4.1.4.2 | SLD-30mer-RNA..... | 4-159 |
| 4.1.5 | Fazit | 4-166 |

| | | |
|-----------|--|--------------|
| 4.2 | <i>Das quantitative 3D-Γ-HCCCH-Experiment: Bestimmung von Pseudorotationsphase P sowie Amplitude v^{max} in ^{13}C-markierten RNA-Oligonukleotiden über die Analyse CH-dipolarer gekreuzkorrelierter Relaxationsraten</i> | 4-167 |
| 4.2.1 | Einleitung | 4-167 |
| 4.2.2 | Material und Methoden | 4-169 |
| 4.2.3 | Theorie | 4-169 |
| 4.2.3.1 | Bestimmung der Ribosekonformation in RNA-Oligonukleotiden über bereits existierende Methoden | 4-169 |
| 4.2.3.1.1 | Analyse skalarer ^3J -Kopplungen | 4-169 |
| 4.2.3.1.2 | Analyse dipolarer gekreuzkorrelierter Relaxationsraten des Typs $\Gamma_{C'1'H1',C'2'H2'}^{DD,DD}$, $\Gamma_{C'2'H2',C'3'H3'}^{DD,DD}$ und $\Gamma_{C'3'H3',C'4'H4'}^{DD,DD}$ | 4-170 |
| 4.2.3.2 | Entwicklung neuer Methoden zur Bestimmung der Ribosekonformation in RNA-Oligonukleotiden. Analyse dipolarer gekreuzkorrelierter Relaxationsraten des Typs $\Gamma_{C'1'H1',C'3'H3'}^{DD,DD}$, $\Gamma_{C'2'H2',C'4'H4'}^{DD,DD}$ und $\Gamma_{C'1'H1',C'4'H4'}^{DD,DD}$ | 4-172 |
| 4.2.3.3 | Pulssequenz | 4-178 |
| 4.2.4 | Ergebnisse und Diskussion | 4-182 |
| 4.2.5 | Fazit | 4-186 |
| 5 | 3D-HNHC: Ein Tripelresonanzexperiment für die Korrelation der H2-, N1(N3)- und C2-Resonanzen in Adenin-Nukleobasen ^{13}C-, ^{15}N-markierter RNA-Oligonukleotide | 5-187 |
| 5.1 | <i>Einleitung</i> | 5-187 |
| 5.2 | <i>Ergebnisse und Diskussion</i> | 5-189 |
| 5.2.1 | Pulssequenz | 5-189 |
| 5.2.2 | Anwendung des 3D-HNHC-Experiments | 5-196 |
| 5.3 | <i>Fazit</i> | 5-198 |
| 6 | Zusammenfassung | 6-199 |
| 7 | Anhang | 7-203 |
| 7.1 | <i>Resonanzzuordnung der 4U-hp2-wt RNA</i> | 7-203 |
| 7.2 | <i>Akquisitionsparameter der NMR-Experimente</i> | 7-205 |
| 7.2.1 | FourU RNA-Thermometer | 7-205 |
| 7.2.2 | ^{31}P -Relaxationsmessungen ^2H -markierte 14mer-RNA | 7-210 |

| | | |
|-----------|--|---------------|
| 7.2.3 | Festkörper-NMR-Messungen..... | 7-211 |
| 7.2.4 | Kreuzkorrelierte Relaxationsraten..... | 7-212 |
| 7.3 | <i>Pulsprogramme</i> | 7-215 |
| 7.3.1 | Γ -HCNCH-Referenzexperiment (Detektion auf $H1'$)..... | 7-215 |
| 7.3.2 | Γ -HCNCH-Kreuzexperiment (Detektion auf $H1'$)..... | 7-220 |
| 7.3.3 | Γ -HCNCH-Referenzexperiment (Detektion auf H6/H8) | 7-225 |
| 7.3.4 | Γ -HCNCH-Kreuzexperiment (Detektion auf H6/H8)..... | 7-230 |
| 7.3.5 | 3D- Γ -HCCCCH | 7-235 |
| 7.3.6 | 3D-HNHC (Soft Watergate) | 7-239 |
| 7.3.7 | 3D-HNHC (Echo/Antiecho, <i>sensitivity enhanced</i>)..... | 7-243 |
| 7.3.8 | 3D-HNHC (Echo/Antiecho, TROSY)..... | 7-247 |
| 8 | Literatur | 8-251 |
| 9 | Danksagung | 9-273 |
| 10 | Publikationen | 10-275 |
| 11 | Lebenslauf | 11-277 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------------------|---|
| 1D | eindimensional |
| 2D | zweidimensional |
| 3D | dreidimensional |
| 4U | FourU |
| A | Adenin bzw. Adenosin |
| AIC | Akaike`s Informationskriterium |
| A.U. | arbitrary units |
| B_0 | Feldstärke des magnetischen Hauptfeldes |
| BMRB | Biological Magnetic Resonance Data Bank |
| bp | Basenpaar |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin bzw. Cytidin |
| ca. | circa |
| CD | Circulardichroismus |
| COSY | Correlated Spectroscopy |
| $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ | Kobalthexamin-Ion |
| CP | Kreuzpolarisation |
| CPMG | Carr-Purcell-Meiboom-Gill |
| CSA | chemische Verschiebungsanisotropie (chemical shift anisotropy) |
| CSP | chemical shift perturbation |
| d1 | Wartezeit zwischen zwei Transienten während eines NMR-Experiments |
| D_2O | deutertes Wasser |
| Da | Dalton |
| DFT | Dichtefunktionaltheorie |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DQ | Doppelquanten |
| Dr. | Doktor |
| ds-DNA | doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure |
| DSS | 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure |

| | |
|---|---|
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EEK | Enthalpie-Entropie-Korrelation |
| et al. | und andere |
| FID | free induction decay |
| G | Guanin, Guanosin |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| H ₂ O | Wasser |
| HPLC | high performance liquid chromatography |
| HSQC | heteronuclear single quantum coherence |
| Hz | Hertz |
| INEPT | insensitive nuclei enhanced by polarization transfer |
| IPAP | Inphase Antiphase |
| KCl | Kaliumchlorid |
| KH ₂ PO ₄ | Kaliumdihydrogenphosphat |
| K ₂ HPO ₄ | Dikaliumhydrogenphosphat |
| K _x K _y PO ₄ | Mischung aus Kaliumdihydrogenphosphat und Dikaliumhydrogenphosphat |
| MAS | magic angle spinning |
| MCS | multiple cloning site |
| MD | Molekulardynamik |
| MES | 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| Mn ²⁺ | Mangan-Ion |
| mRNA | messenger RNA (Boten-RNA) |
| mut | Mutante |
| MWCO | molecular weight cutoff |
| nm | Nanometer |
| NMR | Kernmagnetresonanz (nuclear magnetic resonance) |
| NOE | Kern-Overhauser-Effekt (Nuclear Overhauser Effect) |
| NOESY | Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy |
| PAA | Polyacrylamid |
| PD | Privatdozent |

| | |
|--------|--|
| pdb | protein data bank |
| ppm | parts per million |
| PRE | paramagnetic relaxation enhancement |
| Prof. | Professor |
| RDC | residuale dipolare Kopplung |
| RF | Radiofrequenz |
| RMSD | root mean square deviation |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROE | rotating frame Overhauser effect |
| rpm | rounds per minute |
| SD | Shine-Dalgarno |
| T | Thymin, Thymidin |
| TOCSY | Total Correlation Spectroscopy |
| TROSY | Transverse relaxation optimized spectroscopy |
| tRNA | transfer-RNA |
| UTP | Uridintriphosphat |
| UTR | Untranslatierte Region |
| UV | Ultraviolett |
| WT, wt | Wildtyp |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZQ | Nullquanten |

1 Einleitung

1.1 Strukturbiologie

Die dem Leben zugrunde liegenden Mechanismen werden in fundamentaler Weise durch die Funktionen von Biomakromolekülen und ihren Interaktionen untereinander bestimmt. Die Erforschung dieser Funktionen stellt daher eine der zentralen Aufgaben der Wissenschaften dar, deren Ziel es ist, die fundamentalen Prinzipien der Natur des Lebens zu verstehen. Die modernen Wissenschaftszweige der Biologie, Molekularbiologie, Biochemie und biophysikalischen Chemie nähern sich den sich daraus ergebenden Fragestellungen auf unterschiedliche Weise und mit unterschiedlichen Methoden. Während in der Molekularbiologie der genetische Code manipuliert wird, um die daraus resultierenden Auswirkungen zu studieren, beschäftigen sich Biochemie und biophysikalische Chemie hauptsächlich mit der Untersuchung der Eigenschaften der Biomakromoleküle und deren Funktionen.

Biochemische Abläufe werden hauptsächlich durch die drei wichtigsten Gruppen von Biomakromolekülen bestimmt. Die Funktionen und Interaktionen von DNA, RNA und Proteinen stehen aus diesem Grunde im Fokus der aktuellen Forschung auf diesem Gebiet. Um die Funktionsweise dieser Makromoleküle im Detail verstehen zu können, ist die Kenntnis ihrer Struktur von grundlegender Bedeutung. Es existieren mittlerweile verschiedene Methoden, mit denen die Struktur eines Biomakromoleküls bestimmt werden kann. Dazu gehören die Röntgenkristallographie, die Neutronenbeugung, die Kernmagnetresonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie) und die Elektronenmikroskopie. Während die Neutronenbeugung aufgrund des hohen Aufwands und der geringen Anzahl an verfügbaren Neutronenquellen eine untergeordnete Bedeutung hat, werden vor allem Proteinstrukturen überwiegend mittels Röntgenkristallographie bestimmt. Voraussetzung für eine erfolgreiche Strukturbestimmung mittels Röntgenkristallographie ist das Züchten von homogenen, hochgeordneten Kristallen. Während die Züchtung solcher Kristalle für lösliche Proteine in den meisten Fällen

erfolgreich ist, stellt die Züchtung geordneter Kristalle von Membranproteinen in vielen Fällen ein großes Problem dar. Aus diesem Grund spielt die Elektronenmikroskopie bei der Strukturbestimmung von Membranproteinen eine wichtige Rolle, da bei dieser Technik eine Strukturbestimmung schon mit zweidimensionalen Kristallen möglich ist. Die NMR-Spektroskopie benötigt für die Strukturbestimmung speziell isotopenmarkierte Biomakromoleküle. Obgleich in vielen Fällen eine sinnvolle Alternative, ist die NMR-spektroskopische Bestimmung von Proteinstrukturen in vielen Fällen aufwendiger als die Röntgenkristallographie. Außerdem ist der Zeitaufwand für die Strukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie in vielen Fällen größer. Dennoch bietet die NMR-Spektroskopie gegenüber der Röntgenkristallographie auch wesentliche Vorteile. Die Flüssig-NMR-spektroskopischen Messungen finden abgesehen von der notwendigen hohen Konzentration in nahezu physiologischen Lösungen statt. Die Wahrscheinlichkeit eventueller Artefakte (Beeinflussung der nativen Struktur), ausgelöst durch exotische, unphysiologische Pufferbedingungen, ist dadurch geringer als bei der Röntgenkristallographie. Für die Untersuchung großer Biomakromoleküle, die schwierig zu kristallisieren sind und zu groß für die Flüssig-NMR-Spektroskopie, bietet sich die Festkörper-NMR-Spektroskopie als sinnvolle Alternative an. Bei dieser Methode werden häufig mikrokristalline Proben der zu untersuchenden Biomakromoleküle verwendet. Die Strukturbestimmung von RNA- und DNA-Molekülen ist gleichermaßen über Flüssig-NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie möglich. Da die Kristallisierung von RNA und DNA jedoch schwieriger ist als die von löslichen Proteinen, kommt der Flüssig-NMR-Spektroskopie auf diesem Gebiet ein größeres Gewicht zu. Auch bei der Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Biomakromolekülen untereinander bzw. der Untersuchung von Biomakromolekül-Ligand-Wechselwirkungen ist die NMR-Spektroskopie eine wichtige, außerordentlich flexible Methode.

1.2 NMR-Spektroskopie

1.2.1 Resonanzzuordnung

Die Resonanzzuordnung der NMR-aktiven Kerne des zu charakterisierenden Biomakromoleküls ist die Voraussetzung für den Erhalt von Informationen über dessen Struktur, Dynamik, Stabilität und Funktion. Obwohl die Resonanzzuordnung den ersten Schritt bei der NMR-spektroskopischen Charakterisierung eines neuen Systems darstellt, ist sie keinesfalls als trivial anzusehen. Sie kann in vielen Fällen sogar zu unüberwindbaren Problemen führen. Die häufigsten auftretenden Probleme sind dabei die Überlappung von Resonanzen, die zu Mehrdeutigkeiten bei der Zuordnung führt, und der Verlust an Empfindlichkeit aufgrund zu schneller Spin-Spin-Relaxation. Beide Probleme verstärken sich mit zunehmender Größe des zu untersuchenden Biomakromoleküls, was dazu führt, dass die Lösungs-NMR-Spektroskopie einer Größenlimitierung unterworfen ist. Auch wenn es prinzipiell nicht ausgeschlossen ist, an sehr großen Komplexen Flüssig-NMR-Spektren aufnehmen zu können, so nimmt der experimentelle Aufwand mit zunehmender Größe des Systems unverhältnismäßig stark zu. Aktuelle Entwicklungen auf dem Gebiet der Verbesserung der Resonanzzuordnung zielen demnach entweder auf eine Erhöhung der Empfindlichkeit der NMR-Experimente oder eine Erhöhung der Auflösung ab. Eine Reduktion der Resonanzüberlappung kann durch innovative selektive Markierungsschemata erreicht werden. Ein weiterer Ansatz besteht darin, Pulssequenzen zu generieren, die die Dimensionalität der Spektren erhöhen, um den Resonanzüberlapp zu reduzieren. Die dabei auftretenden Probleme sind, dass zum einen der Frequenzraum in der zur Verfügung stehenden Zeit nicht vollständig abgerastert werden kann und zum anderen die Sensitivität durch Erhöhung der Dimensionalität reduziert wird. Für das Abtasten des multidimensionalen Frequenzraumes haben sich in den letzten Jahren viele verschiedene Methoden (z.B. APSY, Nonlinear Sampling) entwickelt, die alle ihre Vor- bzw. Nachteile besitzen. Der Verlust an Empfindlichkeit wird bei diesen Methoden jedoch zum Problem und verhindert die Anwendbarkeit dieser Methoden auf große Systeme.

Bei der Zuordnung ^{13}C -, ^{15}N -markierter RNA-Oligonukleotide ist eines der Probleme die Korrelation der Resonanzen innerhalb der Nucleobasen. Die zu Verfügung stehenden Experimente erreichen oft nur bei kleinen Molekülen ausreichende Empfindlichkeit. Auch die Korrelation der Resonanzen der Nucleobasen mit den Resonanzen der Ribosysteme (HCN, HCNCH, HCNH) ist nur bis zu einer bestimmten Größe der RNAs möglich. Die Experimente für die Zuordnung der Ribosysteme (HCCH-COSY, HCCH-TOCSY, etc.) sind in der Regel sensitiver und auch noch bei größeren RNA-Molekülen durchführbar, jedoch wird hier die geringe Dispersion besonders der C2'-, H2'-, C3'- und H3'-Kerne zum Problem. Diesem Problem versucht man mit selektiver Markierung zu begegnen. Mit T7 Polymerase hergestellte RNA kann zum Beispiel mit nur einer Sorte der vier Nucleotide (A, U, C, G) ^{13}C -, ^{15}N -markiert werden. Das Problem dabei ist, dass man die Information der Konnektivität der Nucleotide untereinander fasst vollständig verliert. Ligation von markierten und unmarkierten RNA-Fragmenten kann dieses Problem umgehen.

1.2.2 Strukturaufklärung

Ist die Resonanzzuordnung eines Biomakromoleküls bekannt, lassen sich Strukturparameter messen, um daraus die Struktur berechnen zu können. Mittels Flüssig-NMR-Spektroskopie lassen sich folgende Strukturparameter bestimmen:

- 1) Chemische Verschiebung (CSI, TALOS)
- 2) NOE bzw. ROE
- 3) Skalare ^3J -Kopplungen
- 4) Residuale dipolare Kopplungen (RDCs)
- 5) Residuale chemische Verschiebungsanisotropie (rCSA)
- 6) Kreuzkorrelierte Relaxationsraten (Γ^c)
- 7) Skalare ^hJ -Kopplungen
- 8) Austausch mit dem Lösungsmittel
- 9) Paramagnetische Relaxationsbeschleunigung (PRE)

1.2.2.1 Chemische Verschiebung (CSI, TALOS)

Die chemischen Verschiebungen der NMR-activen Kerne in Biomakromolekülen sind unter anderem abhängig von der lokalen Konformation der Torsionswinkel in der lokalen Umgebung dieser Kerne. Vor allem in Proteinen haben sich Methoden etabliert (CSI, TALOS) [1-3], mit deren Hilfe über die Analyse der chemischen Verschiebungen der Kerne des Proteinerückgrats dessen Konformation vorhergesagt werden kann. Diese Vorhersage basiert auf einer Datenbank, die über den Vergleich von Proteinerückgratwinkeln aus Kristallstrukturen und chemischen Verschiebungen entstanden ist. TALOS berücksichtigt neben den Torsionswinkeln φ und ψ und der Art der Aminosäure auch die Art der in der Primärsequenz vorhergehenden sowie nachfolgenden Aminosäure für die Winkelvorhersage. Es zeigt sich, dass besonders in Bereichen stabiler Sekundärstrukturelemente wie β -Faltblättern und α -Helices die Vorhersage der Proteinerückgratwinkel außerordentlich zuverlässig ist.

Die Beziehungen zwischen Struktur und chemischen Verschiebungen in RNA sind bisher wesentlich weniger intensiv untersucht worden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass solche Beziehungen prinzipiell existieren und eine Strukturvorhersage für bestimmte Torsionswinkel in RNA auf der Grundlage der Analyse von chemischen Verschiebungen prinzipiell möglich ist [4, 5].

1.2.2.2 NOE bzw. ROE

Der NOE (Nuclear Overhauser Effect) basiert auf einer Dipol-Dipol-Interaktion räumlich benachbarter Kernspins [6, 7]. Die Stärke des NOEs ist proportional zu r^{-6} , wobei r den Abstand der wechselwirkenden Kernspins darstellt. Diese starke Abstandsabhängigkeit hat sich als außerordentlich nützlich bei der Strukturbestimmung von Biomakromolekülen erwiesen. Analysiert wird hierbei immer der NOE zwischen Protonen, da der NOE zwischen anderen Kernspezies aufgrund der geringeren gyromagnetischen Verhältnisse zu schwach ist. Der NOE zwischen Protonen ist bis zu einer Distanz von 5 \AA detektierbar. Gemessen werden NOEs über NOESY-Experimente [8, 9], in denen die Integrale bzw. Intensitäten der

Kreuzsignale der Stärke der NOEs entsprechen. Aufgrund der hohen Protonendichte in Proteinen ist die Analyse der NOEs für die Strukturbestimmung von Proteinen außerordentlich wichtig [10].

Bei kleineren Molekülen kann sich die Messung des ROEs [11], ein dem NOE artverwandter Effekt, als nützlich erweisen, da für Moleküle bestimmter Größe der NOE-Effekt sehr schwach ist oder sogar gänzlich verschwindet. Für große Makromoleküle indes spielt der ROE praktisch keine Rolle, da der NOE für diese Moleküle groß genug ist, und die Messung des NOEs (NOESY) für große Moleküle auch wesentlich empfindlicher ist als die Messung des ROEs (ROESY) [12, 13].

Für die Strukturbestimmung von RNA-Molekülen sind NOEs ebenfalls von zentraler Bedeutung. So basiert zum Beispiel die sequentielle Zuordnung der Iminprotonen auf den NOEs dieser Protonen untereinander [14-16]. Auch die Kreuzsignale zwischen den H6/H8-Protonen der Nukleobasen und den H1'-Protonen der Ribosereste liefern für die sequentielle Zuordnung und für die Konformation des glykosidischen Torsionswinkels entscheidende Informationen. Ein großer NOE zwischen H6/H8- und H1'-Protonen tritt zum Beispiel immer dann auf, wenn sich die Nukleobase in syn-Konformation befindet. NOEs zwischen den restlichen Protonen der Ribosereste untereinander (H1', H2', H3', H4', H5', H5'') helfen bei der Bestimmung der Zuckerkonformationen und NOEs zwischen den Zuckerprotonen des i-ten Nukleotids und den Protonen der Nukleobase des (i+1)-ten Nukleotids sind für die Definition der 3D-Struktur außerordentlich wichtig.

1.2.2.3 Skalare ^3J -Kopplungen

Die Bestimmung der Größe von ^3J -Kopplungen ist eine wichtige Methode für den Erhalt von Torsionswinkelinformation in Biomakromolekülen [10, 17, 18]. Die Abhängigkeit der skalaren ^3J -Kopplung von dem entsprechenden Torsionswinkel kann über eine sogenannte Karplus-Kurve beschrieben werden. Ist für die jeweilige ^3J -Kopplung eine Karplus-Parametrisierung vorhanden, lassen sich aus der Kopplungsgröße Torsionswinkelinformationen ableiten. Zur eindeutigen Bestimmung eines Torsionswinkels sind jedoch oft mehrere verschiedene ^3J -

Kopplungen notwendig, die alle vom gleichen Torsionswinkel abhängig sind, da die Karplus-Kurve für bestimmte Werte der 3J -Kopplung bis zu vierfach entartet sein kann. Durch die Etablierung der Methoden zur Isotopenmarkierung von Proteinen, DNA sowie RNA hat sich das Spektrum an zugänglichen 3J -Kopplungen beträchtlich erweitert, da zu den homonuklearen $^3J_{HH}$ -Kopplungen auch noch eine Vielzahl von messbaren heteronuklearen 3J -Kopplungen hinzukommen. Aus NMR-spektroskopischer Sicht existieren verschiedene Methoden zur Bestimmung von 3J -Kopplungen. Dazu gehören das E.COSY-Prinzip, quantitative Methoden, das FIDS-Prinzip (*fitting of doublets from singlets*), das DQ/ZQ-Prinzip sowie J-modulierte CT-HSQC [17, 18]. Kritisch für die Analyse von 3J -Kopplungen ist die zugrundeliegende Karplus-Parametrisierung. Diese kann aus *ab initio* Berechnungen, durch die Analyse von konformationell eingeschränkten kleinen Vergleichsmolekülen oder durch den Vergleich mit entsprechenden Kristallstrukturen erhalten werden. Für Proteine existieren eine Vielzahl auf der Messung von J-Kopplungen basierende Methoden zur Analyse der Torsionswinkel des Proteinerückgrats φ und ψ sowie für die Torsionswinkel der Aminosäureseitenketten χ_1 und χ_2 [17]. In RNA-Molekülen [14, 15, 18] kann über Messung der $^3J_{H1'C6}$ -, $^3J_{H1'C2}$ - (Pyrimidine), $^3J_{H1'C8}$ -, $^3J_{H1'C4}$ - (Purine) Kopplungen Information über die Konformation des χ -Winkels erhalten werden. Bestimmung der homonuklearen $^3J_{H1'H2}$ - und $^3J_{H3'H4}$ -Kopplungen liefert Informationen über die Konformation der Ribosereste. Die $^3J_{P3'C2}$ -, $^3J_{P3'C4}$ - und $^3J_{P3'H3}$ -Kopplungen beinhalten Informationen über die ϵ -Winkel des Phosphodiesterückgrats und die $^3J_{P5'C4}$ - und $^3J_{P5'H5(H5')}$ -Kopplungen über die β -Winkel des Phosphodiesterückgrats. Der Torsionswinkel γ kann über Messung der $^3J_{H4'H5'H5'}$ - und $^3J_{C3'H5'H5'}$ -Kopplungen bestimmt werden. Die α - und ζ -Winkel sind über die Analyse von 3J -Kopplungen nicht zugänglich.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle Torsionsfreiheitsgrade in RNA-Molekülen mit Ausnahme der Winkel α - und ζ des Phosphodiesterückgrats über die Analyse von 3J -Kopplungen zugänglich sind. Aus diesem Grund ist die Analyse dieser Kopplungen für die Strukturbestimmung von RNA-Molekülen außerordentlich wichtig.

1.2.2.4 Residuale dipolare Kopplungen (RDCs)

Dipolare Kopplungen werden in isotroper Lösung komplett ausgemittelt, da alle Orientierungen relativ zum B_0 -Magnetfeld, die das Molekül annehmen kann, gleich wahrscheinlich sind. Um Informationen über dipolare Kopplungen in Lösung zu erhalten, muss das zu untersuchende Molekül zumindest teilweise ausgerichtet werden. Gelingt es die zu untersuchende Probe so zu präparieren, dass das Molekül eine Vorzugsorientierung einnimmt, wird die dipolare Kopplung teilweise wieder eingeführt. Diese residualen dipolaren Kopplungen (RDCs) sind dabei umso stärker, je größer das Ausmaß der Ausrichtung des Moleküls ist. RDCs liefern wertvolle Strukturinformationen, da ihre Größe von der Orientierung des betreffenden Dipol-Dipol-Vektors relativ zum Magnetfeld abhängig ist [19]. Der extreme Vorteil, den RDC-Strukturinformationen bieten, liegt darin, dass dadurch relative Orientierungen von Bindungsvektoren zum Magnetfeld und damit indirekt auch untereinander abgeleitet werden können, gleichgültig wie weit die jeweiligen Bindungsvektoren voneinander entfernt sind. Alle anderen Arten von NMR-Strukturparametern mit Ausnahme von rCSAs liefern ausschließlich lokale Strukturinformation. Die Genauigkeit der globalen 3D-Struktur eines Biomakromoleküls kann deshalb durch Verwendung von RDC-Strukturinformation in vielen Fällen deutlich erhöht werden. Ist die Interaktionsfläche zweier Proteindomänen zueinander sehr klein, ist die relative Orientierung dieser Proteindomänen zueinander oft nur mit Hilfe von RDCs möglich.

Es existieren verschiedene Methoden, ein Biomakromolekül im Magnetfeld auszurichten. Jede dieser Methoden hat ihre Vor- und Nachteile und nicht jede dieser Methoden ist auf jedes System anwendbar. Zu den am häufigsten verwendeten Methoden gehören mechanisch deformierte Polyacrylamidgele, filamentöse Bakteriophagen, Bizellen und paramagnetische *Tags*. Nukleinsäuren haben oft die Eigenschaft sich in sehr starken Magnetfeldern aufgrund ihrer anisotropen magnetischen Suszeptibilität von selbst auszurichten. Diese durch das Feld induzierte Vorzugsorientierung des DNA- oder RNA-Moleküls reicht in diesen Fällen aus, um RDCs messen zu können. Allerdings müssen mindestens zwei Messungen bei sehr hohem und relativ geringem Magnetfeld erfolgen, um die Magnetfeld-induzierten

RDCs bestimmen zu können. Der Vorteil der Magnetfeld-induzierten RDCs liegt vor allem darin, dass die Probe des Makromoleküls nicht mit zusätzlichen Chemikalien versetzt werden muss, die die Struktur des zu untersuchenden Biomakromoleküls potentiell beeinflussen können.

Meistens werden RDCs für Kerne, die lediglich eine chemische Bindung voneinander entfernt sind, wie zum Beispiel für N-H oder C-H Bindungsvektoren, gemessen. Bestimmt werden sie indirekt über Messung der Variation der entsprechenden $^1J_{CH-}$ bzw. $^1J_{NH-}$ Kopplungen im isotropen bzw. ausgerichteten Biomakromolekül (z.B. IPAP-HSQC).

1.2.2.5 Residuale chemische Verschiebungsanisotropie (rCSA)

Wird ein Biomakromolekül im Magnetfeld ausgerichtet verändern sich die chemischen Verschiebungen der Kerne, da nicht mehr alle Orientierungen mit gleicher Wahrscheinlichkeit populiert werden. Je nach Ausmaß der Orientierung fällt diese Abweichung von der isotropen chemischen Verschiebung unterschiedlich stark aus. Ist die Struktur des Biomakromoleküls gegeben lassen sich Informationen über Größe und Orientierung der CSA-Tensoren extrahieren [20-23]. Ist hingegen die Orientierung des CSA-Tensors (*Alignment*-Tensor) im Molekülkoordinatensystem bekannt und ist die Vorzugsorientierung des Makromoleküls im Magnetfeld ebenfalls bekannt, lassen sich aus den rCSAs Informationen über die Orientierung des CSA-Tensors bezüglich des *Alignment*-Tensors ableiten. Da der CSA-Tensor in der Regel feste Winkel bezüglich bestimmter Bindungsvektoren innerhalb des Moleküls einnimmt, lassen sich schließlich Aussagen über die Orientierung bestimmter Bindungsvektoren ableiten. Die Methoden mit denen das Biomakromolekül im Magnetfeld ausgerichtet werden kann sind identisch mit den Methoden, die bei der Messung von RDCs Anwendung finden.

1.2.2.6 Kreuzkorrelierte Relaxationsraten (Γ^c)

Fluktuationen des lokalen magnetischen Feldes sind die Ursache für R_1 - und R_2 -Relaxation in Lösung. Ursache dieser durch Rotation des Biomakromoleküls

ausgelösten Fluktuationen des magnetischen Feldes sind in den meisten Fällen dipolare Interaktionen zu benachbarten Kernspins bzw. die chemische Verschiebungsanisotropie des transversalen Spins. Sind z.B. zwei Dipol-Dipol Vektoren starr im Molekülkoordinatensystem verankert, fluktuiert das Magnetfeld der beiden unterschiedlichen transversalen Spins mit der gleichen Frequenz, ausgelöst durch die Rotation des Biomakromoleküls. Die Magnetfeld-Fluktuationen sind demnach korreliert, wobei je nach Orientierung der Vektoren zueinander die Korrelation positiv oder negativ sein kann. Diese Korrelation führt zu einer Umwandlung der Magnetisierung, die NMR-spektroskopisch über die Messung von kreuzkorrelierten Relaxationsraten detektiert werden kann. Die Größe der kreuzkorrelierten Relaxationsrate ist dabei abhängig vom Projektionswinkel der beiden Vektoren zueinander. Dieser Projektionswinkel kann in vielen Fällen unter Berücksichtigung der Molekülgeometrie in eine Abhängigkeit der Relaxationsrate von einem Torsionswinkel umgerechnet werden. Prinzipiell lassen sich kreuzkorrelierte Relaxationsraten zwischen zwei CSAs, zwei Dipol-Dipol-Vektoren bzw. einer CSA und einem Dipol-Dipol-Vektor unterscheiden. Die Interpretation der CSA-abhängigen kreuzkorrelierten Relaxationsraten erfordert dabei eine genaue Kenntnis von Größe und Orientierung der involvierten CSA-Tensoren, die nicht selten konformationsabhängig sind [18, 24, 25].

Es existieren mittlerweile eine Vielzahl von NMR-Experimenten zur Analyse von kreuzkorrelierten Relaxationsraten in Proteinen und Nukleinsäuren [25]. In Proteinen können auf diese Art Informationen über die Torsionswinkel des Proteinrückgrats ϕ und ψ erhalten werden. Für RNA-Moleküle existieren Methoden zur Bestimmung der Ribosekonformation, des χ -Winkels sowie der Torsionswinkel des Phosphodiesterückgrats. Besonders für die Bestimmung der Winkel α und ζ hat die Analyse kreuzkorrelierte Relaxationsraten eine wichtige Bedeutung, da diese Winkel über die Analyse skalarer ^3J -Kopplungen nicht zugänglich sind [26, 27].

1.2.2.7 Skalare ^hJ -Kopplungen

Der direkte Nachweis von Wasserstoffbrücken über ein NMR-Experiment liefert auch wertvolle Strukturinformation. Der Magnetisierungstransfer erfolgt dabei

über die Entwicklung von skalaren Kopplungen über die Wasserstoffbrücke hinweg. In vielen Fällen sind diese Kopplungen relativ klein und die entsprechenden NMR-Experimente deshalb entsprechend lang und unsensitiv. So ist der Nachweis von HN-CO Wasserstoffbrücken zwar möglich, aber aufgrund der kleinen ${}^2\text{J}_{\text{HC}}$ -[28] bzw. ${}^3\text{J}_{\text{NC}}$ -[29] Kopplungen (<1Hz) nur an Systemen mit geringer transversaler Relaxation (z.B. perdeuterierte Proteine) erfolgreich durchführbar. Für RNA und DNA hat jedoch das HNN-COSY-Experiment [30-32] herausragende Bedeutung, da die ${}^2\text{J}_{\text{NN}}$ -Kopplung für Iminogruppen zwischen 5-7 Hz groß ist und das Experiment deshalb ausreichende Empfindlichkeit aufweist, um Wasserstoffbrückenbindungen von Iminogruppen nachweisen zu können. Das Experiment liefert nicht nur Informationen darüber, ob eine Wasserstoffbrücke vorhanden ist, sondern auch über die Art des gebildeten Basenpaars. Obwohl die ${}^2\text{J}_{\text{NN}}$ -Kopplung für Aminogruppen deutlich kleiner ist (2-3 Hz) [33], können auch für Aminogruppen Wasserstoffbrücken des HN-N Typs über leicht modifizierte Versionen des HNN-COSYs detektiert werden. Die Aufklärung der Sekundärstruktur eines RNA- oder DNA-Moleküls wird also durch das HNN-COSY-Experiment wesentlich erleichtert.

1.2.2.8 Austausch mit dem Lösungsmittel

Einige funktionelle Gruppen in Biomakromolekülen besitzen die Eigenschaft, ihre Protonen mit den Protonen des Lösungsmittels auszutauschen. Aus der Geschwindigkeit, mit der dieser Austausch erfolgt, lassen sich Rückschlüsse auf die Struktur des betrachteten Biomakromoleküls ziehen. In Proteinen ist der Austausch der Amidprotonen des Proteinerückgrats abhängig davon, ob die Amidgruppe eine Wasserstoffbrücke innerhalb des Proteins bildet oder nicht. Dies ist in der Regel der Fall, wenn sich die Amidgruppe in einem stabilen Sekundärstrukturelement (α -Helix, β -Faltblatt) befindet. Befindet sich die Amidgruppe zusätzlich noch im hydrophoben Inneren des Proteins, ist der Austausch zusätzlich verlangsamt [34]. Die Austauschraten der Amidprotonen liefern demnach Informationen über das Vorhandensein von Sekundärstrukturelementen sowie die Nähe der jeweiligen Amidgruppen zur Proteinoberfläche. In DNA und RNA ist der Austausch der Iminoprotonen stark verlangsamt, wenn sich die Iminoprotonen in einer Wasserstoffbrücke zu einer anderen Nukleobase befinden. Dies ist üblicherweise

immer dann der Fall, wenn die betroffenen Nukleobasen Basenpaarungen mit anderen Nukleobasen eingehen. Die Tatsache, dass ein Iminoproton ein zu beobachtendes NMR-Signal aufweist, beinhaltet demnach Sekundär- bzw. Tertiärstrukturinformation über das jeweilige DNA- bzw. RNA-Molekül [14-16].

1.2.2.9 Paramagnetische Relaxationsbeschleunigung (PRE)

Ungepaarte Elektronen haben die Eigenschaft, die Relaxation der Kernspins in ihrer Umgebung zu beschleunigen. Treten also durch Zugabe einer Paramagnetischen Substanz Linienverbreiterungen in den NMR-Spektren eines Biomakromoleküls auf, so lassen sich diese Linienverbreiterungen in Abstandsinformationen umrechnen. Einige Proteine haben natürliche Bindestellen für paramagnetische Ionen. Fehlt eine solche natürliche Bindestelle, muss das *Spinlabel* künstlich eingeführt werden. Für die Strukturbestimmung von Proteinen ist diese Methode speziell für Membranproteine durchaus verbreitet. Meistens werden dabei Mutationen des Proteins hergestellt, die nur ein einziges Cystein beinhalten, an das über eine Disulfidbrücke ein Nitroxid-*Spinlabel* angefügt werden kann. Die gemessenen Linienbreitenveränderungen der NMR-Signale des Proteins zeigen eine r^{-6} -Abstandsabhängigkeit [35]. Mit dieser Methode können Abstände zwischen 10-25Å gemessen werden. Die PRE-Abstandsinformationen haben also eine längere Reichweite als z.B. NOEs und sind für die Bestimmung der globalen Faltung des Proteins wichtig.

Für RNA-Moleküle ist vor allem die Lokalisierung von Mg^{2+} -Bindestellen mittels paramagnetischer Mn^{2+} -Ionen hervorzuheben. Bindet das paramagnetische Mn^{2+} -Ion an die RNA, führt dies zu Linienverbreiterungen der benachbarten Kernspins, was eine Lokalisation der Bindestelle ermöglicht (siehe Abschnitte 2.2.8.2 und 2.3.9.2 dieser Arbeit).

1.2.3 Funktion, Dynamik und Stabilität

Die NMR-Spektroskopie eignet sich in besonderer Weise für die Analyse der Dynamik von Biomakromolekülen. Je nach Zeitskala der Dynamik, finden verschiedene NMR-spektroskopische Methoden Anwendung, mit denen sich die

Dynamiken ortsauflöst beschreiben lassen. Auf diese Weise ist die gesamte Dynamik-Zeitskala von Pikosekunden bis Tagen NMR-spektroskopisch zugänglich [36]. Eine Übersicht über die unterschiedlichen dynamischen Prozesse, die in Biomakromolekülen stattfinden können, sowie der entsprechenden NMR-spektroskopischen Methoden, um diese Dynamiken zu untersuchen, ist in Abbildung 1.1 wiedergegeben.

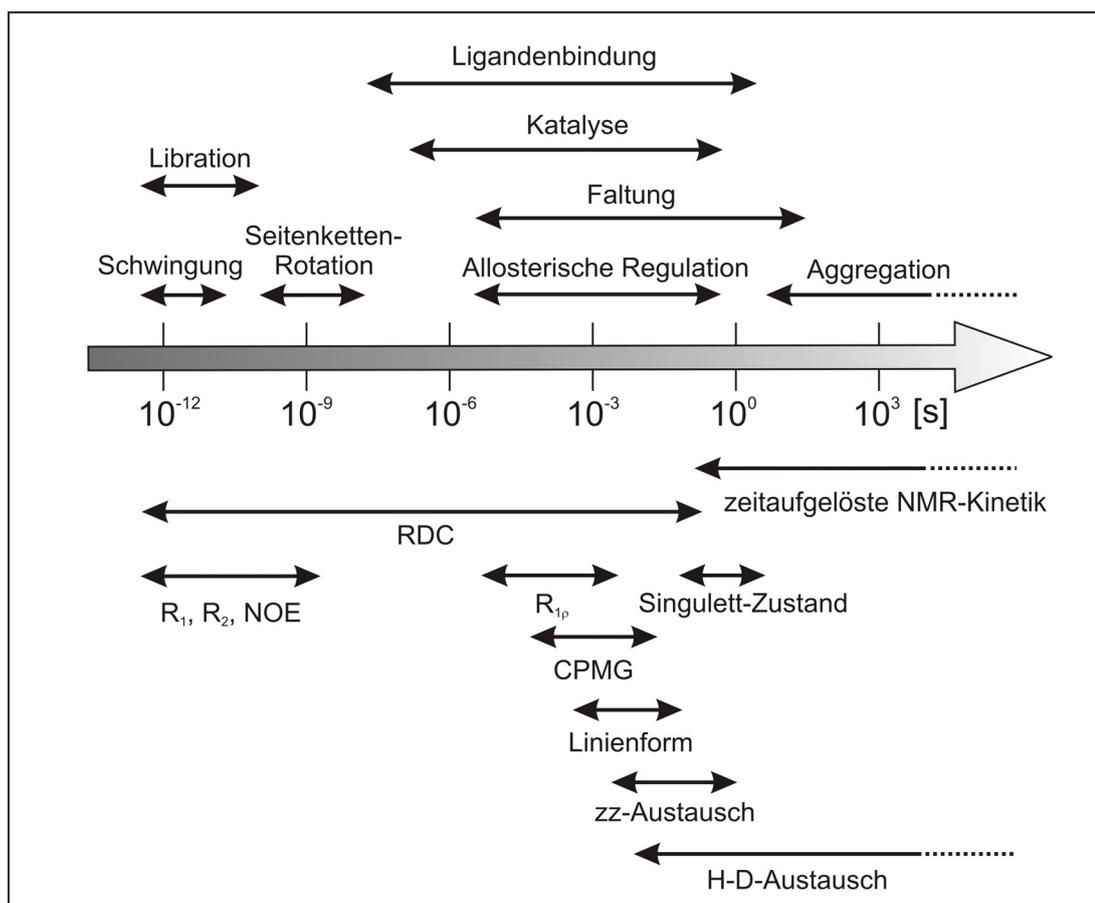


Abbildung 1.1 Zeitskalen der unterschiedlichen Dynamiken in Biomakromolekülen sowie der entsprechenden NMR-spektroskopischen Methoden, um diese Dynamiken zu untersuchen.

1.2.3.1 Schnelle Dynamik

Bewegungen, die schneller als die globale Rotationskorrelationszeit des untersuchten Biomakromoleküls sind, lassen sich über die Analyse von R_1 - und R_2 -Relaxationsraten bzw. NOEs genauer beschreiben. In den meisten Fällen werden

dabei die schnellen Bewegungen von Bindungsvektoren, wie z.B. den N-H Bindungsvektoren im Proteinerückgrat oder den C6(8)-H6(8) Bindungsvektoren in RNA-Nukleobasen analysiert. Diese internen, von der globalen Rotation unabhängigen Bewegungen werden üblicherweise über den Modelfree-Formalismus interpretiert [37-39]. Dabei wird ein Ordnungsparameter S_{LS}^2 eingeführt, der das Ausmaß der schnellen Bewegung beschreibt. Der Ordnungsparameter macht keinerlei Aussagen über das Potential, in dem die Bewegung des Bindungsvektors stattfindet. Über die Annahme eines solchen Potentials (Modells) kann der Ordnungsparameter in einen Winkel umgerechnet werden, um den der Bindungsvektor aus der Mittellage ausgelenkt werden kann.

Für die Analyse der schnellen Bewegungen werden üblicherweise R_1 - und R_2 -Relaxationsraten sowie hetNOEs bei gleichem magnetischen Feld gemessen. Werden die Messungen bei mehreren magnetischen Feldern durchgeführt, können entsprechend detailliertere Informationen über die Art der schnellen Bewegung extrahiert werden. Ist die Rotationsdiffusion eines Biomakromoleküls anisotrop, muss die Modelfree-Analyse anisotrop durchgeführt werden. Hierzu ist die Kenntnis der Struktur des Biomakromoleküls eine Voraussetzung. Ein weiteres Problem bei der Interpretation der Daten stellen konformationsabhängige Schwankungen des CSA-Tensors dar. Trotz dieser eventuellen Komplikationen konnten für viele Biomakromoleküle S_{LS}^2 -Parameter bestimmt werden und so flexible Bereiche des Biomakromoleküls identifiziert werden. Letztlich ist über die Analyse der R_1 -, R_2 - und hetNOE-Daten auch eine Aussage darüber zu treffen, ob die beobachteten Resonanzen schnellem Austausch (ns-ms) unterworfen sind oder nicht.

1.2.3.2 Schneller Austausch

Bei schnellem Austausch handelt es sich um Dynamiken im Bereich zwischen Nanosekunden und Millisekunden. Dabei wird der Austausch als schnell definiert, wenn trotz verschiedener Konformationen mit unterschiedlicher chemischer Verschiebung die chemische Verschiebung zu einem Signal gemittelt wird. Die Grenze zwischen schneller Dynamik und schnellem Austausch ist die globale Rotationskorrelationszeit des Makromoleküls. Ist die konformationelle Mittelung

langsamer als die globale Rotationskorrelationszeit, werden R_1 , R_2 und hetNOE durch die Dynamik nicht beeinflusst.

Schnelle Fluktuationen der chemischen Verschiebung lassen sich über verschiedene Methoden wie CPMG-, $R_{1\rho}$ - oder ΔR_{MQ} -Messungen untersuchen. Bei CPMG-Messungen [40, 41] wird die R_2 -Relaxation während einer Spinecho-Sequenz gemessen. Tritt dabei eine Abhängigkeit der R_2 -Relaxationsrate von der Länge der Spinechos auf, liegt chemischer Austausch vor. Diese Abhängigkeiten können über verschiedene Modelle der chemischen Verschiebung analysiert werden [36, 42-44]. Sehr oft wird dabei ein Zweizustandsmodell angenommen. Über die Abhängigkeiten der R_2 -Raten von der Stärke des CPMG-Feldes lassen sich die Austauschrate, die Differenz der chemischen Verschiebung beider Zustände und die Populationen der beiden Zustände extrahieren. Die CPMG-Methode ist geeignet, um chemischen Austausch in einem Bereich zwischen 10^2 - 10^4 Hz zu bestimmen.

Bei $R_{1\rho}$ -Messungen wird die Relaxation unter Anwendung eines *Spinlock*-RF-Feldes untersucht [45]. Durch Variation von Stärke und *offset* des *Spinlock*-RF-Feldes können Rückschlüsse auf chemische Austauschprozesse gezogen werden [36, 44, 46]. Aus den Abhängigkeiten der $R_{1\rho}$ -Relaxation von der Variation des *Spinlock*-RF-Feldes können ähnlich wie bei den CPMG-Messungen Rückschlüsse über Austauschrate, Zustandspopulationen und chemische Verschiebungsdifferenzen der populierten Zustände gezogen werden. Die $R_{1\rho}$ -Methode ist geeignet, um chemischen Austausch in einem Bereich zwischen 10^3 - 10^5 Hz zu bestimmen. Unter bestimmten Bedingungen ist über Variation des *Spinlock*-RF-Feldes auch eine Vorzeichenunterscheidung der beiden Zustände möglich [47].

Chemischer Austausch bewirkt auch Unterschiede der R_2 -Relaxation von Doppelquanten und Nullquanten. Der große Vorteil dieser Relaxationsmessungen besteht darin, dass sie im Vergleich zu reinen Einzelquantenmessungen auch Informationen über das Vorzeichen der chemischen Verschiebungsdifferenz beinhalten [48-51].

Eine weitere wichtige Methode zur Analyse von schnellem Austausch ist die Analyse von RDCs. Die Größe von RDCs wird über Dynamiken, die schneller sind als das

Inverse des RDCs skaliert. Ist die Struktur eines Makromoleküls bekannt, lassen sich auf diese Weise Ordnungsparameter S_{RDC}^2 aus der Analyse residualer dipolarer Kopplungen ableiten. Vergleicht man diese S_{RDC}^2 -Ordnungsparameter mit den entsprechenden S_{LS}^2 -Ordnungsparametern, so sollte immer $S_{RDC}^2 < S_{LS}^2$ gelten. Aus der Differenz der beiden Ordnungsparameter lässt sich Information über Dynamik im Bereich zwischen 10^1 - 10^8 Hz ableiten [19, 52]. Die $(S_{LS}^2 - S_{RDC}^2)$ -Differenz ist die einzige NMR-spektroskopische Methode zur Detektion von Dynamiken im Bereich zwischen 10^5 - 10^8 Hz [53-55].

1.2.3.3 Mittlerer Austausch

Chemische oder konformationelle Austauschprozesse im Millisekundenbereich verursachen Veränderungen der Linienformen von NMR-Signalen. Eine Analyse der Linienformen der beeinflussten Signale erlaubt deshalb in vielen Fällen Rückschlüsse über das zugrunde liegende kinetische Modell bzw. den zugrunde liegenden Austauschmechanismus [36, 56-58]. Auf diese Weise können unter anderem chemische Reaktionen, von Proteinen katalysierte Reaktionen, Ligandenbindung an Biomakromoleküle aber auch lokale oder globale konformationelle Änderungen innerhalb eines Biomakromoleküls verfolgt werden. Voraussetzung für die Analyse der Linienformen ist, dass sich die verschiedenen Zustände des Austauschprozesses nahe am Gleichgewicht befinden. Nimmt man ein Zweizustandsmodell an, so ist die Änderung der Linienformen unter der Bedingung $k_{ex} / \Delta\nu = \pi / \sqrt{2}$ maximal (Koaleszenz), wobei k_{ex} die Geschwindigkeitskonstante ist und $\Delta\nu$ die Differenz der chemischen Verschiebungen der entsprechenden Signale repräsentiert. Für den Fall $k_{ex} / \Delta\nu \gg \pi / \sqrt{2}$ mitteln sich die chemischen Verschiebungen der beiden Zustände zu einem Signal. Gilt hingegen $k_{ex} / \Delta\nu \ll \pi / \sqrt{2}$, kann jedem Zustand ein korrespondierendes NMR-Signal zugeordnet werden.

1.2.3.4 Langsamer Austausch

Kreuzsignale in NOESY- bzw. ROESY-Spektren können aufgrund räumlicher Nähe unterschiedlicher Kernspins oder aufgrund langsamer Austauschprozesse eines Kernspins auftreten [10]. Für Biomakromoleküle sind diese beiden Fälle im NOESY nicht unterscheidbar. Im ROESY-Experiment jedoch besitzen Austauschsignale ein anderes Vorzeichen als ROE-Signale und können daher eindeutig identifiziert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin zz-Austausch für Kerne mit einem niedrigen gyromagnetischen Verhältnis (z.B. ^{15}N) zu messen [59]. Da der NOE für diese Kerne sehr klein ist, treten Kreuzsignale hier hauptsächlich aufgrund von Austauschprozessen auf. Die natürliche Grenze der zu messenden Austauschraten ist durch die R_1 -Relaxationszeit gegeben. Ist die Austauschrate deutlich kleiner als die R_1 -Rate des entsprechenden Spins, geht die Kohärenz verloren bevor der Austausch stattfinden kann. Über zz-Austausch sind üblicherweise Austauschprozesse im Bereich zwischen 0,01-1 s zu detektieren [60, 61].

Über die Präparation von Singulett-Zuständen lässt sich die T_1 -Relaxationszeit deutlich verlängern (15-50 s), was die Beobachtung von noch langsameren Austauschprozessen ermöglicht [62-64]. Diese relativ neue Methode ist ausgesprochen wichtig, da sie die Lücke zwischen zz-Austauschexperimenten und herkömmlichen Kinetiken überbrückt.

Über die schnell aufeinanderfolgende Aufnahme einzelner NMR-Experimente können kinetische Prozesse beobachtet werden, die langsamer als 100 ms sind. Für schnelle Kinetiken wird jedoch sehr schnell ein ungenügend kleines Signal/Rausch-Verhältnis zum Problem. Schnelle Kinetiken stellen daher hohe Anforderungen an die Qualität der Spektren bzw. erfordern eine hohe Probenkonzentration. Bei langsamen Kinetiken dieser Art wird der zeitliche Verlauf der Intensitäten der Edukt- bzw. Produkt-Signale $I(t)$ verfolgt. Voraussetzung dafür ist die Zuordnung der Edukt- und Produkt-Signale. Produkt- und Edukt-Zustand müssen daher getrennt voneinander unter Gleichgewichtsbedingungen zugänglich sein, um die notwendigen Zuordnungsexperimente durchführen zu können. Im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Methoden finden diese Messungen unter Nicht-

Gleichgewichtsbedingungen statt. Es wird also die Einstellung des Gleichgewichts beobachtet. Auf diese Weise können auch kinetische Prozesse untersucht werden, die fernab vom Gleichgewicht ablaufen. Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass die zu untersuchende Reaktion gezielt gestartet werden kann. Dies kann über das schnelle Mischen zweier Lösungen (*stopped-flow*-Mischung) oder die plötzliche Freisetzung einer Substanz geschehen [65]. Die plötzliche Freisetzung von sogenannten „*caged compounds*“ kann photochemisch über Bestrahlung der Probe mit hohen Lichtintensitäten geschehen [65-67]. Derartige Methoden eignen sich für die kinetische Untersuchung von Protein- bzw. RNA-Faltung oder Protein-Ligand- sowie RNA-Ligand-Wechselwirkungen.

Über kinetische Analyse des Austauschs von Amino- bzw. Iminoprotonen mit dem Lösungsmittel lassen sich die Lösungsmittelzugänglichkeiten in Biomakromolekülen untersuchen. Sind diese Austauschprozesse schnell ($<1\text{s}$), können sie über Gleichgewichtsmessungen analysiert werden [68, 69]. Ist der Austausch mit dem Lösungsmittel langsam, muss die Kinetik unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen beobachtet werden. Dies geschieht üblicherweise durch Mischung der Protein- oder Nukleinsäurelösung mit einem D_2O -Puffer. Nach dem Mischen wird das Verschwinden der Protonensignale im $[^1\text{H}-^{15}\text{N}]$ -HSQC beobachtet. Befinden sich Amidgruppen von Proteinen in Wasserstoffbrücken stabiler Sekundärstrukturelemente kann der Austausch mit dem Lösungsmittel extrem verlangsamt sein. Einige Protonen im hydrophoben Inneren von Proteinen können bis zu mehreren Monaten für den Austausch benötigen. Befinden sich die Amidgruppen jedoch an der Oberfläche des Proteins und sind zudem nicht durch eine Wasserstoffbrücke innerhalb des Proteins geschützt, findet der Austausch abhängig von pH und Temperatur im oberen Millisekundenbereich statt (ca. 100 ms) [70]. Über die Analyse des H/D-Austauschs in Proteinen lassen sich demnach orts aufgelöste Informationen über Stabilitäten von Wasserstoffbrücken in Sekundärstrukturelementen (α -Helix, β -Faltblatt) bzw. Lösungsmittelzugänglichkeiten von Amidprotonen untersuchen [71-73]. Der Austausch der Iminoprotonen von Nukleobasen ist abhängig davon, ob eine Basenpaarung und damit eine Wasserstoffbrücke zu einer anderen Nukleobase vorliegen oder nicht. Sind die Iminoprotonen der Nukleobasen nicht durch Wasserstoffbrücken geschützt,

ist der Austausch mit dem Lösungsmittel so schnell, dass keine NMR-Signale zu beobachten sind. Befindet sich die Iminogruppe jedoch in einer Wasserstoffbrücke, ist der Austausch stark verlangsamt und die Iminosignale sind zu beobachten. Der Austausch der Iminogruppen ist abhängig von Temperatur, Pufferzusammensetzung und Stabilität der Basenpaare und befindet sich oft in einem zeitlichen Bereich von 0.01 ms-1 s. Über die Analyse des H/D-Austauschs in Nukleinsäuren lassen sich folglich orts aufgelöste Informationen über Stabilitäten von Basenpaarungen in A-Form- oder B-Form-Helices (RNA/DNA) extrahieren [73, 74].

2 FourU RNA-Thermometer: Beschreibung der temperaturabhängigen Basenpaarstabilitäten sowie des Schmelzvorgangs des *Salmonella* FourU RNA-Thermometers

2.1 Einleitung

In den letzten Jahren konnten viele experimentelle Daten gesammelt werden, die zeigen, dass RNA die Genexpression in eukaryotischen [75-77] und in prokaryotischen Organismen [78-80] reguliert. Solche regulatorischen RNAs besitzen die Fähigkeit, Umgebungsparameter zu messen und darauf mit einer definierten Strukturänderung zu reagieren. Diese Strukturänderungen führen dann zu Änderungen der Genexpression. Auf diese Weise ist es den Organismen möglich, ihr Genexpressionsmuster an die geänderten Umgebungsbedingungen anzupassen. RNA-Sensoren sind unabhängige regulatorische Elemente, die im Allgemeinen keine akzessorischen Proteine benötigen, um ihre Funktion zu erfüllen. *Riboswitche* kontrollieren die Expression einer beträchtlichen Anzahl bakterieller Gene über Bindung und Konzentrationsmessung einer Vielzahl verschiedener Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht [81-85]. Die regulierten Gene kodieren dabei für Proteine, die die Ligandenkonzentration selbst beeinflussen. Oft handelt es sich hier um Transportproteine oder Proteine, die an den kata- bzw. anabolen Stoffwechselwegen des Ligands beteiligt sind. Der Regulationsmechanismus kann dabei auf Ebene der Transkription (Transkriptionstermination) oder der Translation (Blockierung der SD-Sequenz) stattfinden und kinetisch oder thermodynamisch kontrolliert sein.

RNA-Thermometer sind in den 5'-untranslatierten Regionen (5'-UTR) bestimmter mRNAs lokalisiert. Sie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, die Temperatur zu messen und die Expression des nachgeschalteten Gens temperaturabhängig zu regulieren. Bei tiefen Temperaturen blockieren sie die Shine-Dalgarno-(SD)-Sequenz über Basenpaarung und verhindern dadurch die Translationsinitiation. Bei höheren

Temperaturen führt die Entfaltung der Sekundärstruktur im Bereich der SD-Sequenz zur Freisetzung der Ribosomenbindungsstelle, so dass die Translationsinitiation stattfinden kann (siehe Abbildung 2.1) [86, 87]. Alle bisher bekannten RNA-Thermometer beeinflussen die Genexpression über die Regulation der Translationsinitiation. RNA-Elemente, die die Genexpression über Regulation der Transkription temperaturabhängig beeinflussen sind nicht bekannt.

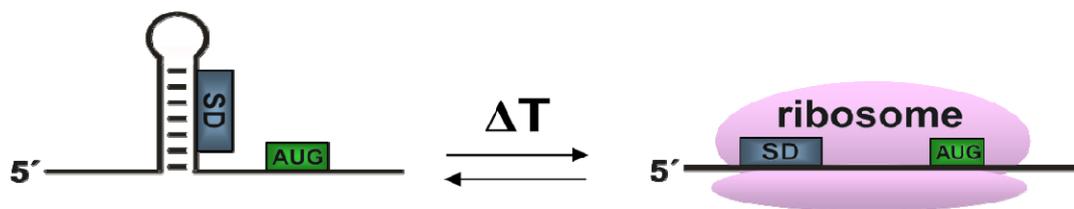


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der Funktionsweise von RNA-Thermometern. Bei tiefen Temperaturen ist dem Ribosom der Zugang zur SD-Sequenz aufgrund von Basenpaarungen versperrt. Bei hohen Temperaturen liegt die SD-Sequenz einzelsträngig vor, so dass die Translationsinitiation erfolgen kann.

RNA-Thermometer der ROSE (*repression of heat shock gene expression*) Familie sind aus mehreren aufeinanderfolgenden Haarnadelschleifen aufgebaut und kontrollieren die Expression kleiner Hitzeschockproteine in α - und γ -Proteobakterien [87-89]. Die relevante Helix, die die SD-Sequenz blockiert, ist aufgrund von ungewöhnlichen nicht-kanonischen Basenpaarinteraktionen temperatursensitiv [90].

Ein Vertreter der FourU RNA-Thermometer-Familie, einer weiteren Klasse von RNA-Thermometern, induziert die Expression des kleinen Hitzeschockproteins AgsA in *Salmonella* bei höheren Temperaturen [91]. Es besteht aus vier benachbarten Uridin-Nukleotiden, die bei niedrigen Temperaturen mit der SD-Sequenz (5' AGGAG-3') Basenpaarungen eingehen können.

Neben natürlich vorkommenden RNA-Thermometern konnte gezeigt werden, dass künstlich eingeführte RNA-Thermometer ebenfalls in der Lage sind, die Expression der nachgeschalteten Gene temperaturabhängig zu regulieren [92, 93]. Diese reduktionistisch gestalteten RNA-Elemente bestehen schlicht aus einer

temperatursensitiven RNA-Helix, die in der Lage ist, die SD-Sequenz bei niedrigen Temperaturen zu blockieren. Diese synthetischen RNA-Thermometer lieferten den Beweis, dass es ausreichend ist, die SD-Sequenz über Basenpaarung zu blockieren, um die Expression des nachgeschalteten Gens temperaturabhängig zu beeinflussen.

Die bisher durchgeführten Untersuchungen an RNA-Thermometern haben einige Fragen offen gelassen: Welche regulatorischen Anforderungen werden an ein RNA-Thermometer gestellt, um die Genexpression an die Bedürfnisse der prokaryotischen Zelle anzupassen? Welche Parameter sind essentiell bei der Anpassung der temperaturabhängigen Expressionskennlinie. Ein RNA-Thermometer kann spezifiziert werden über den Temperaturbereich, in dem die Geninduktion stattfindet, und die Stärke der Induktion des entsprechenden Genprodukts. Es sind zum Beispiel RNA-Thermometer denkbar, die die Genexpression schon bei kleinen Temperaturänderungen sehr stark beeinflussen. Solche RNA-Thermometer würden wie ein binärer an/aus-Schalter der Genexpression funktionieren. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass RNA-Thermometer die Genexpressionslevel ähnlich wie bei einem Dimmer nur geringfügig und über einen weiten Temperaturbereich hinweg beeinflussen. Diese Eigenschaften werden durch die temperaturabhängige Stabilität der RNA-Helix und die Kooperativität der Entfaltung beeinflusst.

In dieser Arbeit wurde mittels NMR-Spektroskopie die temperaturabhängige Stabilität des *Salmonella* FourU RNA-Thermometers und die Kooperativität seiner Entfaltung über die Analyse von Iminoprotonenaustauschraten mit Wasser charakterisiert. Diese Austauschraten beinhalten Information über die Stabilität von Basenpaarungen, da Iminoprotonen, die sich in einer Wasserstoffbrücke befinden, vor dem Austausch mit Wasser geschützt sind [73, 74].

In der Vergangenheit wurden einige Studien durchgeführt, in denen die Lebenszeiten von Basenpaaren über die Analyse der Katalysatorabhängigkeit des Iminoprotonenaustauschs der Nukleobasen in RNA [94-99], tRNA [100], DNA [95, 101-105] und DNA/RNA Hybriden [106-108] bestimmt wurden. Die Temperaturabhängigkeit von Austauschraten in RNA wurde jedoch bis heute noch nicht untersucht.

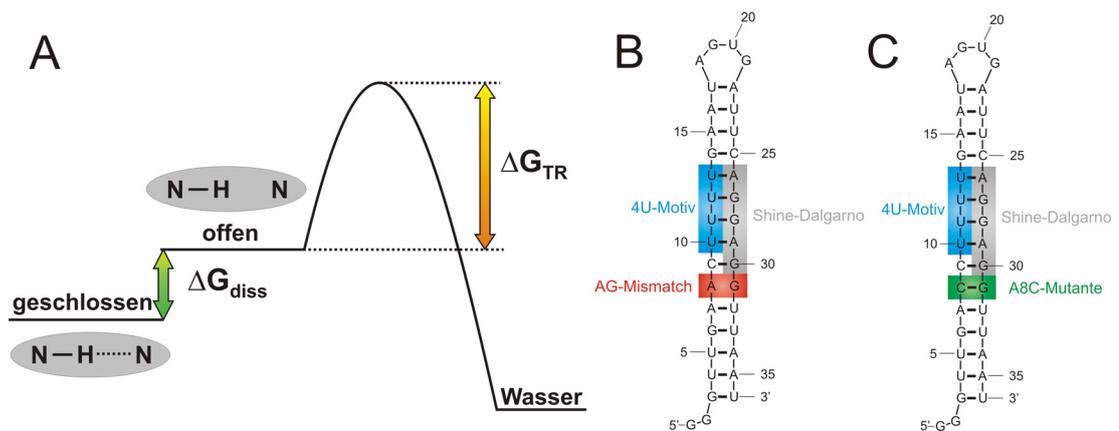


Abbildung 2.2 (A) Energiediagramm zur Beschreibung des Iminoprotonenaustauschprozesses ausgehend von der Nucleobase im geschlossenen (basengepaarten) Zustand über den offenen Zustand (nicht basengepaart) zum Wasser (B) Sekundärstruktur der 4U-hp2-wt RNA (C) Sekundärstruktur der 4U-hp2-A8C-Mutanten RNA. Die A8C-Mutante entspricht der A29C-Mutante der Volle-Länge-RNA [91].

In dieser Arbeit wurde die Temperaturabhängigkeit der Iminoprotonenaustauschraten einzelner Nucleobasen in der temperatursensitiven zweiten Helix des FourU RNA-Thermometers analysiert. Es wurden die Iminoprotonenaustauschraten unter EX2-Bedingungen gemessen. Auf diese Art und Weise war es möglich, zeitaufwendige Katalysatortitrationen zu umgehen (Diskussion in Material und Methoden, Analyse der Iminoprotonenaustauschraten, Abschnitt 2.2.6). Durch Anwenden dieser Methodik auf das FourU RNA-Thermometer konnten Informationen über Basenpaarstabilitäten gewonnen werden. Außerdem konnten Entropie- und Enthalpiebeiträge zur freien Enthalpie der Basenpaaröffnung voneinander getrennt werden. Die Analyse wurde an der FourU-hairpin2-wt (4U-hp2-wt) RNA (Abbildung 2.2B) sowie an der FourU-hairpin2-A8C-Mutanten (4U-hp2-A8C-Mutante) RNA durchgeführt (Abbildung 2.2C) und mit Circular dichroismus-(CD) Entfaltungskurven dieser beiden RNAs verglichen. Durch den Vergleich von Nucleobasenstabilitäten beider RNAs konnten wichtige Faktoren für die Stabilität der gesamten RNA-Helix identifiziert werden. Über einen Vergleich der Temperaturabhängigkeit von Basenpaarstabilitäten mit CD-Schmelzkurven konnten generelle Prinzipien für den Entfaltungsprozess von RNA im Allgemeinen abgeleitet werden. Die gewonnenen Erkenntnisse über die Stabilität der 4U-hp2 RNA wurden

anhand einer dritten Mutante (4U-hp2-G14A-C25U-Mutante) CD-spektroskopisch überprüft. Des Weiteren wurde der Effekt von Mg^{2+} -Ionen auf die Stabilität der 4U-hp2-wt RNA NMR- und CD-spektroskopisch untersucht. Dazu wurden die Mg^{2+} -Bindestellen über PRE-Analyse, CSP-Analyse und NOESYs in Anwesenheit von Kobalthexamin lokalisiert. Über der CSP-Analyse wurde zusätzlich die Bindungsstärke analysiert. Der Effekt von physiologischen Mg^{2+} -Konzentrationen auf die Basenpaarstabilitäten wurde über *inversion recovery* Austausch-Experimente bestimmt und mit der Mg^{2+} -Abhängigkeit der globalen Entfaltung (CD-Spektroskopie) der 4U-hp2-wt RNA in Beziehung gesetzt.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Messungen wurden an 600 MHz, 800 MHz und 900 MHz Bruker NMR-Spektrometern, die mit 5 mM HCN z-Gradienten Kryoprobenköpfen ausgestattet waren, durchgeführt. Die Spektren wurden mit der Bruker TopSpin 2.0/2.1 Software aufgenommen und prozessiert. Die prozessierten Spektren wurden anschließend in das UCSF Dateiformat konvertiert und mit Sparky 3.1.1.3 analysiert.

2.2.1.1 Resonanzzuordnung der Iminoprotonen

NOESY: Für die Zuordnung der Iminoressonanzen der ^{15}N -markierten 4U-hp2-wt RNA (Akquisitionsparameter, siehe Abschnitt 7.2, Tabelle 7-3) sowie der 4U-hp2-A8C Mutante (Akquisitionsparameter, siehe Abschnitt 7.2, Tabelle 7-4) wurden 2D- 1H Watergate NOESY-Experimente [9, 109] mit einer Mischzeit $T_m=150$ ms und einer Temperatur von 283 K aufgenommen. Harte Protonenpulse wurden vor der Mischzeit bei 7.5 ppm und bei 4.7 ppm (Wasserresonanz) nach der Mischzeit eingestrahlt. Während der t_1 -Entwicklung der ^{15}N chemischen Verschiebung wurde ein harter ^{15}N -Puls verwendet, um die ^{15}N -Resonanzen von den 1H -Resonanzen zu entkoppeln. Die ^{15}N -Trägerfrequenz wurde auf 121 ppm gesetzt. Die Radiofrequenz (RF)-Feldstärke betrug 7.4 kHz. Während der Signalakquisition wurde eine GARP4-Pulsfolge [110] zur Breitbandentkopplung auf dem ^{15}N -Kanal mit einer RF-

Feldstärke von 2.0 kHz verwendet. Die ^{15}N -Trägerfrequenz wurde dafür auf 152 ppm gesetzt. Für die 4U-hp2-wt RNA wurde zusätzlich ein ^{15}N editiertes 3D-NOESY-HSQC [111] mit einer *Soft Watergate* Wasserunterdrückung [109] (Bruker Pulsprogramm-bibliothek: na_noesyhsqcf3gpwg3d) bei einer Temperatur von 10°C und einer B_0 -Feldstärke von 900 MHz aufgenommen, um Zuordnungsmehrdeutigkeiten in der ^1H -Dimension aufzulösen.

[$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$]-HSQC: ^{15}N -HSQCs wurden bei B_0 -Feldstärken von 600 MHz, 800 MHz und 900 MHz aufgenommen. Dabei wurde eine Standardpulssequenz [112] (TopSpin 2.1 Pulsprogramm-bibliothek: fhsqcf3gpwh) mit einer „Hard Watergate“ Wasserunterdrückung [113] verwendet (Akquisitionsparameter: siehe Abschnitt 7.2, Tabelle 7-3 und Tabelle 7-4).

HNN-COSY: Die HNN-COSY-Experimente wurden bei B_0 -Feldstärken von 600 MHz und 800 MHz bei Temperaturen von 10°C bzw. 20°C aufgenommen (Akquisitionsparameter: siehe Abschnitt 7.2, Tabelle 7-3 und Tabelle 7-4). Die Experimente wurden aufgesetzt wie bereits beschrieben [114].

2.2.1.2 Resonanzzuordnung aller NMR-aktiven Kerne der 4U-hp2-wt RNA

Für die weitere Zuordnung von ^1H , ^{13}C und ^{15}N NMR-aktiven Kernen innerhalb der 4U-hp2-wt RNA wurde die im Folgenden beschriebene Zuordnungsstrategie verwendet. Die Zuordnung wurde bei einer Temperatur von 20°C durchgeführt. Da die Iminoprotonenzuordnung bei einer Temperatur von 10°C durchgeführt wurde, wurden Temperaturreihen der [$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$]-HSQCs [112] zwischen 10°C und 20°C durchgeführt, um die Zuordnung auf das [$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$]-HSQC bei 20°C zu übertragen.

Um das Problem der Signalüberlappung weitestgehend zu umgehen, wurden drei unterschiedliche Isotopenmarkierungen verwendet. Die für die Zuordnung verwendeten Proben sind in Tabelle 2-1 dargestellt. Für die Guanosin-, ^{13}C -, ^{15}N -markierte Probe sowie für die Uridin-, ^{13}C -, ^{15}N -markierte Probe wurden jeweils eine D_2O -Probe und eine H_2O -Probe hergestellt.

Tabelle 2-1 Markierungsschemata der fünf verschiedenen 4U-hp2-wt RNA-Proben.

| | Probe 1 | Probe 2 | Probe 3 | Probe 4 | Probe 5 |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|
| ^{13}C , ^{15}N -Markierung | A, C | U | U | G | G |
| D ₂ O Gehalt [%] | 99,99 | 99,99 | 10 | 99,99 | 10 |

U (Uridin); A (Adenosin), C (Cytidin), G (Guanosin)

Pufferzusammensetzung: 15 mM $\text{K}_x\text{H}_y\text{PO}_4$, 25 mM KCl

Referenzierung mit DSS in 15 mM $\text{K}_x\text{H}_y\text{PO}_4$, 25 mM KCl bei 20°C

Ausgangspunkt für die weitere Zuordnung der ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -Resonanzen sind die Iminoprotonen der Uracil- und Guanin-Nukleobasen, die sich in Basenpaarungen befinden und deshalb beobachtbare Iminosignale besitzen. Die Zuordnung der entsprechenden Iminoresonanzen innerhalb der 4U-hp2-wt RNA ist im vorangehenden Abschnitt (Abschnitt 2.2.1.1) beschrieben. Die Akquisitionsparameter der an Probe 1 (Tabelle 2-1) aufgenommenen NMR-Experimente sind in Tabelle 7-5 im Anhang dieser Arbeit wiedergegeben. Die Akquisitionsparameter der an Probe 2 und Probe 3 (Tabelle 2-1) aufgenommenen NMR-Experimente sind in Tabelle 7-6 und die Akquisitionsparameter der an Probe 4 und Probe 5 (Tabelle 2-1) aufgenommenen NMR-Experimente sind Tabelle 7-7 im Anhang dieser Arbeit wiedergegeben.

Zuordnung der C6-H6- bzw. C5-H5-Resonanzen der basengepaarten Uridin-Nukleotide: Für die Zuordnung der C6-H6-Resonanzen wurde Probe 3 (Tabelle 2-1) verwendet. Um die H3-Iminoresonanzen mit den H6-Resonanzen zu korrelieren, wurde ein H(CCN)H-TOCSY [115] (TopSpin 2.1 Pulsprogramm-bibliothek: na_h56c56c4n3h_3d2) sowie ein (H)C(CN)H-TOCSY [115] (TopSpin 2.1 Pulsprogramm-bibliothek: na_h56c56c4n3h_3d2) aufgenommen. Zusätzlich dazu wurde für die Korrelation der H3 Protonen mit den H5 Protonen ein H(CCN)H-COSY-Experiment [116] (TopSpin 2.1 Pulsprogramm-bibliothek: na_h5c5c4n3h_3d) durchgeführt. Auf diese Weise konnten die H6-C6-Signale im [^1H , ^{13}C]-HSQC eindeutig mit den Iminosignalen der jeweiligen Uracil-Nukleobase korreliert werden. Über die H3-H5-Korrelation konnten auch die entsprechenden H5-C5-Signale im [^1H , ^{13}C]-HSQC zugeordnet werden.

Zuordnung der H6-C6-N1-C1'-H1'-Resonanzen der basengepaarten Uridin-Nukleotide: Um die H6-C6-N1-C1'-H1'-Konnektivität der jeweiligen Uridin-Nukleotide innerhalb der 4U-hp2-wt RNA herzustellen, wurde ein 3D-HCN [H1'] [117] (na_hcnetgpsisp3d_jr1; leicht modifiziertes na_hcnetgpsisp3d; Entkopplung von C2'), ein 3D-HCN [117] [H6] (na_hcnetgpsisp3d_jr1; leicht modifiziertes na_hcnetgpsisp3d, Entkopplung von C5) sowie ein 3D-TROSY-MQ-H(C)N(C)H [118, 119] (na_trhcnchmqsp3d_jr1; leicht modifiziertes na_trhcnchmqsp3d_jr1; Hartpulse auf ^1H) der Uridin-, ^{13}C -, ^{15}N -markierten D_2O -Probe (Probe 2, Tabelle 2-1) durchgeführt.

Zuordnung der C2-H2-Resonanzen der basengepaarten Adenosin-Nukleotide: Die Korrelation zwischen H3 (Uracil) und H2 (Adenin) ist über die Auswertung des 2D- $[\text{}^1\text{H}-\text{}^1\text{H}]$ -NOESYs möglich, da zwischen H3 (Uracil) und H2 (Adenin) in AU-Basenpaaren aufgrund der räumlichen Nähe der beiden Protonen im Allgemeinen ein starker NOE zu beobachten ist. Die Korrelation zwischen H3 (Uracil) und H2 (Adenin) ist über die Zuordnung der Kreuzsignale des HNN-COSY-Experiments möglich. Die Durchführung dieser Experimente ist in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben. Durch diese zwei Experimente ist es möglich, die H2-N1-Signale im $^2\text{J}[\text{}^1\text{H},\text{}^{15}\text{N}]$ -HSQC zuzuordnen.

Die weiteren Experimente wurden an der Adenosin-, Cytidin-, ^{13}C -, ^{15}N -markierten 4U-hp2-wt RNA D_2O -Probe durchgeführt (Probe 1, Tabelle 2-1). Es wurde ein 3D-HNHC (Soft Watergate) Experiment (siehe Abschnitt 5.1) [120] aufgenommen. Mit diesem Experiment können die jeweiligen H2-N1-Resonanzpaare mit den dazugehörigen C2-Resonanzen korreliert werden. Die Entwicklung dieses Experiments ist Teil dieser Arbeit und ist in Abschnitt 5.1 beschrieben.

Zuordnung der C8-H8-Resonanzen der basengepaarten Adenosin-Nukleotide: Die Konnektivität der H2-C2-Signale mit den H8-C8-Signalen wurde über das 3D-TROSY-(H)CCH-COSY-Experiment [121] (TopSpin 2.1 Pulsprogramm-bibliothek: na_trhcchco3d) hergestellt.

Zuordnung der C8-H8-Resonanzen der Cytosin-Nukleotide: Da die 4U-hp2-wt RNA nur zwei Cytidin-Nukleotide (C9, C25) besitzt sind für die Zuordnung der C6-

H6-Resonanzen keine speziellen Korrelationsexperimente notwendig. Die Zuordnung wurde über das 3D- $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ -NOESY-HSQC (Aromaten) (TopSpin 2.1 Pulsprogramm-bibliothek: na_c6noesyhsqcg3d) über die benachbarten Nukleotide erhalten (A26, U10) (siehe unten).

Zuordnung der H8-C8-N9-C1'-H1'-Resonanzen der Adenosin-Nukleotide sowie die Zuordnung der H6-C6-N1-C1'-H1'-Resonanzen der Cytidin-Nukleotide:

Um die H8-C8-N9-C1'-H1'-Konnektivität der jeweiligen Adenosin-Nukleotide innerhalb der 4U-hp2-wt RNA herzustellen wurde ein 3D-HCN [H1'] [117] (na_hcnetgpsisp3d_jr1; leicht modifiziertes na_hcnetgpsisp3d; Entkopplung von C2'), ein 3D-HCN [H6/H8] [117] (na_hcnetgpsisp3d_jr1; leicht modifiziertes na_hcnetgpsisp3d; Entkopplung von C5 des Adenins und C5 des Cytosins) sowie ein H(CN)H-Experiment [122] (TopSpin 2.1 Pulsprogramm-bibliothek: na_hcnhgpph19) durchgeführt. Die H6-C6-N1-C1'-H1'-Konnektivität der Cytidin-Nukleotide wurde durch die Auswertung des 3D-HCN [H1'] und des 3D-HCN [H6/H8] ebenfalls erhalten.

Zuordnung der C8-H8-Resonanzen der basengepaarten Guanodin-Nukleotide:

Die Zuordnung der C8-H8-Resonanzen wurde mit einer Guanodin-, ^{13}C -, ^{15}N -markierten H_2O -Probe (Probe 5, Tabelle 2-1) sowie einer entsprechenden D_2O -Probe (Probe 4, Tabelle 2-1) durchgeführt. Über ein 2D-H(N)CO (Probe 5) [123-125] (TopSpin 2.1 Pulsprogramm-bibliothek: hncogp3d mit Entkopplung von C5, 115 ppm) wurden die H1-Resonanzen mit den C2- und C6-Resonanzen der Guaninbasen korreliert. Zusätzlich dazu wurden über ein 2D-H(NC6)C5 (Probe 4) [126] (TopSpin 2.1 Pulsprogramm-bibliothek: na_hnc6c5etgpsi) die H1-Resonanzen mit den C5-Resonanzen korreliert. Durch Kombination der Information beider Experimente ließen sich so die H1-N1-C2-C6-C5-Resonanzen, die zu jeweils einer Guaninbase gehören, miteinander verbinden. Zusätzlich dazu wurde ein 3D-TROSY-(H)CCH-COSY-Experiment durchgeführt [121] (TopSpin 2.1 Pulsprogramm-bibliothek: na_trhchco3d), um die H8-C8-C4-C5-C6-Korrelation herzustellen. Da man nun sowohl die H1-N1-Resonanzen wie auch die H8-C8-Resonanzen mit den C4-C5-Resonanzen korreliert hat, lässt sich durch Kombination der Information die gewünschte H1-N1-C8-H8-Korrelation herstellen.

Zuordnung der H8-C8-N9-C1'-H1'-Resonanzen der Guanosin-Nukleotide: Um die H8-C8-N9-C1'-H1'-Konnektivität der jeweiligen Guanosin-Nukleotide innerhalb der 4U-hp2-wt RNA herzustellen wurde ein 3D-HCN [H1'] [117] (na_hcnetgpsisp3d_jr1; leicht modifiziertes na_hcnetgpsisp3d; Entkopplung von C2'), ein 3D-HCN- [H8] sowie ein H(CN)H-Experiment [122] (TopSpin 2.1 Pulsprogramm-bibliothek: na_hcnhgpph19) durchgeführt (Probe 4, Tabelle 2-1).

Zuordnung der C8-H8- sowie C1'-H1'-Resonanzen der nicht basengepaarten Nukleotide innerhalb der 4U-hp2-wt RNA: Mit den D₂O-Proben der AC-markierten (Probe 1, Tabelle 2-1), der U markierten (Probe 2, Tabelle 2-1) sowie der G-markierten (Probe 4, Tabelle 2-1) Probe wurden jeweils 3D-[¹H-¹³C]-NOESY-HSQC-Experimente (Aromaten) (TopSpin 2.1 Pulsprogramm-bibliothek: na_c6noesyhsqcg3d) durchgeführt. In diesen Experimenten werden die NOE-Kreuzsignale aller räumlich benachbarten Protonen mit dem [¹H,¹³C]-HSQC der Aromatenregion korreliert. Ein H6-C6 (Pyrimidin)- bzw. H8-C8 (Purin)-Signal zeigt jeweils Kreuzsignale zu zwei H1'-Protonen. Von diesen beiden Kreuzsignalen gehört eines zum gleichen Nukleotid und das andere zum vorhergehenden Nukleotid. Da die H1'-Resonanzen der basengepaarten Nukleotide bekannt sind, kann auf diese Weise die Konnektivität zu dem jeweils sequentiell vorhergehenden Nukleotid erreicht werden. Auf diese Weise kann die Zuordnung auch auf nicht basengepaarte Bereiche erweitert werden. Ist das C1'-H1'-Signal des vorhergehenden Signals zugeordnet, kann über die H8-C8-N9-C1'-H1'-Konnektivität (siehe oben) das zu diesem Nukleotid gehörende C8-C8-Signal im [¹H,¹³C]-HSQC identifiziert werden. Ist das entsprechende Signal identifiziert, kann über das 3D-[¹H-¹³C]-NOESY-HSQC wiederum nach der vorhergehenden Aminosäure gesucht werden, und so weiter.

Zuordnung der C1'-H1'-C2'-H2'-Resonanzen der Ribosysteme: Mit den D₂O-Proben der AC-markierten (Probe 1, Tabelle 2-1), der U-markierten (Probe 2, Tabelle 2-1) sowie der G-markierten (Probe 4, Tabelle 2-1) Probe wurden jeweils 3D-HC(C)H-COSY-Experimente [127] (TopSpin 2.1 Pulsprogramm-bibliothek: hcchcogp3d) durchgeführt. Über diese Experimente ist es möglich, die C1'-H1'-C2'-H2'-Korrelation herzustellen und somit die C2'-H2'-Signale im [¹H,¹³C]-HSQC basenspezifisch zuzuordnen.

Zuordnung der C3'-H3'-, C4'-H4'-, C5'-H5'-H5''-Resonanzen der Ribosesysteme: Ist das C2'-H2'-Signal eindeutig identifiziert, kann daraufhin das C3'-H3'-Signal zugeordnet werden, und so weiter. Da die C2'-H2'-Signale und die C3'-H3'-Signale jedoch oft überlappen, ist eine Zuordnung der gesamten Ribose bis hin zum C5'-H5'-H5'' allein mit dem 3D HC(C)H-COSY oftmals nicht möglich. Ist eine komplette Zuordnung der Ribosesysteme gewünscht, lässt sich zusätzlich noch ein 3D-HC(C)H-TOCSY [127] (TopSpin 2.1 Pulsprogramm-bibliothek: hcchdigp3d) bzw. 3D-(H)CCH-TOCSY [127] (TopSpin 2.1 Pulsprogramm-bibliothek: hcchdigp3d2) aufnehmen. Dies sollte vorzugsweise an einem HCP-Probenkopf geschehen, um die vielen ^{13}C - ^{31}P und ^1H - ^{31}P Kopplungen unterdrücken zu können.

2.2.1.3 „*Inversion Recovery*“ Experimente

Das *Inversion Recovery* Experiment wurde in einer ^{15}N -editierten Version aufgesetzt. Dafür wurde ein modifiziertes [^1H , ^{15}N]-HSQC Pulsprogrammelement mit einer *Hard Watergate* Pulsfolge zur Wasserunterdrückung verwendet. Das *Inversion Recovery* Modul [68] wurde vor dem [^1H , ^{15}N]-HSQC Pulsprogrammelement gesetzt. Es bestand aus einem selektiven 180° -ReBurp-Puls, der auf die Wasserresonanz eingestrahlt wurde, und einer variablen Mischzeit τ_m für den Magnetisierungstransfer. Während dieser Zeit wurden bipolare Gradienten in z-Richtung verwendet, um „*Radiation damping*“ auf dem Wassersignal zu unterdrücken. Die Stärke der bipolaren Gradienten wurde auf 5% gesetzt. 100% Gradientenstärke entsprachen dabei 55Gauß/cm.

Für τ_m -Werte kürzer als 300 ms wurde direkt vor dem [^1H , ^{15}N]-HSQC Pulsprogrammelement ein zweiter selektiver 180° -ReBurp-Puls auf die Wasserresonanz eingestrahlt, um die Wasserunterdrückung zu verbessern. Das Experiment wurde als Pseudo-3D für verschiedene Temperaturen zwischen 5°C und 50°C aufgenommen. Bei jeder Temperatur wurden zwischen 18 und 22 verschiedene τ_m -Werte aufgenommen. Die τ_m -Werte bewegten sich dabei zwischen 2 ms und 4 s. Die Akquisitionsparameter befinden sich in Abschnitt 7.2, Tabelle 7-3 (4U-hp2-wt) sowie Tabelle 7-4 (4U-hp2-A8C Mutante) im Anhang dieser Arbeit.

2.2.2 RNA-Präparation

¹⁵N-markierte RNA-Oligonukleotide wurden über *in vitro* Transkription mit T7-RNA-Polymerase hergestellt [128]. Die dafür verwendeten ¹⁵N-markierten Mononukleotide wurden von der Firma Silantes (München, Deutschland) bezogen. Als Templat für die RNA-Polymerisation wurde linearisierte Plasmid-DNA verwendet. Bei der Klonierung der entsprechenden Plasmid-DNA wurde pUC19-Vektor verwendet. Das gewünschte DNA-Fragment (Insert) wurde über die Schnittstellen *EcoRI* (New England Biolabs) und *BamHI* (New England Biolabs) in die MCS des pUC19-Vektors kloniert. Die Insert-DNAs wurden über PCR hergestellt. Die für die PCR verwendeten DNA-Oligonukleotide (Forward Primer, Templat, *Reverse Primer*) wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon (Eberberg, Deutschland) gekauft. Zur Linearisierung des Plasmids wurde das Restriktionsenzym *SSP I* (New England Biolabs) verwendet. Die RNA-Aufreinigung wurde durchgeführt wie bereits beschrieben [128, 129]. Anschließend wurde die RNA über Vivaspin-20 Konzentratoren mit einem MWCO von 3000 Da der Firma Sartorius stedim biotech (Aubagne Cedex, Frankreich) entsalzt. Die Rückfaltung der RNA wurde durchgeführt, indem die RNA für 10 min bei einer Konzentration von 0.25 mM und einer Temperatur von 95°C denaturiert und anschließend zügig mit eiskaltem Wasser 20fach verdünnt wurde. Anschließend wurde die Lösung für weitere 30 Minuten bei einer Temperatur von 0°C inkubiert. Die RNA wurde über einen Vivaspin-20 Konzentrator (MWCO=3000 Da) konzentriert und gegen NMR-Puffer ausgetauscht. Die korrekte Faltung der RNA wurde über native Polyacrylamid-Gelelektrophorese verifiziert. CD- und NMR-Messungen wurden unter den gleichen Pufferbedingungen durchgeführt. Der Puffer beinhaltete 15 mM $K_xH_yPO_4$ (pH6.5) und 25 mM KCl. Der Wassergehalt des H₂O-Puffers betrug 90% H₂O und 10% D₂O während der D₂O-Puffer 99.99% D₂O beinhaltete. Für die CD-Messungen wurde der H₂O-Puffer verwendet.

2.2.3 Native Gelelektrophorese

Der verwendete 5x Probenpuffer war zusammengesetzt aus 87% Glyzerol, 0,1% (w/v) Xylen Cyanol FF und 0.1 (w/v) Bromphenolblau. Der 1x Laufpuffer

beinhaltete 50 mM Tris-Acetat und 50 mM Natriumphosphat (pH 8.3). Das Gel wurde mit 15%igem Acrylamidanteil mit einem Acrylamid/Bisacrylamid Konzentrationsverhältnis von 37.5:1 gegossen. Die Laufbedingungen wurden folgendermaßen gewählt: $U=70V$, $P<0.5W$ für 4 Std., Wasserkühlung zur Vermeidung von Überhitzung. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt.

2.2.4 Denaturierende Gelelektrophorese

Der 4x Probenpuffer war zusammengesetzt aus 99% Formamid und 0.1% (w/v) Bromphenolblau (BPB). Der 1x Laufpuffer bestand aus 100 mM Tris-Borat (pH 8.3) und 10 mM EDTA. Die Gele wurden aus einer Mischung von 15% Acrylamid mit einem Acrylamid/Bisacrylamid Konzentrationsverhältnis von 37.5:1 gegossen. Zusätzlich dazu beinhalteten die Gele 7M Harnstoff und 1x Laufpuffer. Die Laufbedingungen wurden folgendermaßen gewählt: $U = 230 V$ für 40 min; Wasserkühlung, um Temperaturgradienten zu vermeiden. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Färbung wurde bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht.

2.2.5 CD-Spektroskopie

Für die CD-spektroskopischen Untersuchungen an RNA wurden folgende Pufferbedingungen verwendet: 15 mM $K_xH_y(PO_4)$, 25 mM KCl, pH 6.5. Die RNA-Konzentration wurde auf 25 μM eingestellt. Bei einigen Untersuchungen wurde zusätzlich die $MgCl_2$ -Konzentration variiert. Für die Messungen wurde eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 mm verwendet. Die CD-Messungen wurden mit einem JASCO Spektropolarimeter J-810 durchgeführt.

CD-Spektren: Die Akquisitionsparameter wurden wie folgt gesetzt: Spektrale Weite 300nm-200nm, *Scanning*-Geschwindigkeit 50 nm/min, Bandbreite 2 nm, Temperatur 10°C.

CD-Schmelz- und Rückfaltungskurven: Die CD-Schmelzkurven wurden mit einer Temperatursteigung von 1°C/min bei einer Wellenlänge von 258 nm zwischen 10°C-90°C aufgenommen. Die CD-Rückfaltungskurven wurden mit einer

Temperatursteigung von $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ von 90°C bis 10°C aufgenommen. Die CD-Schmelz- und Rückfaltungskurven wurden über die Hill-Gleichung gefittet (Gleichung 2-1).

Gleichung 2-1

$$f(T) = \frac{aT^b}{T_m^b + T^b}$$

T_m ist die Schmelz- bzw. Faltungstemperatur der RNA, a die Amplitude, T die Temperatur und b der Hill-Koeffizient. Der Hill-Koeffizient ist ein Maß für die Kooperativität des RNA-Entfaltungsübergangs. Ein hoher Hill-Koeffizient entspricht dabei einem scharfen Entfaltungsübergang, während ein geringer Hill-Koeffizient einen allmählichen Übergang vom gefalteten zum ungefalteten Zustand darstellt [130]. Die CD Kurven wurden normalisiert und mit Gleichung 2-1 gefittet.

Aus den CD-Schmelz- bzw. Rückfaltungskurven lassen sich die thermodynamischen Parameter ΔH_{Entf}^0 , ΔS_{Entf}^0 und ΔG_{Entf}^0 für den Entfaltungsprozess der RNA ableiten. Die molaren Größen ΔH_{Entf}^0 , ΔS_{Entf}^0 und ΔG_{Entf}^0 werden im Folgenden mit ΔH_{Entf} , ΔS_{Entf} und ΔG_{Entf} bezeichnet.

Nimmt man an, dass die RNA entweder gefaltet oder entfaltet vorliegen kann, so lässt sich der Anteil der entfalteten RNA an der gesamten RNA definieren als

Gleichung 2-2

$$\alpha(T) = 1 - \frac{[RNA_{gefaltet}(T)]}{[RNA_{gesamt}]}$$

Der Anteil der entfalteten RNA α variiert mit der Temperatur. Die Änderung von α in Abhängigkeit der Temperatur lässt sich über die Änderung der Elliptizität entsprechend Gleichung 2-3 verfolgen.

Gleichung 2-3

$$\alpha(T) = 1 - \frac{\theta(T) - \theta_{\text{entfaltet}}(T)}{\theta_{\text{gefaltet}}(T) - \theta_{\text{entfaltet}}(T)}$$

In Gleichung 2-3 ist $\theta(T)$ die gemessene Elliptizität bei der jeweiligen Temperatur. Die Elliptizitäten der gefalteten RNA θ_{gefaltet} und der entfalteten RNA $\theta_{\text{entfaltet}}$ sind ebenfalls temperaturabhängig. Ihre Temperaturabhängigkeit kann durch Anlegen von Asymptoten in den Grenzbereichen der Entfaltungs- und Faltungskurven linear approximiert werden. Aus der so erhaltenen $\alpha(T)$ -Abhängigkeit lässt sich die molare Entfaltungsenthalpie ΔH_{Entf} entsprechend Gleichung 2-4 berechnen. Der Schmelzpunkt T_m wird als Temperatur definiert, an der die Hälfte der RNA entfaltet ist ($\alpha = 0.5$). Ist die Kurve perfekt sigmoidal, so ist die Steigung der $\alpha(T)$ -Kurve an dieser Stelle maximal.

Gleichung 2-4

$$\Delta H_{\text{Entf}} = 4RT_m^2 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial T} \right)_{T=T_m}$$

In Gleichung 2-4 stellt R die ideale Gaskonstante, T_m den Schmelzpunkt und α den Anteil entfalteter RNA dar. Aus der Entfaltungsenthalpie ΔH_{Entf} lässt sich nach Gleichung 2-5 die molare Entfaltungsentropie ΔS_{Entf} berechnen.

Gleichung 2-5

$$\Delta S_{\text{Entf}} = \frac{\Delta H_{\text{Entf}}}{T_m}$$

Über die Gibbs-Helmholtz Gleichung (Gleichung 2-6) lässt sich unter der Annahme, dass ΔH_{Entf} und ΔS_{Entf} nicht temperaturabhängig sind, die molare freie Entfaltungsenthalpie ΔG_{Entf} berechnen.

Gleichung 2-6

$$\Delta G_{\text{Entf}} = \Delta H_{\text{Entf}} + T \Delta S_{\text{Entf}}$$

2.2.6 Analyse der Iminoprotonenaustauschraten

Pseudo-3D *Inversion Recovery* Experimente wurden mit dem Programm Sparky 3.1.1.3 analysiert. Die normalisierten Intensitäten der Iminosignale für jede 2D-¹H-¹⁵N-Ebene wurden gegen die Mischzeit τ_m aufgetragen und mit der folgenden Gleichung gefittet:

Gleichung 2-7

$$\frac{I_n(\tau_m)}{I_n(0)} - 1 = \left(\frac{I_w(0)}{\langle I_n(0) \rangle} - 1 \right) \frac{k_{ex} [\exp(-R_{1n} \times \tau_m) - \exp(-R_{1w} \times \tau_m)]}{[-R_{1n} + R_{1w}]}$$

$I_n(\tau_m)$ repräsentiert die Intensität der Iminoprotonen zum Zeitpunkt τ_m , während $I_n(0)$ die Intensität der Iminoprotonen zum Zeitpunkt $\tau_m=0$ darstellt. $I_w(0)$ entspricht der Intensität des Wassersignals normalisiert auf die Anzahl der Wasserprotonen in der Probe zum Zeitpunkt $\tau_m=0$ und $\langle I_n(0) \rangle$ der Intensität eines individuellen Iminoprotonensignals normalisiert auf die Anzahl der Protonen dieser Spinspezies innerhalb der Probe zum Zeitpunkt $\tau_m=0$. Nimmt man an, dass der 180°-ReBurp-Puls die Wassermagnetisierung komplett invertiert und die Magnetisierung der Iminoprotonen in z-Orientierung belässt, so kann $I_w(0)/\langle I_n(0) \rangle$ auf den Wert -1 gesetzt werden. R_{1w} entspricht der R_1 -Relaxationsrate des Wassersignals, R_{1n} der R_1 -Relaxationsrate der Iminoprotonen und k_{ex} der Austauschrate zwischen Iminoprotonen und Wasser. Die aufgenommenen Datenpunkte wurden mit Gleichung 2-7 gefittet, wobei R_{1n} , R_{1w} und k_{ex} die drei anzupassenden Parameter darstellten.

Iminoprotonen von Nukleobasen in RNA-Oligonukleotiden sind vor chemischem Austausch mit dem Lösungsmittel Wasser geschützt, so lange sie sich in einer Wasserstoffbrücke befinden. Dies ist üblicherweise dann der Fall, wenn Nukleobasen in einer RNA-Doppelhelix lokalisiert sind. Allerdings finden Basenpaaröffnungen für jede Nukleobase in einer RNA-Doppelhelix auch dann statt, wenn die Helix als Ganzes stabil ist. So lange sich die Nukleobase in der offenen Konformation befindet, ist sie nicht länger in einer Wasserstoffbrücke zu einer anderen Nukleobase, und ein Protonenaustausch mit dem Lösungsmittel H₂O kann stattfinden. Meistens

wird der Iminoprotonenaustausch durch andere Substanzen in der Pufferlösung katalysiert. Im Prinzip können alle Substanzen, die die Fähigkeit besitzen, Protonen aufzunehmen, als Katalysator für die Protonenaustauschreaktion fungieren. Im Speziellen sind Puffersubstanzen wie TRIS, HEPES, MES und Phosphat Katalysatoren der Protonenaustauschreaktion. Da der NMR-Puffer, der in dieser Arbeit für die RNA-Thermometer-Proben verwendet wurde, 15 mM $K_xH_yPO_4$ (pH 6.5) beinhaltet, wird die Austauschrate hauptsächlich bestimmt von und ist proportional zur Konzentration der HPO_4^{2-} Ionen.

Um die Iminoprotonenaustauschrate (Austauschrate) $k_{ex,open}$ in der offenen Konformation abzuschätzen, wurde die Temperaturabhängigkeit der Austauschraten von Modellverbindungen $k_{ex,UTP(GTP)}$, die der offenen Konformation ähneln, in NMR-Puffer bestimmt. Als Modellverbindungen dienten dabei UTP und GTP NMR-Proben (Zusammensetzung: siehe 2.2.7, Bestimmung der Mononukleotid-Iminoprotonenaustauschrate). Die Temperaturabhängigkeit der Austauschraten kann entsprechend der Eyring-Gleichung (Gleichung 2-8) interpretiert werden.

Gleichung 2-8

$$k_{ex,open} = \alpha k'_{ex,UTP(GTP)} = \alpha \frac{1}{\tau'_{ex,UTP(GTP)}} = \alpha \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{-\Delta G_{TR}}{RT}\right) = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{T\Delta S_{TR} - \Delta H_{TR}}{RT}\right)$$

ΔG_{TR} (Freie Enthalpie), ΔS_{TR} (Entropie) und ΔH_{TR} (Enthalpie) stellen Parameter dar, die den Übergangszustand der Iminoprotonenaustauschreaktion zwischen der Iminogruppe und dem Lösungsmittel H_2O beschreiben. $k'_{ex,UTP(GTP)}$ stellt die diffusionskorrigierte Austauschrate der Mononukleotide, k_B die Boltzmann-Konstante und h das Plancksche Wirkungsquantum dar. Unterschiede in der Zugänglichkeit der Iminoprotonen der Mononukleotide und der Iminoprotonen der Nucleobasen innerhalb des RNA-Oligonukleotids werden durch den Faktor α berücksichtigt. Für diesen Faktor wurde ein Wert von $\alpha=1$ sowie Temperaturunabhängigkeit angenommen [95].

Der Austauschprozess ist diffusionskontrolliert. Da UTP und GTP viel kleiner sind als ein großes RNA-Molekül, müssen die Austauschraten von UTP und GTP mit

folgender Formel (Gleichung 2-9) korrigiert werden, um die Unterschiede der Diffusionskoeffizienten zwischen RNA und Mononukleotiden zu berücksichtigen [104]:

Gleichung 2-9

$$k'_{ex,UTP(GTP)} = k_{ex,UTP(GTP)} \frac{\left(1 + \sqrt[3]{\frac{M_c}{M_{RNA}}}\right)}{\left(1 + \sqrt[3]{\frac{M_c}{M_{UTP(GTP)}}}\right)}$$

In Gleichung 2-9 ist M_c das Molekulargewicht des Katalysators, in diesem Fall HPO_4^{2-} ($M_c=80$ Da), M_{RNA} das Molekulargewicht der RNA und $M_{UTP(GTP)}$ das Molekulargewicht von UTP bzw. GTP. Bezüglich der Basenpaaröffnung lassen sich zwei Grenzfälle kinetisch voneinander unterscheiden. Beim ersten Grenzfall (EX1 Bedingung, Gleichung 2-10) ist der Protonenaustausch in der offenen Konformation so schnell, dass bei jeder Basenpaaröffnung ein Protonenaustausch zum Wasser stattfindet.

Gleichung 2-10



Beim zweiten Grenzfall (EX2-Bedingungen, Gleichung 2-11) ist die $k_{ex,open}$ Öffnungsrate so langsam, dass sich ein Basenpaar im Mittel viele Male öffnet und schließt bis ein Protonenaustausch zum Lösungsmittel stattfindet, so dass ein der Austauschreaktion vorgelagertes Gleichgewicht zwischen offenem und geschlossenem Zustand angenommen werden kann.

Gleichung 2-11



Unter EX2-Bedingungen kann die Austauschratenkonstante folgendermaßen vereinfacht werden [74]

Gleichung 2-12

$$k_{ex} = 1 / (\tau_0 + \tau_{ex,open} (1 + 1 / K_{diss})) \cong 1 / (\tau_{ex,open} (1 + 1 / K_{diss}))$$

In Gleichung 2-12 ist τ_0 die Basenpaarlebenszeit, $\tau_{ex,open}$ die mittlere Austauschzeit des offenen Zustands und K_{diss} die Gleichgewichtskonstante zwischen geschlossenem (basengepaartem) und offenem Zustand.

In dieser Arbeit wurde die Katalysatorkonzentration $(\text{HPO}_4)^{2-}$ so gewählt, dass sich die Iminoprotonenaustauschrate proportional zur Katalysatorkonzentration (bzw. Pufferkonzentration) verhält. Dies ist immer dann der Fall, wenn die Austauschrate durch den externen Katalysator (hier $(\text{HPO}_4)^{2-}$) bestimmt wird, also die unkatalysierte Reaktion bzw. die interne Katalyse (Akzeptorstickstoff innerhalb des Basenpaars; Cytosin N3 bzw. Adenin N1) vernachlässigt werden kann. Des Weiteren muss der Austausch aber langsam genug sein, so dass gewährleistet ist, dass die Austauschreaktion unter EX2-Bedingungen stattfindet (siehe Abbildung 1 in [74]). Bei den hier gewählten Pufferkonzentrationen ist dies der Fall (15mM $\text{K}_x\text{H}_y\text{PO}_4$, pH 6.5), so dass Gleichung 2-12 Anwendung findet. Die Gleichgewichtskonstante K_{diss} beschreibt die Basenpaaröffnung. Sie kann als freie Enthalpie ΔG_{diss} ausgedrückt werden durch

Gleichung 2-13

$$K_{diss} = \exp\left(-\frac{\Delta G_{diss}}{RT}\right)$$

Die Austauschzeit im offenen Zustand $\tau_{ex,open}$ kann in Analogie zum Eyring-Formalismus ausgedrückt werden durch

Gleichung 2-14

$$\tau_{ex,open} = \frac{1}{k_{ex,open}} = \frac{h}{k_B T} \exp\left(\frac{\Delta G_{TR}}{RT}\right)$$

Durch Einsetzen von Gleichung 2-13 und Gleichung 2-14 in Gleichung 2-12 erhält man einen Ausdruck für die Austauschreaktionsrate k_{ex}

Gleichung 2-15

$$k_{ex} = \frac{1}{\frac{h}{k_B T} \exp\left(\frac{\Delta G_{TR}}{RT}\right) \left(1 + \exp\left(\frac{\Delta G_{diss}}{RT}\right)\right)}$$

Durch Substitution von ΔG_{diss} und ΔG_{TR} in Gleichung 2-15 durch die entsprechenden Gibbs-Helmholtz Gleichungen

Gleichung 2-16

$$\Delta G_{diss} = \Delta H_{diss} - T \Delta S_{diss}$$

Gleichung 2-17

$$\Delta G_{TR} = \Delta H_{TR} - T \Delta S_{TR}$$

erhält man Gleichung 2-18. Diese Gleichung beschreibt die Abhängigkeit der Austauschrate k_{ex} von der Temperatur T , der Enthalpieänderung ΔH_{diss} und der Entropieänderung ΔS_{diss} (Differenz zwischen geschlossenem und offenem Zustand der Nukleobase) sowie der Enthalpie- und Entropiewerte der Austauschreaktion ΔH_{TR} und ΔS_{TR} , die von Austauschmessungen an UTP und GTP Proben abgeleitet wurden.

Gleichung 2-18

$$k_{ex} = \frac{1}{\frac{h}{k_B T} \exp\left(\frac{\Delta H_{TR} - T \Delta S_{TR}}{RT}\right) \left(1 + \exp\left(\frac{\Delta H_{diss} - T \Delta S_{diss}}{RT}\right)\right)}$$

Bezüglich der Sensitivität ist die *Inversion Recovery* Methode anderen Methoden zur Austauschratenbestimmung überlegen. Allerdings hat diese Methode den Nachteil, dass sie anfälliger für Artefakte ist, die durch dipolare Kreuzrelaxation entstehen. Diese Artefakte führen zu einer Überschätzung der Austauschrate, da der

Magnetisierungstransfer durch Kreuzrelaxation während der Analyse nicht berücksichtigt wird. Allerdings erlaubt die Temperaturabhängigkeit der Austauschraten die Artefakte von den reinen Austauschraten zu separieren. Die Trennung ist möglich, da Kreuzrelaxationseffekte für große Makromoleküle entweder keine oder eine gering negative Temperaturabhängigkeit zeigen. Im Gegensatz dazu zeigen die reinen Austauschraten eine stark positive Temperaturabhängigkeit. Deshalb ist es möglich, die Kreuzrelaxationsartefakte durch Einführung eines Parameters d in Gleichung 2-19 zu berücksichtigen.

Gleichung 2-19

$$k_{ex}(T) = k_{ex,c}(T) + d(T) = \frac{1}{\frac{h}{k_B T} \exp\left(\frac{\Delta H_{TR} - T\Delta S_{TR}}{RT}\right) \left(1 + \exp\left(\frac{\Delta H_{diss} - T\Delta S_{diss}}{RT}\right)\right)} + d(T)$$

Die Gleichung 2-19 wurde dazu verwendet, die Temperaturabhängigkeit der Iminoprotonenaustauschraten $k_{ex}(T)$ von Nukleobasen innerhalb eines RNA-Oligonukleotids zu fitten. In Gleichung 2-19 ist T die Temperatur in Kelvin, $k_{ex,c}(T)$ die korrigierte Iminoprotonenaustauschraten ohne NOE-Beiträge, h die Planck-Konstante und k_B die Boltzmann-Konstante. ΔH_{TR} und ΔS_{TR} beschreiben den Übergangszustand der Iminoprotonenaustauschreaktion von der Nukleobase im offenen Zustand zum Wasser. Diese Parameter wurden experimentell bestimmt (siehe Abschnitte 2.2.7 und 2.3.3). Die entsprechenden ΔH_{TR} und ΔS_{TR} Werte für Uridin und Guanodin sind in Tabelle 2-3 angegeben. ΔH_{diss} und ΔS_{diss} sind die Enthalpie- und Entropiedifferenzen zwischen der geschlossenen und der offenen Konformation der Nukleobase innerhalb der RNA. ΔH_{diss} , ΔS_{diss} und d werden während der Fittingprozedur entsprechend angepasst, um die Differenz zwischen Datenpunkten und gefitteter Kurve zu minimieren. $\Delta G_{diss}(T)$ kann über Gleichung 2-16 berechnet werden.

Unter der Annahme, dass die RNA keine großen strukturellen Veränderungen durch Erwärmung erfährt, kann die Temperaturabhängigkeit des Faktors d in Gleichung 2-19, welcher die NOE-Beiträge beim Magnetisierungstransfer erfasst, berechnet

werden. Strukturelle Änderungen der RNA, ausgelöst durch Erhitzen der RNA-Probe, würden große Änderungen der chemischen Verschiebungen nach sich ziehen. Außerdem würden Änderungen in der Struktur auch Änderungen der thermodynamischen Parameter ΔH_{diss} , ΔS_{diss} und ΔG_{diss} bewirken. Dies würde bedeuten, dass die Temperaturabhängigkeit der Austauschraten $k_{ex}(T)$ nicht mehr mit Hilfe einer Drei-Parameter-Gleichung (Gleichung 2-19) beschrieben werden könnte. So lange also keine großen temperaturabhängigen Änderungen der chemischen Verschiebung zu beobachten sind und die $k_{ex}(T)$ Kurven mit Gleichung 2-19 beschrieben werden können, ist davon auszugehen, dass die RNA-Struktur keinen größeren temperaturabhängigen strukturellen Änderungen unterliegt.

Bei größeren Molekülen sind die NOE-Beiträge, die durch den Parameter d in Gleichung 2-19 erfasst werden, abhängig von der spektralen Dichte der Nullfrequenz $J(0)$, welche wiederum linear proportional zu der globalen Rotationskorrelationszeit des Moleküls τ_c ist. Die Temperaturabhängigkeit von τ_c kann mit Hilfe der bekannten Temperaturabhängigkeit der Lösungsmittelviskosität [131] berechnet werden. Daraus folgt, dass die Temperaturabhängigkeit des Parameters $d(T)$ berechnet werden kann, falls man annimmt, dass keine größeren Strukturänderungen der RNA in Abhängigkeit von der Temperatur auftreten.

Die globale Rotationskorrelationszeit τ_c ist abhängig von der Temperatur, der Viskosität des Lösungsmittels η sowie der Form des Biomakromoleküls. Die Temperaturabhängigkeit von τ_c kann durch Gleichung 2-20 beschrieben werden.

Gleichung 2-20

$$\tau_c(T) = \frac{\kappa\eta}{k_B T}$$

In Gleichung 2-20 ist T die Temperatur, η die Viskosität, κ der Formfaktor, k_B die Boltzmann-Konstante und τ_c die Rotationskorrelationszeit des Moleküls. Für ein sphärisches Molekül berechnet sich der Formfaktor κ nach Gleichung 2-21

Gleichung 2-21

$$\kappa = \frac{4}{3} \pi r^3$$

wobei r dem Radius der Kugel entspricht. Die Temperaturabhängigkeit von τ_c kann entsprechend Gleichung 2-22 beschrieben werden.

Gleichung 2-22

$$\frac{\tau_c(T_1)}{\tau_c(T_2)} = \frac{\eta(T_1) * T_2}{\eta(T_2) * T_1}$$

Offensichtlich taucht der Formfaktor κ in Gleichung 2-22 nicht mehr auf, die Temperaturabhängigkeit von τ_c ist demnach formunabhängig unter der Bedingung, dass die Form über den betrachteten Temperaturbereich konstant ist. Die Temperaturabhängigkeit von d kann entsprechend Gleichung 2-23 mit Hilfe der Viskositätswerte $\eta(T)$ von Wasser [131] berechnet werden. Der resultierende $d(T)/d(283K)$ Graph ist in Abbildung 2.3 wiedergegeben.

Gleichung 2-23

$$\frac{d(T)}{d(283K)} = \frac{\tau_c(T)}{\tau_c(283K)} = \frac{\eta(T) * 283K}{\eta(283K) * T}$$

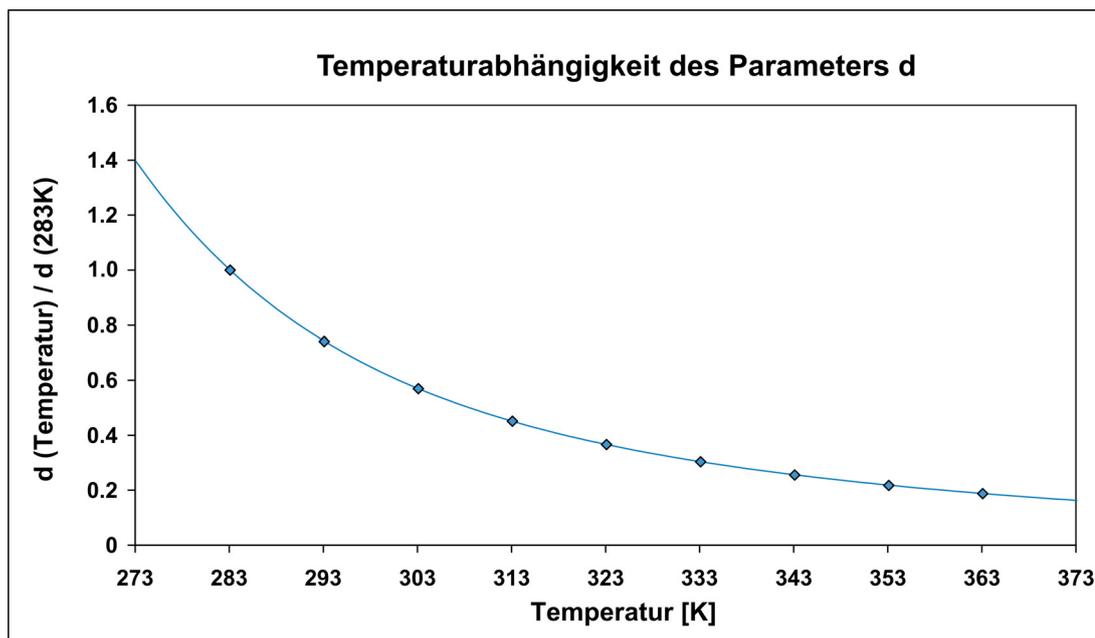


Abbildung 2.3 Temperaturabhängigkeit der NOE-Beiträge $d(T)/d(283K)$ zu den apparenten $k_{ex}(T)$ -Raten, die mit der *Inversion Recovery* Methode in wässriger Lösung bestimmt wurden.

Für die Analyse der $k_{ex}(T)$ -Abhängigkeit der Wildtyp-RNA sowie der RNA-Mutante wurde der Parameter d als temperaturinvariant angenommen (Die Verwendung von Gleichung 2-24 führte für diese beiden RNAs nicht zu signifikant unterschiedlichen Ergebnissen). Diese Näherung ist in den meisten Fällen ausreichend, um die $k_{ex}(T)$ -Kurven zu beschreiben. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass bei anderen RNAs die Temperaturabhängigkeit des Parameters d signifikant wird. Dies kann z.B. für große RNA-Moleküle, die stärkere NOEs als Konsequenz einer längeren Rotationskorrelationszeit τ_c zeigen, der Fall sein oder für RNA-Moleküle, deren Schmelzübergang weniger kooperativ ist, so dass der analysierte Temperaturbereich größer wird. In diesen Fällen kann Gleichung 2-24 verwendet werden, um die Temperaturabhängigkeit des Parameters d in den Fit zu integrieren. Eine numerische Näherung der $d(T)/d(283K)$ Datenpunkte in Abbildung 2.3 mit einer doppelten Exponentialfunktion führt zu Gleichung 2-24

Gleichung 2-24

$$d(T) = d(283K) * [a * \exp(-b * (T - 273.1K)) + c * \exp(-f * (T - 273.1K))]$$

Die Parameter müssen dabei auf folgende Werte gesetzt werden:

$$a=0.8230 \quad b=0.0505 \quad c=0.5725 \quad f=0.0129$$

Die Parameter ΔH_{diss} und ΔS_{diss} wurden für die Analyse der $k_{ex}(T)$ -Austauschraten als temperaturunabhängig angenommen. Diese Annahme scheint aus folgenden Gründen gerechtfertigt zu sein. Eine eventuelle $\Delta H_{diss}(T)$ -Abhängigkeit würde aufgrund der für Basenpaaröffnungen vorhandenen $\Delta H_{diss}(\Delta S_{diss})$ -Korrelation (Abbildung 2.18A, B) eine entsprechende $\Delta S_{diss}(T)$ -Abhängigkeit nach sich ziehen. Falls eine eventuelle $\Delta H_{diss}(T)$ -Abhängigkeit groß genug wäre, um sie zu quantifizieren, würde dies zu einer signifikanten Abweichung der $k_{ex}(T)$ -Kurve führen, die nicht durch Gleichung 2-19 beschrieben werden könnte. Im Umkehrschluss gilt, dass solange Gleichung 2-19 ausreichend ist, um die beobachtete $k_{ex}(T)$ -Abhängigkeit zu beschreiben, ΔH_{diss} und ΔS_{diss} als konstant angenommen werden können.

2.2.7 Bestimmung der Mononukleotid-Iminoprotonenaustauschraten

Iminoprotonenaustauschraten wurden an UTP- und GTP-Proben gemessen. Die Zusammensetzung der UTP-NMR-Probe war 10 mM UTP, 15 mM $K_xH_yPO_4$ (pH 6.5), 25 mM KCl, 90% H_2O und 10% D_2O . Die GTP-NMR-Probe beinhaltete 10 mM GTP, 15 mM $K_xH_yPO_4$ (pH 6.5), 25 mM KCl, 90% H_2O und 10% D_2O . Die Austauschraten wurden aus den Linienbreiten der Iminosignale der 1H -1D-Spektren, die bei Temperaturen zwischen 1-11°C aufgenommen wurden, bestimmt. Die Linienbreiten $\Delta\nu$ wurden über Dekonvolution der Iminosignale bestimmt. Hierzu wurde die Software Topspin 2.1 (Bruker) verwendet. Die Austauschraten wurden folgendermaßen berechnet.

Gleichung 2-25

$$k_{ex} = \Delta\nu * \pi - R_2 - R_{2(B0)}$$

R_2 ist die Spin-Spin-Relaxationsrate der Iminoprotonen und $R_{2(B0)}$ entspricht der Linienverbreiterung aufgrund von B_0 -Feldinhomogenitäten. Der Beitrag zur Linienbreite des Iminosignals von R_2 und $R_{2(B0)}$ wurde als vernachlässigbar klein im

Vergleich zum Beitrag von k_{ex} (>250Hz) zur Linienbreite des Iminosignals angesehen. Auf eine Abschätzung dieses Beitrags über Dekonvolution eines nicht-austauschenden Signals eines externen Standards wurde deshalb verzichtet.

2.2.8 Nachweis und Lokalisierung von Mg^{2+} -Bindestellen

2.2.8.1 Analyse der Änderungen der Chemischen Verschiebung

Werden durch Zugabe von Mg^{2+} -Ionen zu einer RNA-Probe Änderungen der chemischen Verschiebung (*Chemical shift perturbations*, CSPs) ausgelöst, lässt sich so die Existenz einer oder mehrerer Mg^{2+} -Bindestellen nachweisen. Ist die Resonanzzuordnung bekannt, so kann anhand der Signale, die CSPs aufweisen, die ungefähre Position der Bindestelle lokalisiert werden. Problematisch hierbei ist, dass nicht nur die Bindung selbst zu CSPs führt, sondern auch konformationelle Änderungen der RNA CSPs auslösen können. Sind diese Änderungen nicht nur lokal begrenzt, kann dies unter Umständen dazu führen, dass NMR-aktive Kerne, die weit von der Mg^{2+} -Bindestelle entfernt sind, ebenfalls CSPs aufweisen. Besitzt eine RNA zusätzlich auch noch mehr als eine Bindestelle, kann die Unterscheidung zwischen direkter Mg^{2+} -Bindung und konformationeller Änderung aufgrund von Mg^{2+} -Bindung schwierig werden.

Über die Analyse von CSPs können nicht nur Aussagen über Existenz und Lokalisation von Mg^{2+} -Bindestellen, sondern auch über die Stärke der Mg^{2+} -Bindung gemacht werden. Da Assoziation und Dissoziation der Mg^{2+} -Bindung schnell auf der NMR-Zeitskala sind, kann die Verschiebung der Signale mit der Mg^{2+} -Konzentration in Beziehung gesetzt werden. Dieser Zusammenhang lässt sich mit Gleichung 2-26 beschreiben.

Gleichung 2-26

$$f(x) = \frac{b}{2} * \left[(x+1+a) - \sqrt{((x+1+a)^2 - 4x)} \right]$$

Hierbei ist $f(x)$ die jeweilige CSP bei dazugehörigem $x = [Mg^{2+}]/[RNA]$ Konzentrationsverhältnis. Die Parameter a und b werden entsprechend variiert, um

die Datenpunkte an die Funktion anzupassen, wobei a das Verhältnis von Dissoziationskonstante (K_D) und RNA-Konzentration $[RNA]$ und b den maximalen CSP bei unendlicher Mg^{2+} -Konzentration [133] darstellen.

Die Mg^{2+} -Bindestellen wurden über die während der Mg^{2+} -Titration detektierten CSPs der Iminogruppen im $[^1H, ^{15}N]$ -HSQC analysiert. Die CSPs der ^{15}N -Kerne und der 1H -Kerne wurden über Gleichung 2-27 in Beziehung gesetzt [134].

Gleichung 2-27

$$CSP = \sqrt{((CSP_H)^2 + (CSP_N / 5)^2) / 2}$$

Die sich daraus ergebenden CSPs wurden mit Gleichung 2-26 gefittet.

Die Mg^{2+} -Titration wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt. Die NMR-Probe der ^{15}N markierten 4U-hp2-wt RNA beinhaltete 200 μM RNA, 15 mM $K_xH_yPO_4$ (pH6.5), 25 mM KCl, 90% H_2O und 10% D_2O . Die Messungen wurden bei einem B_0 -Feld von 900 MHz und einer Temperatur von 10°C durchgeführt. Es wurden $[^1H, ^{15}N]$ -HSQC-Spektren bei folgenden $MgCl_2$ -Konzentrationen aufgenommen: 0 μM , 100 μM , 300 μM , 500 μM , 700 μM , 1000 μM , 1500 μM , 2000 μM , 2500 μM , 3000 μM , 4000 μM , 5000 μM , 7000 μM . Die sich dabei ergebenden CSPs für die einzelnen Iminosignale wurden nach Gleichung 2-27 berechnet, gegen das $[Mg^{2+}]/[RNA]$ -Konzentrationsverhältnis aufgetragen und mit der Software SigmaPlot 10.0 anhand Gleichung 2-26 gefittet.

2.2.8.2 Linienverbreiterung durch paramagnetische Ionen

Die durch Zugabe paramagnetischer Ionen zu einer RNA-Probe ausgelöste Linienverbreiterung (PRE) der NMR-Signale kann dazu verwendet werden, Metallionenbindestellen innerhalb der RNA zu identifizieren und zu lokalisieren. Als paramagnetisches Ion wird hierbei oft Mn^{2+} eingesetzt, wobei davon ausgegangen wird, dass Mg^{2+} durch Mn^{2+} substituiert werden kann, also eine Mg^{2+} -Bindestelle auch gleichzeitig eine Mn^{2+} -Bindestelle darstellt.

Für den Fall, dass kein Fermi-Kontakt zwischen ungepaartem Elektronenspin S und Kernspin I besteht, wird die Hyperfeinkopplung $A=0$. Dies ist im Allgemeinen der Fall, wenn das ungepaarte Elektron und der Kernspin nicht über skalare Kopplungen miteinander verknüpft sind. Dieser Fall ist für paramagnetische Ionen, die nicht-kovalente Wechselwirkungen mit RNA eingehen, gegeben. In diesem Fall lässt sich die durch das ungepaarte Elektron ausgelöste R_2 -Relaxation des Kernspins mit Gleichung 2-28 beschreiben.

Gleichung 2-28

$$R_{2e}^{Solomon} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{S(S+1)\gamma_I^2 g^2 \mu_B^2}{15r^6} \left(4\tau_c + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{13\tau_c}{1 + \omega_S^2 \tau_c^2} \right)$$

Dabei ist S der Elektronenspin, μ_0 die magnetische Feldkonstante, γ_I das gyromagnetische Verhältnis, g der g-Faktor des Elektrons, μ_B das Bohrsche Magneton, r die Distanz zwischen Kern und Elektron, ω_I die Larmor-Frequenz des Kernspins, ω_S die Larmor-Frequenz des Elektrons und τ_c ist die Korrelationszeit der dipolaren Interaktion. Sie berechnet sich nach Gleichung 2-29.

Gleichung 2-29

$$\left(\frac{1}{\tau_c} \right)^{Dipol} = \frac{1}{\tau_r} + \frac{1}{T_{1e}} + \frac{1}{\tau_M}$$

In Gleichung 2-29 ist τ_r die Rotationskorrelationszeit des RNA-Metallion-Komplexes, T_{1e} die Spin-Gitter-Relaxationszeit des Elektrons und τ_M ist die Korrelationszeit des chemischen Austauschs, falls vorhanden. Im Falle von Mn^{2+} liegt T_{1e} und τ_r in etwa auf der gleichen Zeitskala von 1-10 ns. Für andere Radikale ist T_{1e} wesentlich kürzer. In diesen Fällen ist R_{2e} unabhängig von der Rotationskorrelationszeit τ_r .

Bei hohen B_0 -Feldstärken kann ebenfalls die Curie-Spinrelaxation einen Beitrag zur R_{2e} -Relaxation liefern. Die Curie-Spinrelaxation ist besonders dann groß im Vergleich zur Solomon-Spinrelaxation, wenn T_{1e} wesentlich kürzer als τ_r ist, da die

Curie-Spinrelaxation nicht von τ_c , sondern nur von τ_r abhängig ist. Die Curie-Spinrelaxation berechnet sich nach Gleichung 2-30.

Gleichung 2-30

$$R_{2e}^{Curie} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\omega_I^2 S^2 (S+1)^2 g^4 \mu_B^4}{5(3k_B T)^2 r^6} \left(4\tau_r + \frac{3\tau_r}{1 + \omega_I^2 \tau_r^2} \right)$$

Sowohl $R_{2e}^{Solomon}$ als auch R_{2e}^{Curie} sind proportional zu r^{-6} . Insofern kann aus dem Ausmaß der Linienverbreiterung, die durch R_{2e} ausgelöst wird, auf den Abstand r zwischen Kern und ungepaartem Elektron bzw. Mn^{2+} -Ion geschlossen werden.

Da der RNA-Metallion-Komplex eine schwache Interaktion darstellt, ist die Verweildauer des Metallions an der Bindestelle relativ kurz. Der Effekt paramagnetischer Relaxation ist für Mn^{2+} -Ionen besonders stark. Deshalb reichen substöchiometrische Mengen an Mn^{2+} -Ionen aus, um eine Linienverbreiterung herbeizuführen.

Um den PRE-Effekt zu analysieren, werden Spektren in An- bzw. Abwesenheit von Mn^{2+} -Ionen aufgenommen. Die durch die Mn^{2+} -Ionen ausgelöste Linienverbreiterung wird bestimmt, indem man die Differenz der Linienbreiten mit und ohne Mn^{2+} -Ionen errechnet. Das Problem hierbei ist, dass bei Signalen, die überlappen oder aufgrund von chemischem Austausch veränderte Linienformen aufweisen, die Linienbreite schwer zu bestimmen ist. Deshalb können zusätzlich zu der Analyse der Linienbreiten die Signalintensitäten ausgewertet werden. Die Signalintensität einer Lorentzlinie ist invers proportional zu ihrer Linienbreite und kann deshalb ebenfalls zur Analyse herangezogen werden. Außerdem gehen die Zeiten, die für den INEPT-Magnetisierungstransfer im $[^1H, ^{15}N]$ -HSQC benötigt werden in die Analyse mit ein. Die Intensität wird also durch die R_{2e} -Relaxation des Iminoprotons und des Iminostickstoffs beeinflusst.

2.2.8.3 Lokalisierung von Mg^{2+} -Bindestellen mit Hilfe von $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$

NOEs zwischen Metallionenkomplexen und RNAs können dazu verwendet werden, die Position des Metallions im RNA-Metallion Komplex zu bestimmen. Um $\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ -Bindestellen an der RNA nachzuweisen und zu lokalisieren, kann $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ (Kobalthexamin) eingesetzt werden. Kobalthexamin ähnelt in seiner Geometrie hexahydriertem Mg^{2+} . Demzufolge lässt der Nachweis einer Bindung von Kobalthexamin an die RNA, die Bindung von $\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ an der gleichen Stelle vermuten. Nicht alle Mg^{2+} -Bindestellen lassen sich mit Kobalthexamin nachweisen, z.B. ist Kobalthexamin nicht in der Lage, Mg^{2+} -Bindestellen zu identifizieren, in denen das Mg^{2+} direkt an die RNA koordiniert ist (*inner sphere* Komplex). Üblicherweise bindet Kobalthexamin aufgrund der höheren Ladung wesentlich stärker an die RNA als $\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$. Das $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ -Ion, das an die RNA gebunden ist, befindet sich gewöhnlich im schnellen Austausch mit den freien $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ -Ionen in Lösung. Der Austausch ist jedoch langsamer als die Rotationskorrelationszeit des RNA-Moleküls. Auf diese Weise werden die NOEs des gebundenen $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ auf das freie $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ in Lösung transferiert. Demzufolge sind auf dem Protonensignal des freien $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ NOEs des gebundenen $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ zu Protonen der RNA zu beobachten. Die Protonen des freien $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ befinden sich im langsamen Austausch mit den Wasserprotonen und geben deshalb ein eigenes NMR-Signal. Besonders nützlich sind die NOEs zwischen $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ und den Iminoprotonen der RNA, da die hohe Dispersion dieser Signale oft eindeutige Zuordnungen der NOEs zu bestimmten Nukleobasen erlaubt. Ist die eindeutige Zuordnung von NOEs möglich, lässt sich die Bindestelle des $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ -Ions lokalisieren.

Um die $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ -Bindestellen der 4U-hp2-wt RNA zu bestimmen, wurde ein 2D- ^1H Watergate NOESY [9, 109] bei einer Temperatur von 10°C mit einer Mischzeit von $T_m=150$ ms aufgenommen. Die Probe beinhaltete $900\ \mu\text{M}$ 4U-hp2-wt RNA (^{15}N labeled) in NMR-Puffer ($15\ \text{mM}$ $\text{K}_x\text{H}_y\text{PO}_4$ (pH6.5), $25\ \text{mM}$ KCl , 90% H_2O und 10% D_2O) und zusätzlich $5\ \text{mM}$ $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}\text{Cl}_3$. Harte Protonenpulse wurden vor der Mischzeit bei $7.5\ \text{ppm}$ und nach der Mischzeit bei $4.7\ \text{ppm}$

(Wasserresonanz) eingestrahlt. Während der t_1 -Entwicklung der ^{15}N chemischen Verschiebung wurde ein harter ^{15}N -Puls verwendet, um die ^{15}N -Resonanzen von den ^1H -Resonanzen zu entkoppeln. Die ^{15}N -Trägerfrequenz wurde auf 121 ppm gesetzt. Die Radiofrequenz-(RF)-Feldstärke betrug 5.7 kHz. Während der Signalakquisition wurde eine GARP4-Pulsfolge [110] zur Breitbandentkopplung auf dem ^{15}N -Kanal mit einer RF-Feldstärke von 1.2 kHz verwendet. Die ^{15}N -Trägerfrequenz wurde dafür auf 153 ppm gesetzt.

2.2.8.4 Die Mg^{2+} -Abhängigkeit des Schmelzpunktes T_m der RNA

Der Schmelzpunkt T_m einer RNA kann über CD-Spektroskopie analysiert werden (siehe Abschnitt 2.2.5). Untersucht man den Schmelzpunkt T_m in Abhängigkeit von der MgCl_2 Konzentration, kann die freie Enthalpie ΔG_{Mg} der Mg^{2+} -Bindung an die RNA berechnet werden.

Die Mg^{2+} -Abhängigkeit des Schmelzpunktes lässt sich mit einer hyperbolen Funktion (Gleichung 2-31) beschreiben.

Gleichung 2-31

$$T_m(\text{Mg}^{2+}) = T_m^{\text{noMg}} + \frac{\Delta T_{m,\text{max}} [\text{Mg}^{2+}]}{K_{\text{Mg}} + [\text{Mg}^{2+}]}$$

Aus der Auftragung von T_m gegen die Mg^{2+} -Konzentration lassen sich durch einen Fit mit Gleichung 2-31 die Parameter $\Delta T_{m,\text{max}}$, K_{Mg} und T_m^{noMg} bestimmen. K_{Mg} ist prinzipiell temperaturabhängig. Ersetzt man die Dissoziationskonstante K_{Mg} durch den entsprechenden Term der freien Enthalpie der Mg^{2+} -Bindung (Gibbs-Helmholtz-Gleichung), so ergibt sich Gleichung 2-32.

Gleichung 2-32

$$T_m(\text{Mg}^{2+}) = T_m^{\text{noMg}} + \frac{\Delta T_{m,\text{max}} [\text{Mg}^{2+}]}{\exp(\Delta G_{\text{Mg}} / RT) + [\text{Mg}^{2+}]}$$

Die Dissoziationskonstante K_{Mg} ist abhängig von der Temperatur. Da die Temperaturabhängigkeit des Schmelzpunktes jedoch relativ gering ist, kann T näherungsweise als konstant angenommen werden. Bei der Auswertung wurde ein konstanter Wert von $T = T_m^{noMg} + \Delta T_{m,max} / 2$ verwendet. Die freie Enthalpie der Mg^{2+} -Bindung ΔG_{Mg} an die RNA wird für den betrachteten Temperaturbereich als temperaturunabhängig angenommen.

2.3 Ergebnisse und Diskussion

2.3.1 Probenpräparation

Mittels denaturierender PAA-Gelelektrophorese wurde die Transkription der 4U-hp2-wt RNA (Abbildung 2.4A) bzw. der 4U-A8C-mut RNA (Abbildung 2.4B) überprüft. Die Gele weisen jeweils eine definierte Bande auf, die jeweils dem erwünschten 36mer (der 4U-hp2-wt bzw. 4U-A8C-mut) zuzuordnen ist. Die Transkriptionen lieferten demnach jeweils RNAs der richtigen Länge (36mer). Die definierten Banden weisen auf hohe Homogenitäten der transkribierten RNAs bezüglich ihrer Längen hin.

Native Gelelektrophorese wurde verwendet, um zu überprüfen, dass die aufgereinigten RNA-Proben in einer jeweils homogenen monomeren Konformation vorliegen (Abbildung 2.4C, D, E, F). Es konnte gezeigt werden, dass dies nach der Rückfaltung für die Wildtyp-RNA (Abbildung 2.4C) und die Mutanten-RNA (Abbildung 2.4E) der Fall ist.

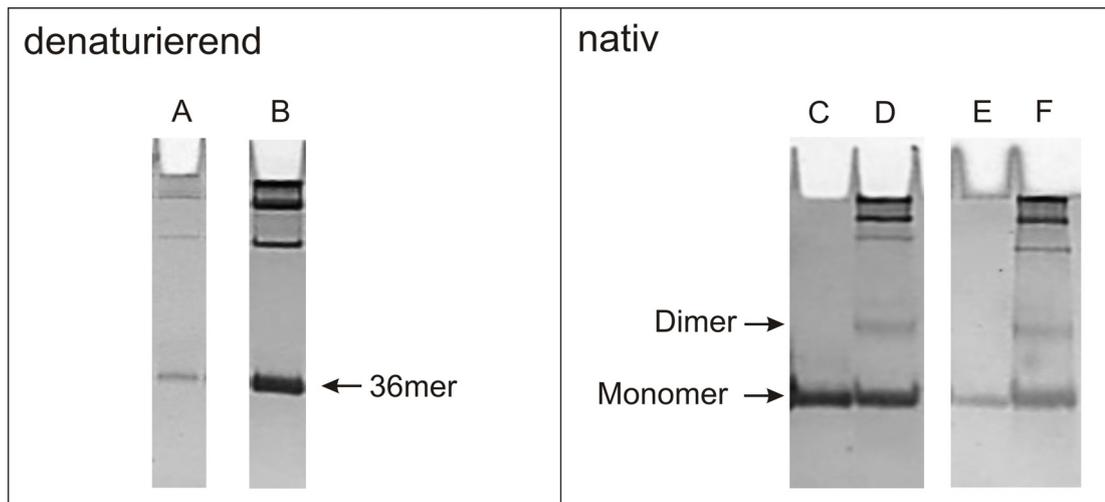


Abbildung 2.4 (A, B) denaturierende 15% PAA-Gelelektrophorese der (A) 4U-hp2-wt RNA (B) der 4U-A8C-mut RNA (C, D, E, F) native 15% PAA-Gelelektrophorese (C) aufgereinigte 4U-hp2-wt RNA, rückgefaltet (D) 4U-hp2-wt RNA direkt nach der T7-RNA-Polymerase *in vitro* Transkription (E) aufgereinigte 4U-hp2-A8C-mut RNA, rückgefaltet (F) 4U-hp2-A8C-mut RNA direkt nach der T7-RNA-Polymerase *in vitro* Transkription

2.3.2 NMR-Resonanzzuordnung

2.3.2.1 NMR-Resonanzzuordnung Iminprotonen

Mittels zwei- und dreidimensionaler NMR-Spektroskopie konnten die Iminresonanzen zugeordnet werden (Abbildung 2.5). Die Iminoregion im [^1H , ^{15}N]-HSQC sowie die Diagonalsignale im HNN-COSY sind gut aufgelöst und die meisten Signale haben ähnliche Linienformen und Intensitäten. Eine Ausnahme stellt allerdings das G30-Signal dar, welches breiter und schwächer als die restlichen Signale erscheint. In unmittelbarer Nähe zu diesem Signal treten eine Reihe weiterer nicht zuzuordnender Signale auf, die möglicherweise zu weiteren G30-Unterpopulationen gehören. Die Resonanzen G27 und G28 sind nicht aufgelöst. Hochfeld von der ^{15}N -Resonanz von G14 existieren vier weitere kleine Signale, die alle G3 zugeordnet werden können und höchstwahrscheinlich durch konformationelle Heterogenität entweder des 5'-Endes oder des 3'-Endes erklärt werden können. Die Zuordnung der NMR-Signale ist konsistent mit der

Sekundärstruktur, die von Waldminghaus et al. auf der Basis von *in silico* Vorhersagen in Kombination mit enzymatischen „*Probing*“-Experimenten berichtet wurde [91]. Das A7-U32 Basenpaar, das sich in direkter Nachbarschaft zum AG *mismatch* befindet sowie das abschließende Basenpaar vor dem *loop* U17-A22 geben keine Iminosignale. Diese Basenpaare sind folglich entweder nicht vorhanden oder haben eine reduzierte Stabilität. Ähnlich wie bei der Wildtyp-RNA zeigt auch die Iminoregion der 4U-hp2-A8C Mutante gut aufgelöste und scharfe Signale von gleicher Stärke und Intensität, die alle eindeutig zugeordnet werden können. Im Gegensatz zur Wildtyp-RNA ist die G31-Nukleobase in der Mutante basengepaart mit C8.

Erwartungsgemäß taucht im [$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$]-HSQC-Spektrum (Iminoregion) der Mutante ein Signal auf, das eindeutig der Nukleobase G31 zugeordnet werden kann. Außerdem ist im [$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$]-HSQC-Spektrum der Mutante das Signal der benachbarten Nukleobase U32 ebenfalls sichtbar. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wird das Signal der zweiten benachbarten Nukleobase G30 ebenfalls schmaler und stärker. Zusammenfassend lässt sich demnach sagen, dass das Basenpaar C8-G31 in der Mutanten-RNA die benachbarten Basenpaare C9-G30 und A7-U32 stabilisiert. Dieser stabilisierende Effekt erklärt den reprimierten Phänotyp der entsprechenden A29C-Mutante (A29C-Mutation der Volle-Länge-RNA entspricht der A8C-Mutation der 4U-hp2 RNA) *in vivo* [91]. Die chemischen Verschiebungen der Iminoprotonen der Wildtyp-RNA und der Mutanten-RNA sind in Tabelle 2-2 wiedergegeben.

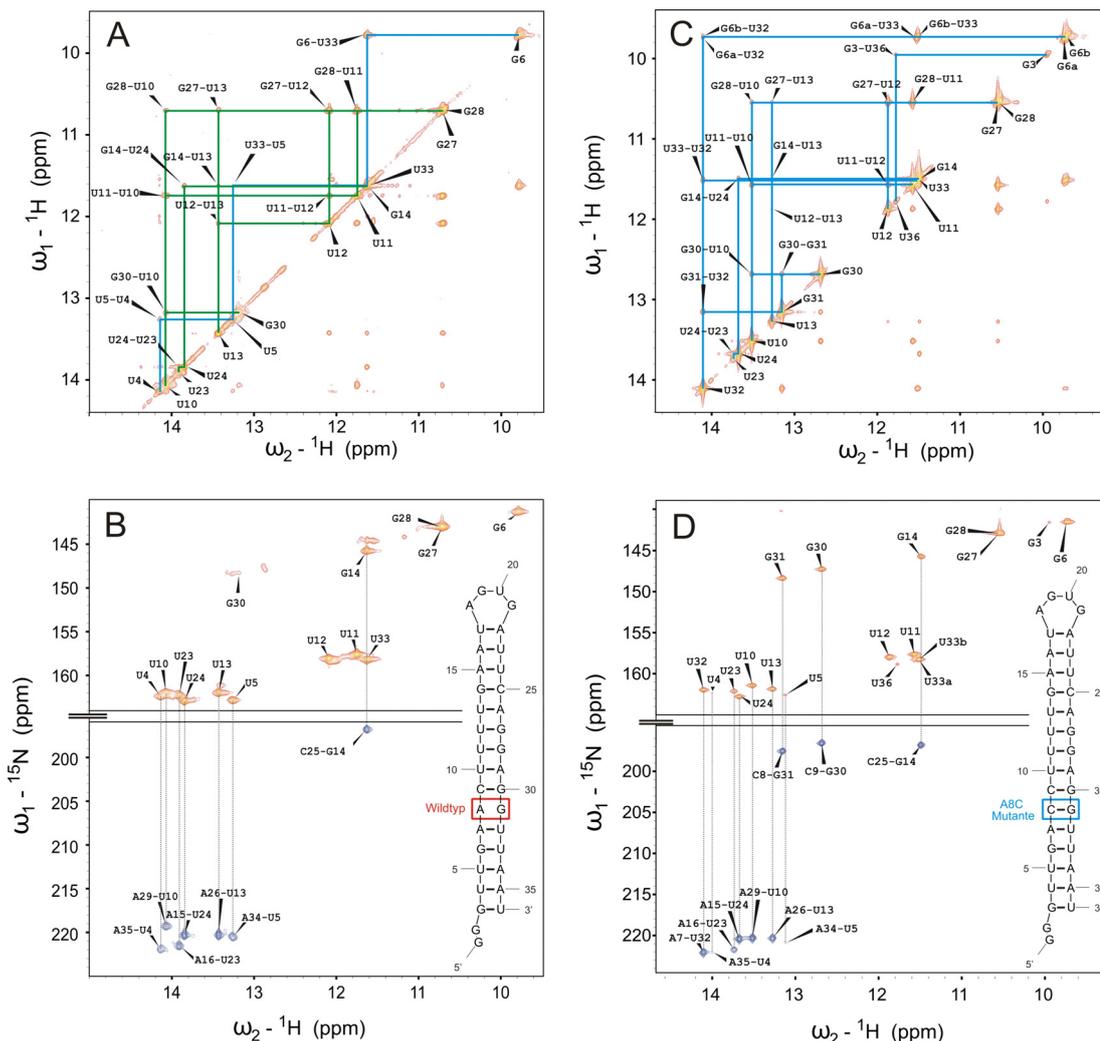


Abbildung 2.5 (A) Iminoregion des ^1H - ^1H -NOESY-Spektrums aufgenommen an einer 4U-hp2-wt RNA-Probe ($c=0.7$ mM) mit einer Mischzeit T_m von 150 ms. Zwei sequentielle Zuordnungspfade sind mit blauen (U4-G6) und grünen (G30-U23) Linien dargestellt. Die Zuordnung von Kreuz- und Diagonalsignalen ist in schwarz wiedergegeben. (B) HNN-COSY-Spektrum der 4U-hp2-wt RNA. Innerhalb des Spektrums ist zusätzlich die Sekundärstruktur der 4U-hp2-wt RNA dargestellt. Diagonalsignale sind in orange und Kreuzsignale sind in blau wiedergegeben. Diagonal- und Kreuzsignale sind über gepunktete Linien miteinander verbunden. (C) Iminoregion des ^1H - ^1H -NOESY-Spektrums aufgenommen an einer 4U-hp2-A8C Mutanten-RNA-Probe (1.1 mM) mit einer Mischzeit T_m von 150 ms. Der sequentielle Zuordnungspfad ist mit blauen Linien dargestellt. Die Zuordnung von Kreuz- und Diagonalsignalen ist in schwarz wiedergegeben. (D) HNN-COSY-Spektrum aufgenommen an einer 4U-hp2-A8C Mutanten-RNA. Innerhalb des Spektrums ist zusätzlich die Sekundärstruktur der 4U-hp2-A8C Mutanten-RNA dargestellt. Diagonalsignale sind in orange und Kreuzsignale sind in blau wiedergegeben. Diagonal- und Kreuzsignale sind über gepunktete Linien miteinander verbunden.

Tabelle 2-2 Chemische Verschiebungen der ^1H - und ^{15}N -Kerne der Iminogruppen der Nukleobasen innerhalb der 4U-hp2-wt RNA und der 4U-hp2-A8C Mutante

| Chemische Verschiebungen | ^1H | ^{15}N | ^1H | ^{15}N |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 4U-hp2 Wildtyp | 4U-hp2 Wildtyp | 4U-hp2-A8C Mutante | 4U-hp2-A8C Mutante |
| G3 | - | - | 10.074 | 141.757 |
| U4 | 14.139 | 162.441 | 14.121 | 162.454 |
| U5 | 13.258 | 162.855 | 13.243 | 162.723 |
| G6 | 9.781 | 141.354 | 9.853 | 141.714 |
| U10 | 14.070 | 161.981 | 13.641 | 161.568 |
| U11 | 11.749 | 157.634 | 11.698 | 157.774 |
| U12 | 12.086 | 158.092 | 11.998 | 158.101 |
| U13 | 13.431 | 162.029 | 13.398 | 162.026 |
| G14 | 11.626 | 145.834 | 11.616 | 145.900 |
| U17 | - | - | 13.352 | 161.144 |
| U23 | 13.909 | 162.313 | 13.861 | 162.280 |
| U24 | 13.845 | 162.931 | 13.799 | 162.920 |
| G27/G28 | 10.706 | 143.050 | 10.668 | 143.077 |
| G30 | 13.182 | 148.356 | 12.808 | 147.408 |
| G31 | - | - | 13.279 | 148.534 |
| U32 | - | - | 14.230 | 162.128 |
| U33 | 11.625 | 158.181 | 11.641 | 158.401 |
| U36 | - | - | 11.902 | 158.997 |

2.3.2.2 Resonanzzuordnung aller NMR-aktiver Kerne der 4U-hp2-wt RNA

Abbildung 2.7 gibt eine Übersicht über ^1H -, ^{13}C -, und ^{15}N -Resonanzen der 4U-hp2-wt RNA, die über die in Abschnitt 2.2.1.2 beschriebene Vorgehensweise zugeordnet werden konnten. Eine Auflistung der an den verschiedenen isotoopenmarkierten 4U-hp2-wt RNA-Proben durchgeführten Experimente inklusive der jeweiligen Akquisitions- und Prozessierungsparameter findet sich im Anhang dieser Arbeit (Abschnitt 7.2). Die chemischen Verschiebungen der zugeordneten ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -Resonanzen der 4U-hp2-wt RNA sind in Tabelle 7-1 für die Resonanzen der Nucleobasen und in Tabelle 7-2 für die Resonanzen der Ribosesysteme zusammengefasst.

Abbildung 2.6A zeigt die zugeordneten N3-H3 (Uracil)- und N1-H1 (Guanin)-Resonanzen. Die Ergebnisse der Resonanzzuordnung der Iminogruppen werden in Abschnitt 2.3.2.1 dieser Arbeit diskutiert. Abbildung 2.6B zeigt die Pyrimidin-Nucleobasen (Uracil, Cytosin) der 4U-hp2-wt RNA, deren C5-H5-Signale zugeordnet werden konnten in blau. Es konnten alle C5-H5-Resonanzpaare mit Ausnahme von U32, U4 und U36 eindeutig zugeordnet werden. Problematisch bei der Zuordnung von U4 und U36 ist die zu beobachtende konformationelle Heterogenität der Nucleotide an den Enden der RNA. Die Zuordnung von U32 gestaltet sich ebenfalls schwierig, da die Signale des benachbarten *mismatches* A8-G31 ebenfalls nicht zugeordnet werden konnten. Abbildung 2.6C zeigt die Adenin-Nucleobasen der 4U-hp2-wt RNA, deren C2-H2-N1-N3-Resonanzen zugeordnet werden konnten, in blau. Die Zuordnung erfolgte unter anderem mit Hilfe des neu entwickelten 3D-HNHC-Experiments und ist deshalb in Abschnitt 5.1 genauer beschrieben. Allen Adenosin-Nucleotiden mit Ausnahme von A8 (A8-G31 *mismatch*) konnten C2-H2-N1-N3-Resonanzen zugeordnet werden. In Abbildung 2.6D sind die Nucleotide, deren C6(C8)-H6(H8)-N1(9)-C1'-H1'-Resonanzen eindeutig zugeordnet werden konnten, dargestellt. Die Zuordnung dieser Resonanzen ist fast vollständig. Es fehlt die Zuordnung der Nucleotide G1, G2, G3 und U4 am 5'-Ende der RNA, der Nucleotide A8 und G31, die den A8-G31 *mismatch* darstellen

sowie des Nukleotids U32, das sich in direkter Nachbarschaft zum *mismatch* befindet. Abbildung 2.6E zeigt, dass die Ausweitung der Zuordnung auf die C2'-H2'-Signale der Zuckersysteme ausgehend von den C1'-H1'-Signalen mit Ausnahme von G30 und A35 über die aufgenommenen 3D-HC(C)H-COSY-Experimente erfolgreich durchgeführt werden konnte. Eine weitere Ausweitung der Zuordnung auf die C3'-H3'-Signale (Abbildung 2.6F) konnte nur für einige Nukleotide erreicht werden. Für eine komplette Zuordnung der Zuckersysteme ist die zusätzliche Aufnahme von 3D-HC(C)H-TOCSY-Experimenten für die drei unterschiedlich markierten D₂O-Proben notwendig (Tabelle 2-1). Sollte dies nicht ausreichen, können zusätzlich dazu auch noch drei 3D-(H)CCH-TOCSY-Experimente aufgenommen werden. Die Aufnahme dieser Experimente sollte an einem HCP-Probenkopf erfolgen, um die vielen C-P Kopplungen und H-P Kopplungen selektiv unterdrücken zu können.

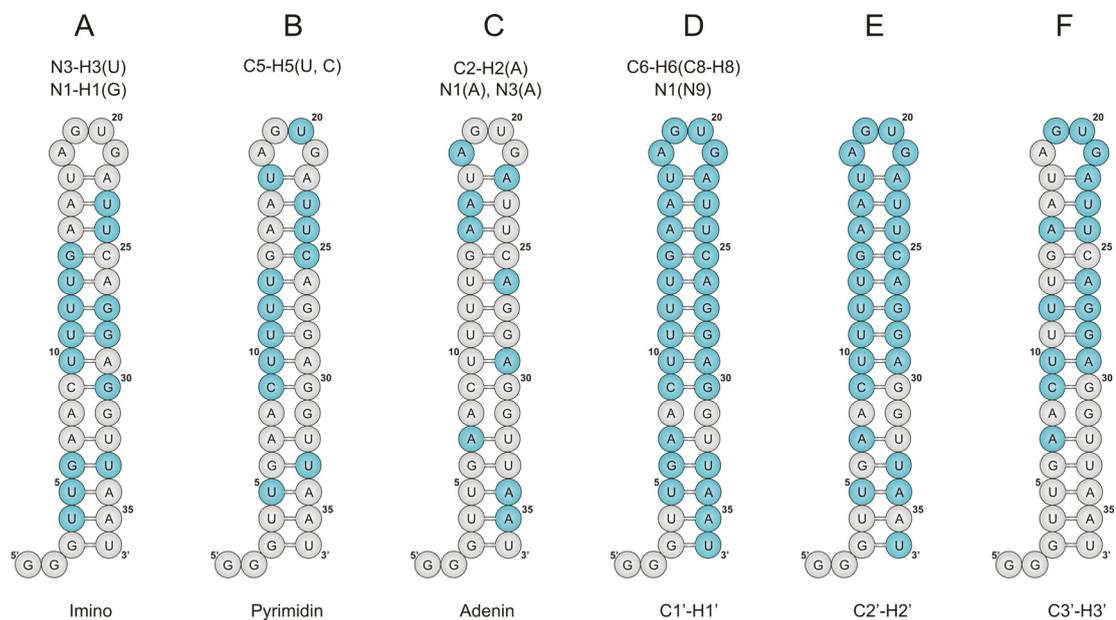


Abbildung 2.6 Schematische Darstellung zur Statistik der Resonanzzuordnung der 4U-hp2-wt RNA. Blau unterlegte Nukleotide sind zugeordnet. **(A)** Zugeordnete Iminogruppen der Uridin-(N3-H3) bzw. Guanosin-Nukleotide (N1-H1) **(B)** Zugeordnete C5-H5-Resonanzen der Pyrimidinnukleotide **(C)** Zugeordnete C2-H2-N1-N3-Resonanzen der Adenosin-Nukleotide **(D)** Zugeordnete C6-H6-N1-C1'-H1'-Resonanzen der Pyrimidinnukleotide sowie C8-H8-N9-C1'-H1'-Resonanzen der Purinnukleotide **(E)** Zugeordnete C2'-H2'-Resonanzen **(F)** Zugeordnete C3'-H3'-Resonanzen.

Die C6-H6 (Cytidin)- bzw. C8-H8 (Adenosin)-Signale des [^1H - ^{13}C]-HSQCs (Abbildung 2.7A) der Adenosin-, Cytidin-, ^{13}C -, ^{15}N -markierten 4U-hp2-wt RNA-Probe konnten fast vollständig zugeordnet werden (Probe 1, Tabelle 2-1). Das Nukleotid A34 zeigt zwei Signale, die relativ nahe nebeneinander liegen. Dies lässt auf zwei unterschiedliche Konformationen schließen, die sich in langsamem Austausch miteinander befinden oder überhaupt nicht miteinander austauschen. Neben einigen kleineren Signalen, die auf Subpopulationen bestimmter Nukleotide schließen lassen, existieren noch zwei weitere nicht zugeordnete Signale. Eines dieser Signale (Signal 1: oberhalb von A26 bzw. A18; Signal 2: unterhalb von A16) gehört möglicherweise zu A8, das andere gehört entweder ebenfalls zu A8 oder zu einer zweiten Konformation eines anderen Adenosin-Nukleotids. Das Signal von C9 ist außerordentlich schwach, was auf intermediären Austausch zwischen mindestens zwei verschiedenen Konformationen schließen lässt. Die Ursache für dieses Austauschphänomen ist höchstwahrscheinlich der benachbarte A8-G31 *mismatch*. Das Vorhandensein von intermediärem Austausch liefert auch eine Erklärung, weshalb es bislang nicht möglich war die Nukleobase A8 einem Signal zuzuordnen. Abbildung 2.7B zeigt die C2-H2-Signale des [^1H - ^{13}C]-HSQCs. Das Spektrum zeigt eine Reihe kleiner, ineinander übergehender Signale tieffeldig (^1H und ^{13}C) von A35. Diese Signale gehören höchstwahrscheinlich zu Subpopulationen von A35, deren Ursache in der konformationellen Heterogenität der RNA-Enden zu suchen ist. Eines der beiden weiteren nicht zugeordneten Signale (Signal 1: ^1H :8,066 ^{13}C : 151,82; Signal 2: ^1H :7,192/7,140 ^{13}C : 150,93/150,91) gehört höchstwahrscheinlich zu A8, während sich hinter dem anderen eine Subpopulation eines weiteren Adenosin-Nukleotids verbirgt.

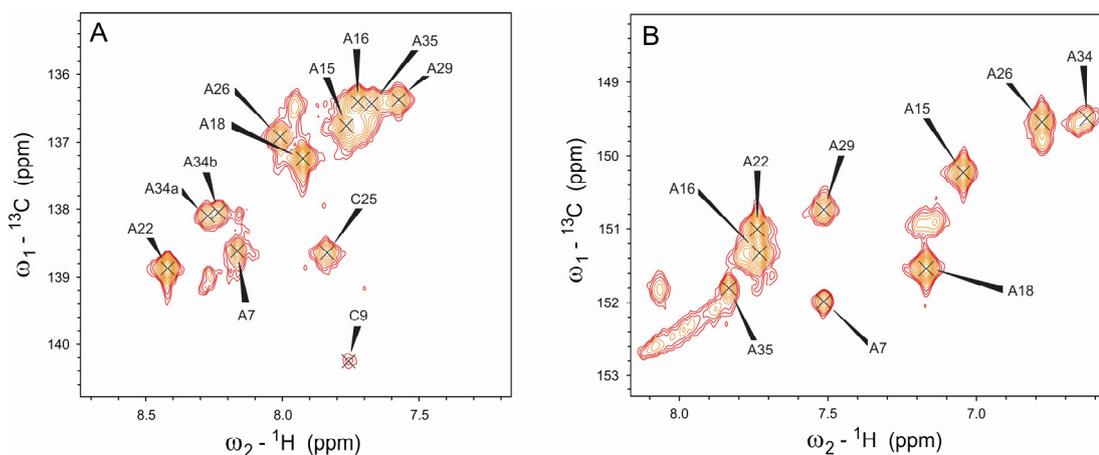


Abbildung 2.7 Aromatenregion eines $[^1\text{H},^{13}\text{C}]$ -HSQCs aufgenommen an einer Adenosin-, Cytidin- ^{13}C -, ^{15}N -markierten 4U-hp2-wt RNA-Probe (D_2O -Puffer, $c=0.7$ mM) bei einer Temperatur von 20°C . **(A)** Der Ausschnitt zeigt die C8-H8-Signale der Adenin-Nukleobasen innerhalb der 4U-hp2-wt RNA. **(B)** Der Ausschnitt zeigt die C2-H2-Signale der Adenin-Nukleobasen innerhalb der 4U-hp2-wt RNA.

Die C6-H6 (Uridin)-Signale des $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ -HSQCs (Abbildung 2.8A) der Uridin-, ^{13}C -, ^{15}N -markierten 4U-hp2-wt RNA-Probe konnten mit Ausnahme von U4 und U32 vollständig zugeordnet werden (Probe 2, Tabelle 2-1). Das Spektrum zeigt drei nicht zugeordnete Signale, die entweder zu U4, U32 oder zu Subpopulationen anderer Nukleotide gehören. Das Spektrum zeigt außerdem fünf verschiedene Signale für U36 (a-e) von denen die Konformationen a und b stärker populiert sind als die Konformationen c, d und e. Die multiplen C6-H6-Signale von U36 haben vermutlich die gleiche Ursache wie die multiplen C2-H2-Signale von A35 (Abbildung 2.7B).

Die C8-H8 (Guanosin)-Signale des $[^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ -HSQCs (Abbildung 2.8B) der Guanosin-, ^{13}C -, ^{15}N -markierten 4U-hp2-wt RNA-Probe konnten nur teilweise zugeordnet werden (Probe 4, Tabelle 2-1). Zugeordnet werden konnten die Signale der Nukleotide G6, G14, G19, G21, G27, G28 und G30, wobei für das Nukleotid G6 zwei Konformationen beobachtet werden konnten (G6a, G6b). Die Signale der Nukleotide G1, G2, G3 und G31 konnten nicht zugeordnet werden. Abbildung 2.8B zeigt jedoch wesentlich mehr als nur vier nicht zugeordnete Signale. Grund hierfür sind vermutlich multiple Konformationen von G1, G2 und G3. G31 ist Teil des A8-G31 *mismatches*. Dieser Bereich scheint intermediärem Austausch zu unterliegen

(siehe C9, Abbildung 2.7A), was zu stark verbreiterten bzw. mehreren Signalen führen kann. Der Grund für die konformationelle Heterogenität der RNA-Enden ist möglicherweise ein inhomogenes 3'-Ende der RNA, da die T7-RNA-Polymerase mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit bei der Transkription ein bis zwei zusätzliche Nukleotide einbaut. Es ist allerdings ebenso möglich, dass die verschiedenen Konformationen durch die beiden einzelsträngigen Nukleotide G1 und G2 ausgelöst werden. Die verschiedenen Konformationen des 5'- bzw. des 3'-Endes der 4U-hp2-wt RNA sind ebenfalls auf den benachbarten Nukleotiden G3 und U36 zu sehen. Um das Problem der heterogenen RNA-Enden zu umgehen, könnte der Helixstamm in diesem Bereich stabilisiert bzw. verlängert werden. Dies wäre für die Strukturbestimmung sicherlich von Vorteil. Ein solches Konstrukt würde allerdings höchstwahrscheinlich eine größere Thermostabilität im Vergleich zum Wildtyp aufweisen. Der Vorteil der 4U-hp2-wt RNA liegt also darin, dass die Veränderungen im Vergleich zur ursprünglichen Sequenz gering sind [91] und deshalb die thermische Stabilität praktisch nicht beeinflusst wird (Vergleich Abschnitt 2.3.6 mit[91]).

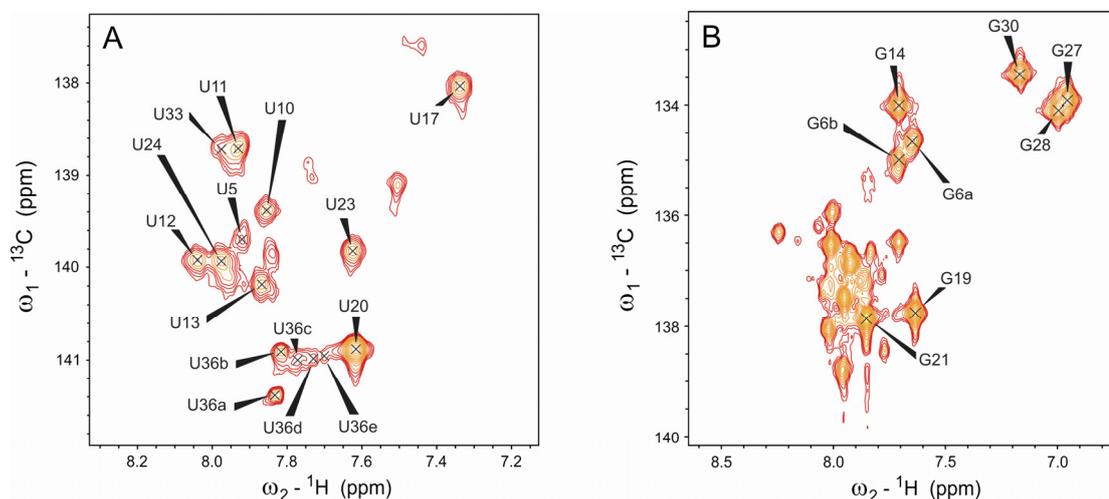


Abbildung 2.8 (A) Aromatenregion eines $[^1\text{H}, ^{13}\text{C}]$ -HSQCs aufgenommen an einer Uridin-, ^{13}C -, ^{15}N -markierten 4U-hp2-wt RNA-Probe (D_2O -Puffer, $c = 0.7 \text{ mM}$) bei einer Temperatur von 20°C . Der Ausschnitt zeigt die C6-H6-Signale der Uracil-Nukleobasen innerhalb der 4U-hp2-wt RNA. **(B)** Aromatenregion eines $[^1\text{H}, ^{13}\text{C}]$ -HSQCs aufgenommen an einer Guanosin-, ^{13}C -, ^{15}N -markierten 4U-hp2-wt RNA-Probe (D_2O -Puffer, $c = 1.0 \text{ mM}$) bei einer Temperatur von 20°C . Der Ausschnitt zeigt die C8-H8-Signale der Guanin-Nukleobasen innerhalb der 4U-hp2-wt RNA.

Abbildung 2.9 zeigt die C1'-H1'-Signale der $[^1\text{H},^{13}\text{C}]$ -CT-HSQC's der drei unterschiedlich markierten Proben (Probe1, Probe 2, Probe 4, Tabelle 2-1). Abbildung 2.9A zeigt die C1'-H1'-Signale der Uridin-Nukleotide. Obwohl allen Uridin-Nukleotiden bis auf U4 und U32 Signale zugeordnet werden konnten, sind dennoch einige nicht zugeordnete Signale vorhanden, die auf konformationelle Heterogenität der Uridin-Nukleotide schließen lässt. Interessanterweise scheint diese konformationelle Heterogenität für die C1'-H1'-Signale stärker ausgeprägt zu sein als für die C6-H6-Signale der gleichen Nukleotide. Des Weiteren sind wiederum mehrere Konformationen für das Nukleotid U36a-e zu erkennen. Auch das Nukleotid U33 besitzt zwei C1'-H1'-Signale, obwohl die Nukleobase U33 jeweils nur ein C5-H5 und ein C6-H6-Signal zeigt (Abbildung 2.8A, Tabelle 7-1). Abbildung 2.9B zeigt die C1'-H1'-Signale der Guanosin-Nukleotide. Obwohl den Guanosin-Nukleotiden G6, G14, G19, G21, G27, G28 und G30 C1'-H1'-Signale zugeordnet werden konnten, befindet sich im Spektrum eine Vielzahl von Signalen, die bislang nicht zugeordnet werden konnten.

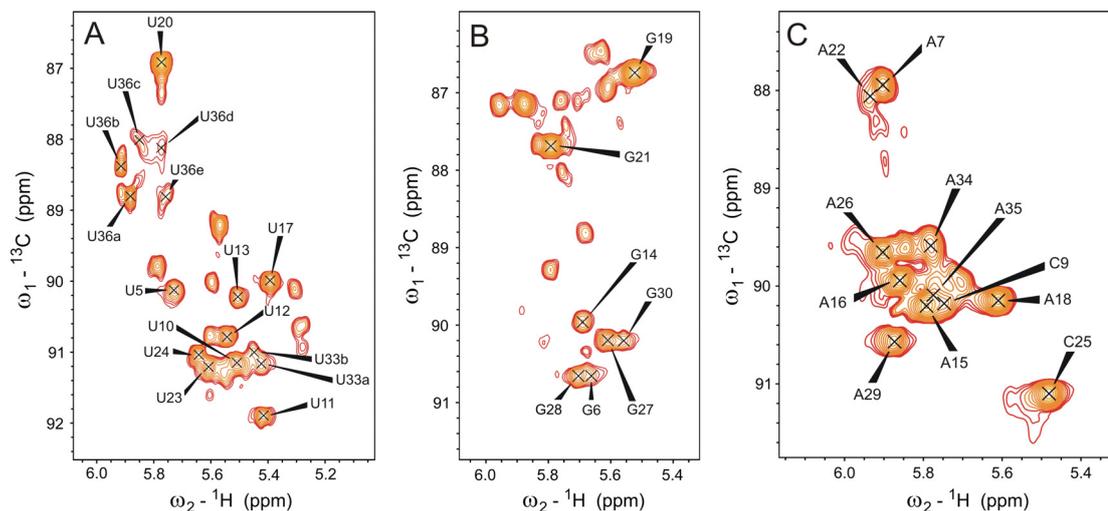


Abbildung 2.9 Ausschnitt der C1'-H1'-Zuckerregion der *constant time* $[^1\text{H},^{13}\text{C}]$ HSQC's aufgenommen bei einer Temperatur von 20°C an (A) einer Uridin-, ^{13}C -, ^{15}N -markierten 4U-hp2-wt RNA-Probe (D_2O -Puffer, $c = 0.7$ mM) (B) einer Guanosin-, ^{13}C -, ^{15}N -markierten 4U-hp2-wt RNA-Probe (D_2O -Puffer, $c = 1.0$ mM) (C) einer Adenosin-, Cytidin-, ^{13}C -, ^{15}N -markierten 4U-hp2-wt RNA-Probe (D_2O -Puffer, $c = 0.7$ mM).

Die Ursache liegt auch hier vermutlich in der konformationellen Heterogenität der Nukleotide G1, G2, G3 und G31 (wie oben diskutiert). Abbildung 2.9C zeigt die C1'-H1'-Signale der Adenosin- und Cytidin-Nukleotide. Es konnte allen Adenosin- und Cytidin-Nukleotiden mit Ausnahme von A8 ein C1'-H1'-Signal zugeordnet werden. Die Signale von A35, A15 und C9 überlappen im $[^1\text{H}, ^{13}\text{C}]$ -CT-HSQC miteinander, sind jedoch im 3D-HCN $[^1\text{H}']$ aufgelöst. Das $[^1\text{H}, ^{13}\text{C}]$ -CT-HSQC-Spektrum lässt noch zwei weitere nicht zugeordnete Signale erkennen, von denen eines vermutlich dem Nukleotid A8 zuzuordnen ist, während das zweite Ursache einer konformationellen Heterogenität eines anderen Adenosin- oder Cytidin-Nukleotids ist.

Zusammenfassend lassen sich aufgrund der Zuordnung der 4U-hp2-wt RNA folgende Aussagen treffen: Die Nukleotide U10 bis A29 konnten vollständig zugeordnet werden. Die entsprechenden zugeordneten Signale weisen auf eine definierte homogene Struktur dieses Bereichs der 4U-hp2-wt RNA hin. Im Bereich um den A8-G31 *mismatch* scheint intermediärer Austausch der Grund dafür zu sein, dass viele Signale in diesem Bereich breiter bzw. nicht vorhanden sind, was auf intermediären Austausch in diesem Bereich schließen lässt. An den Enden der RNA im Bereich des Helixstammes ist ebenfalls konformationelle Heterogenität zu beobachten. Dies betrifft die zugeordneten Nukleotide A35 und U36 und ist vermutlich der Grund für die erhöhte Anzahl an Signalen in den Spektren der Guanosin-, ^{13}C -, ^{15}N -markierten 4U-hp2-wt RNA. Die Zuordnung der Nukleotide G1, G2, G3 und U4 zu den Signalen der einzelnen Konformationen ist deshalb außerordentlich schwierig. Eine Modifikation der RNA-Sequenz, die den Helixstamm stabilisiert und in eine homogene Konformation zwingt, ist vermutlich der nächste Schritt auf dem Weg zur Strukturbestimmung der 4U-hp2-wt RNA.

Abbildung 2.10 zeigt die Iminoregion eines $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrums einer 4U-hp2-wt RNA-Probe in Anwesenheit von 5 mM $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$. Im Vergleich zu Abbildung 2.5B wird das Signal des Nukleotids G30 durch die Zugabe von Kobalthexamin deutlich stärker und ist schließlich bezüglich Linienbreite und Signalintensität von den übrigen Iminosignalen kaum zu unterscheiden. Außerdem verschwinden die kleinen Signale in direkter Nachbarschaft zu dem Signal von G30

(Abbildung 2.5B), die möglichen Subpopulationen alternativer Konformationen von G30 zugeschrieben wurden. Kobalthexamin scheint die Region um den A8-G31 *mismatch* in einer Konformation zu stabilisieren und so intermediären Austausch zu verhindern, was zu einer Verringerung der Linienbreiten, einer Erhöhung der Signalintensitäten und dem Verschwinden zusätzlicher nicht zuzuordnender Signale führt. Da 5 mM Kobalthexamin zu diesem vorteilhaften Effekt führen ist es möglich, dass hohe Mg^{2+} -Konzentrationen einen ähnlichen Effekt ausüben. Es besteht also die Möglichkeit, dass die Signale im Bereich des *mismatch* in Anwesenheit von Kobalthexamin oder hohen Mg^{2+} -Konzentrationen leichter zuzuordnen sind. Zukünftige Experimente in Anwesenheit von $MgCl_2$ oder Kobalthexamin werden zeigen, ob diese Strategie zur weiteren Zuordnung der 4U-hp2-wt RNA erfolgversprechend ist.

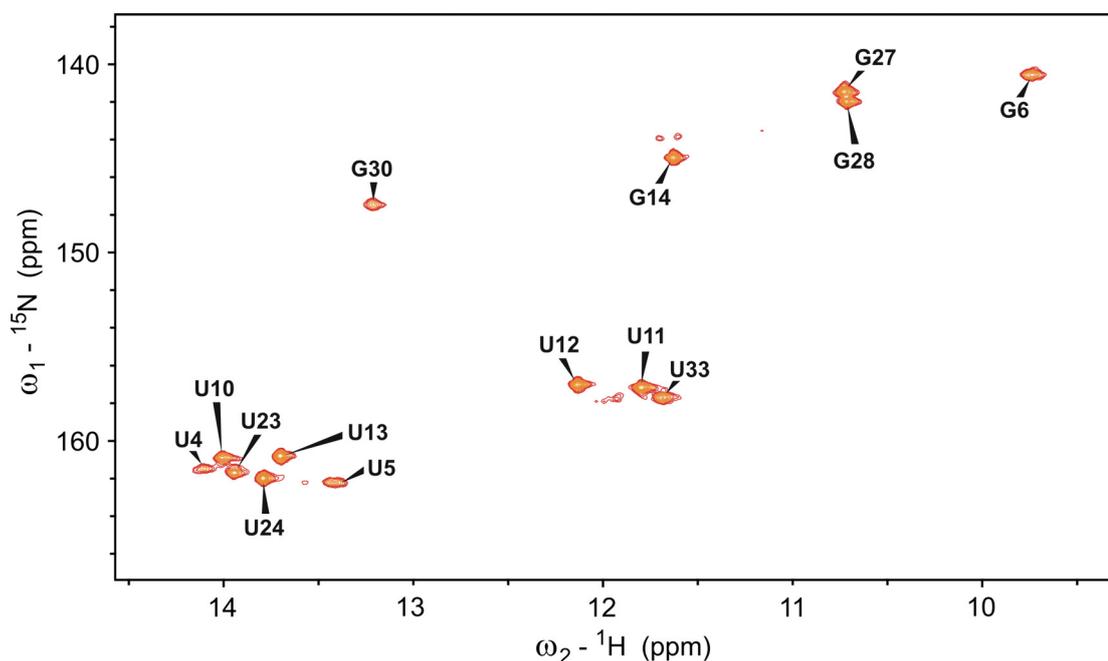


Abbildung 2.10 Iminoregion des $[^1H-^{15}N]$ -HSQC-Spektrums aufgenommen an einer 4U-hp2-wt RNA-Probe ($c = 0.9$ mM) in Anwesenheit von 5 mM $Co(NH_3)_6^{3+}$ in NMR-Puffer (25mM KCl, 15 mM $K_xH_yPO_4$, pH 6,5) bei einer Temperatur von 10°C.

2.3.3 Temperaturabhängige Austauschraten der offenen Konformation

Um die thermodynamischen Parameter ΔG_{TR} , ΔH_{TR} und ΔS_{TR} zu bestimmen, wurden die Temperaturabhängigkeiten der Iminoprotonenaustauschraten von UTP- (Abbildung 2.11A) und GTP-NMR-Proben bestimmt und analysiert. Über eine Eyring-Analyse der Temperaturabhängigkeit der Austauschraten (Abbildung 2.11B) wurden die thermodynamischen Parameter des Übergangszustands (TR) für den Protonenübergang von der Iminogruppe zum H_2O entsprechend Gleichung 2-8 und Gleichung 2-9 bestimmt (2.2.7, Seite 2-44). Die ermittelten Werte für ΔG_{TR} , ΔH_{TR} und $T^*\Delta S_{\text{TR}}$ sind in Tabelle 2-3 zusammengefasst. Es wurde angenommen, dass die extrahierten ΔG_{TR} , ΔH_{TR} und $T^*\Delta S_{\text{TR}}$ Werte den Übergangszuständen von Guanin- und Uracil-Nukleobasen in RNA-Molekülen in der offenen Konformation entsprechen (siehe Energiediagramm Abbildung 2.2A, Seite 2-23). Die ΔG_{TR} -, ΔH_{TR} - und $T^*\Delta S_{\text{TR}}$ -Werte aus Tabelle 2-3 wurden verwendet, um die ΔG_{diss} -, ΔH_{diss} - und $T^*\Delta S_{\text{diss}}$ -Werte der einzelnen Basenpaaröffnungen entsprechend Gleichung 2-19 zu berechnen (Abschnitt 2.2.6, Seite 2-35).

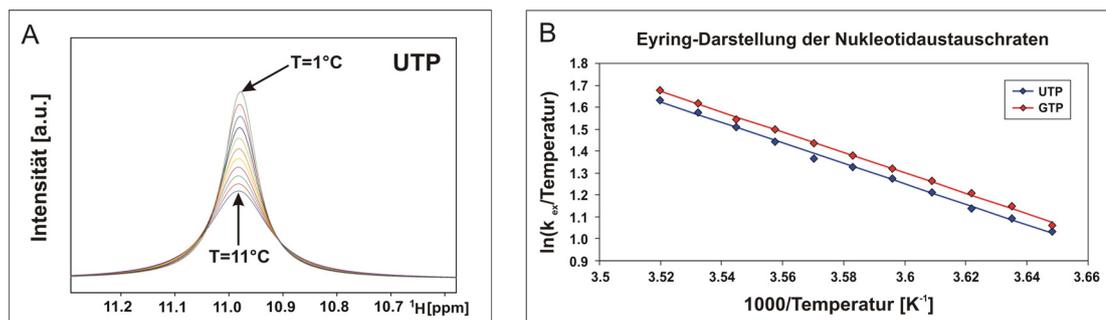


Abbildung 2.11 (A) Iminoprotonenregion mehrerer ^1H -1D-Spektren aufgenommen an einer UTP-Probe bei Temperaturen im Bereich 1-11°C. Probenzusammensetzung: 10 mM UTP, 15 mM $\text{K}_x\text{H}_y\text{PO}_4$ (pH 6.5), 25 mM KCl, 90% H_2O und 10% D_2O **(B)** Eyring-Darstellung der Temperaturabhängigkeit der Iminoprotonenaustauschraten k_{ex} für UTP (blau) und GTP (rot) in NMR-Puffer (Zusammensetzung: siehe 2.2.7).

Tabelle 2-3 Thermodynamische Parameter des Übergangszustands der Iminoprotonenaustauschreaktion von UTP und GTP. Die angegebenen Werte sind bereits nach Gleichung 2-9 diffusionskorrigiert.

| | GTP [kJ/mol] | UTP [kJ/mol] |
|---------------------------------------|-------------------|-------------------|
| ΔH_{TR} | 38.58 ± 0.54 | 38.79 ± 0.64 |
| $T\Delta S_{TR} (T=20^\circ\text{C})$ | -14.65 ± 1.14 | -14.57 ± 1.34 |
| $\Delta G_{TR} (T=20^\circ\text{C})$ | 53.23 ± 1.26 | 53.36 ± 1.49 |

2.3.4 Bestimmung der Iminoprotonenaustauschraten und deren Temperaturabhängigkeit mittels NMR-Spektroskopie

Die Iminoprotonenaustauschraten k_{ex} wurden für beide RNAs über die *Inversion Recovery* Methode bestimmt (siehe Seite 2-30). Abbildung 2.12A und B zeigen exemplarisch 2D-Schnitte eines Pseudo-3D-*Inversion Recovery* Experiments aufgenommen bei einer Temperatur von 20°C an einer Wildtyp-RNA-Probe. Bei kürzeren Mischzeiten T_m (2ms) haben alle Iminosignale gleiches Vorzeichen, während bei längeren Mischzeiten (75ms) auch negative Signale beobachtet werden können. Die Datenpunkte (Signalintensitäten in Abhängigkeit der Mischzeit, $I(\tau_m)$) wurden mit Gleichung 2-7 gefittet, um die Iminoprotonenaustauschraten k_{ex} der einzelnen Nukleobasen zu bestimmen (Abbildung 2.12). Eine höhere Austauschrate führt dazu, dass das Minimum der $I(\tau_m)$ -Kurve stärker ausgeprägt ist und zu kleineren τ_m -Werten hin verschoben ist. Die k_{ex} -Werte der einzelnen Nukleobasen zeigen eine charakteristische Temperaturabhängigkeit. Für jede einzelne Nukleobase wurde die Temperaturabhängigkeit der Austauschraten k_{ex} mit Gleichung 2-19 gefittet (Abbildung 2.12D: durchgezogene Linien), um Informationen über Basenpaarstabilitäten innerhalb der RNA-Helix zu erhalten. Tabelle 2-4 (Wildtyp-RNA) und Tabelle 2-5 (Mutanten-RNA) enthalten Informationen über die resultierenden thermodynamischen Parameter ΔG_{diss} , ΔH_{diss} und ΔS_{diss} für die jeweiligen Basenpaaröffnungen.

Bei einigen Nukleobasen konnten bei höheren Temperaturen Abweichungen von $k_{ex}(T)$ von Gleichung 2-19 beobachtet werden. Die Ursache dieser Abweichungen ist jedoch schwer zu bestimmen. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass diese Effekte durch temperaturabhängige Änderungen der gefalteten RNA-Struktur hervorgerufen

werden. Eine weitere mögliche Interpretation ist, dass kooperative Effekte die Austauschraten bei hohen Temperaturen beschleunigen. Mit anderen Worten, die Annahme, dass die einzelnen Basenpaaröffnungsereignisse unkorreliert stattfinden, ist bei Temperaturen knapp unterhalb des Schmelzpunktes der RNA möglicherweise nicht mehr erfüllt. Dass Abweichungen durch Änderungen des offenen Zustands hervorgerufen werden, ist unwahrscheinlich, aber kann nicht ausgeschlossen werden. Prinzipiell können diese Abweichungen der $k_{ex}(T)$ -Kurven natürlich ebenfalls analysiert werden, um die oben genannten Effekte genauer zu untersuchen. Allerdings wären für ein komplizierteres Modell (mehr als drei Parameter) wesentlich mehr Datenpunkte, insbesondere in dem Bereich, in dem die Abweichungen auftreten, notwendig. Deshalb wurden nur Nukleobasen analysiert,

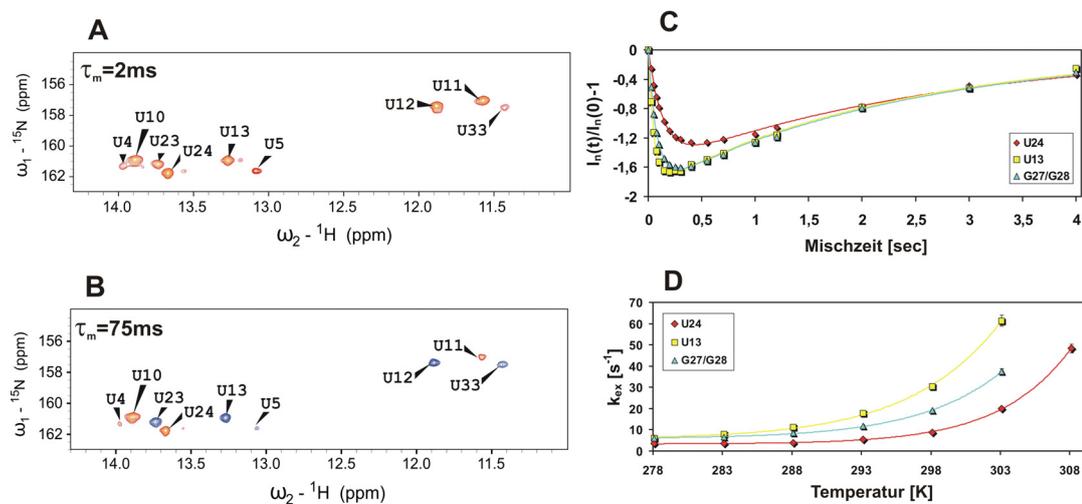


Abbildung 2.12 [^1H - ^{15}N]-2D-Ausschnitt (Mischzeit $\tau_m=2\text{ms}$) der Uracil-Iminosonanzen aus dem ^{15}N -editierten *Inversion Recovery* Experiment aufgenommen an einer 4U-hp2-wt RNA-Probe **(A)** bei einer Temperatur von 20°C und einer Mischzeit von $\tau_m=2\text{ms}$. Signale mit positivem Vorzeichen sind orange dargestellt. **(B)** bei einer Temperatur von 20°C und einer Mischzeit von $\tau_m=75\text{ms}$. Signale mit positivem Vorzeichen sind in orange und Signale mit negativem Vorzeichen in blau dargestellt. **(C)** Abhängigkeit der Intensitäten der Iminosignale U24 (rote Rauten), U13 (gelbe Quadrate) und G27/G28 (blaue Dreiecke) von der Mischzeit τ_m . Die mit Gleichung 2-7 durchgeführten Fits sind als durchgezogene Linien dargestellt. **(D)** Temperaturabhängigkeit der Iminoprotonenaustauschrate $k_{ex}(T)$ der Nukleobasen U24 (rote Rauten), U13 (gelbe Quadrate) und G27/G28 (blaue Dreiecke). Die mit Gleichung 2-19 durchgeführten Fits sind als durchgezogene Linien dargestellt.

Tabelle 2-5 ΔH_{diss} , ΔS_{diss} , $T^*\Delta S_{\text{diss}}$ ($T=20^\circ\text{C}$) und ΔG_{diss} ($T=20^\circ\text{C}$) für die Basenpaaröffnung der einzelnen Nukleobasen innerhalb der 4U-hp2-A8C Mutanten-RNA. $\Delta\Delta H_{\text{diss}}$, $\Delta\Delta S_{\text{diss}}$, $T^*\Delta\Delta S_{\text{diss}}$ ($T=20^\circ\text{C}$) und $\Delta\Delta G_{\text{diss}}$ ($T=20^\circ\text{C}$) stellen die jeweiligen experimentellen Fehler dar.

| 4U-hp2-A8C Mutante | ΔH_{diss} [kJ/mol] | $\Delta\Delta H_{\text{diss}}$ [kJ/mol] | ΔS_{diss} [J/(molK)] | $\Delta\Delta S_{\text{diss}}$ [J/(molK)] | ΔG_{diss} ($T=20^\circ\text{C}$) [kJ/mol] | $\Delta\Delta G_{\text{diss}}$ [$T=20^\circ\text{C}$] [kJ/mol] | $T\Delta S_{\text{diss}}$ [$T=20^\circ\text{C}$] [kJ/mol] | $T\Delta\Delta S_{\text{diss}}$ [$T=20^\circ\text{C}$] [kJ/mol] |
|-----------------------|--------------------------------------|--|--|--|--|--|---|---|
| U23 | 32.44 | 5.43 | 75 | 18 | 10.56 | 0.20 | 21.98 | 5.28 |
| U24 | 83.54 | 1.84 | 226 | 6 | 17.17 | 0.44 | 66.24 | 1.76 |
| G14 | 265.33 | 11.10 | 775 | 34 | 38.04 | 0.86 | 227.15 | 9.97 |
| U13 | 34.01 | 1.81 | 74 | 6 | 12.250 | 0.15 | 21.69 | 1.76 |
| U12 | 31.45 | 1.44 | 65 | 5 | 12.50 | 0.21 | 19.05 | 1.47 |
| G27/G28 | 70.66 | 7.04 | 182 | 22 | 17.20 | 1.20 | 53.34 | 6.45 |
| U11 | 54.26 | 1.00 | 132 | 3 | 15.60 | 0.09 | 38.69 | 0.88 |
| U10 | 93.41 | 6.66 | 249 | 21 | 20.38 | 5.34 | 72.98 | 6.16 |
| G30 | 167.94 | 10.20 | 476 | 32 | 28.53 | 1.68 | 139.52 | 9.38 |
| G31 | 291.97 | 4.42 | 861 | 14 | 39.51 | 2.77 | 252.36 | 4.10 |
| U32 | 73.24 | 2.12 | 199 | 7 | 14.98 | 0.14 | 58.33 | 2.05 |
| U33 | 75.85 | 1.34 | 206 | 4 | 15.47 | 0.10 | 60.38 | 1.17 |
| G6 | 89.98 | 5.01 | 251 | 16 | 15.59 | 0.38 | 73.57 | 4.69 |
| U5 | 11.08 | 1.34 | 3 | 5 | 10.30 | 0.20 | 0.88 | 1.47 |
| U4 | 21.99 | 2.36 | 36 | 8 | 11.92 | 0.35 | 10.55 | 2.34 |

2.3.5 Thermodynamische Stabilität der einzelnen Nucleobasen

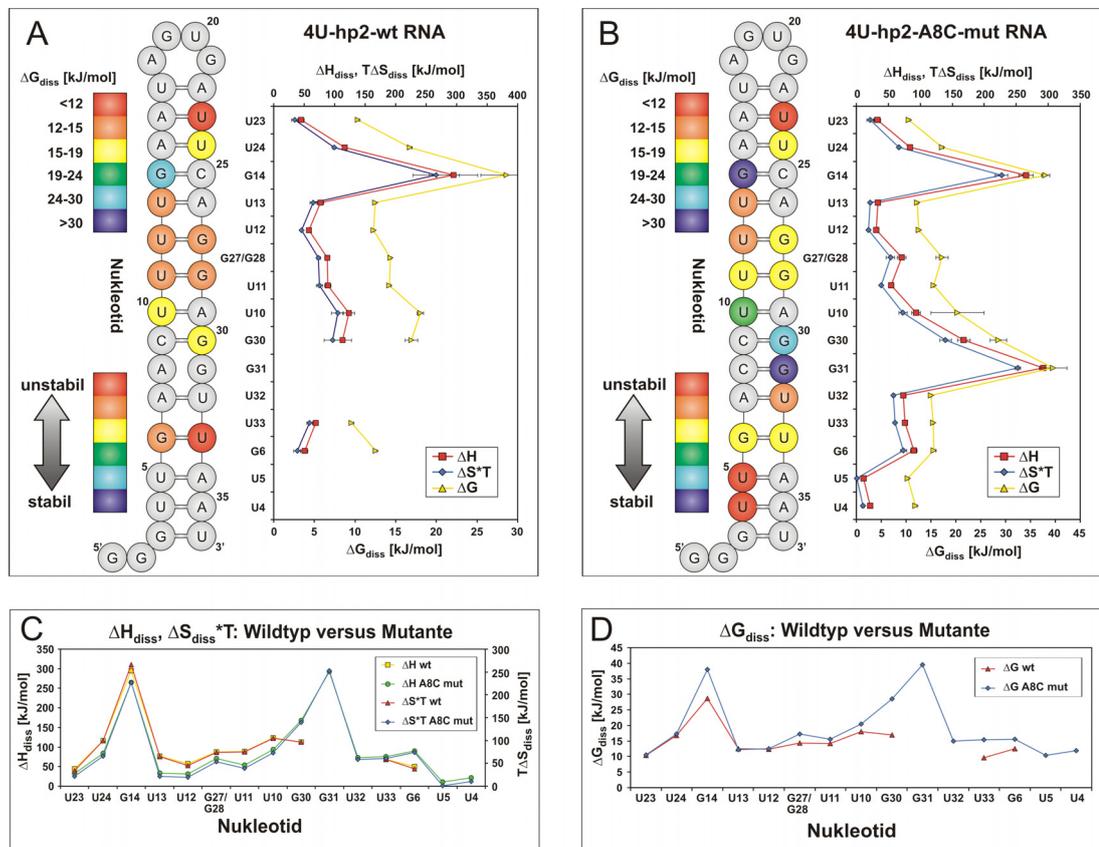


Abbildung 2.13 (A) links: Darstellung der Freien Enthalpie $\Delta G_{diss}(20^\circ\text{C})$ der Basenpaaröffnungen für die Iminoresonanzen, die jeweils einer bestimmten Nucleobase innerhalb der 4U-hp2-wt RNA zuzuordnen sind. Die rote Farbe entspricht dabei einer geringen Stabilität des geschlossenen Zustands im Vergleich zum offenen Zustand. Rechts: Diagrammdarstellung der $\Delta G_{diss}(20^\circ\text{C})$ -, ΔH_{diss} -, und $\Delta S_{diss}^*T(20^\circ\text{C})$ -Werte für die Basenpaaröffnungen einzelner Nucleobasen der 4U-hp2-wt RNA (B) Gleiche Darstellung wie in (A) für die 4U-hp2-A8C Mutanten-RNA (C) Diagrammdarstellung des Vergleichs zwischen Wildtyp und Mutante bezüglich der ΔH_{diss} - und $\Delta S_{diss}^*T(20^\circ\text{C})$ -Werte. ΔH_{diss} - und $\Delta S_{diss}^*T(20^\circ\text{C})$ -Werte sind auf unterschiedlichen Skalen aufgetragen. 4U-hp2-wt: ΔH_{diss} (gelbe Quadrate), ΔS_{diss}^*T bei 20°C (rote Dreiecke). 4U-hp2-A8C Mutante: ΔH_{diss} (grüne Kreise), ΔS_{diss}^*T bei 20°C (blaue Rauten). (D) Diagrammdarstellung des Vergleichs von $\Delta G_{diss}(20^\circ\text{C})$ der 4U-hp2-wt RNA (rote Dreiecke) und der 4U-hp2-A8C Mutanten-RNA (blaue Rauten).

Abbildung 2.13 fasst die Informationen zu Basenpaarstabilitäten der beiden untersuchten RNAs zusammen. Das Diagramm auf der rechten Seite von Abbildung 2.13A zeigt die ΔG_{diss} -, ΔH_{diss} - und ΔS_{diss}^*T -Werte für alle Nucleobasen, denen beobachtbare Iminosignale zugeordnet werden können. Die Werte stellen jeweils den Differenzenergiebetrag zwischen geschlossenem und offenem Zustand einer

Nukleobase dar. Bemerkenswerter Weise sind ΔH_{diss} und $\Delta S_{\text{diss}} \cdot T$ stark miteinander korreliert. Die ΔH_{diss} -Werte liegen zwischen 44.61 kJ/mol (U23) und 294.62 kJ/mol (G14). Diese relativ großen ΔH_{diss} - und $\Delta S_{\text{diss}} \cdot T$ -Werte haben die gleiche Größenordnung und kompensieren sich daher fast vollständig, was zu ΔG_{diss} -Werten führt, die eine Größenordnung kleiner sind und zwischen 9.60 kJ/mol (G33) und 28.61 kJ/mol (G14) liegen. Auch die ΔG_{diss} -Werte sind mit den ΔH_{diss} - und $\Delta S_{\text{diss}} \cdot T$ -Werten korreliert. Eine Projektion der ΔG_{diss} -Werte auf die Sekundärstruktur der Wildtyp-RNA zeigt, dass G14 wesentlich stabiler ist als alle anderen Nukleobasen. Die außergewöhnliche Stabilität von G14 ist, wie weiter unten gezeigt wird, in hohem Maße für den Zusammenhalt der gesamten Helix verantwortlich.

Für die Mutanten-RNA gilt ebenfalls, dass ΔH_{diss} - und $\Delta S_{\text{diss}} \cdot T$ -Werte stark korreliert sind (Abbildung 2.13B). Diese Korrelation der ΔH_{diss} - und $\Delta S_{\text{diss}} \cdot T$ -Werte führt zu einer viel kleineren Streuung der ΔG_{diss} -Werte. G14, G30 und G31, die sich in GC-Basenpaaren befinden, sind die stabilsten Nukleobasen in der Mutanten-RNA. Die Nukleobasen U5 und U4, die sich Nahe am Ende des Helixstammes befinden, und U17, das sich neben dem *loop*-Abschlussbasenpaar befindet, sind unstabil. ΔH_{diss} -Werte in der Mutanten-RNA decken einen breiten Bereich von 11.08 kJ/mol (U5) bis 291.97 kJ/mol (G31) ab. Die Unterschiede der ΔG_{diss} -Werte sind deutlich weniger ausgeprägt und reichen von 10.3 kJ/mol (U5) bis 39.51 kJ/mol (G31). Generell scheinen GC-Basenpaare in helikaler A-Form-RNA deutlich stabiler zu sein als AU- und GU-Basenpaare. Die ΔG_{diss} -Werte, die in dieser Arbeit ermittelt wurden, haben die gleiche Größenordnung wie die ΔG_{diss} -Werte, die von Huang et al. [108] bei 10°C für DNA/RNA-Hybride berichtet wurden, besitzen aber eine größere Streuung, was durch Abweichungen von A-Form-helikaler Geometrie der Helix 2 des FourU RNA-Thermometers erklärt werden kann. Außerdem existieren ΔG_{diss} Werte bei 10°C für die Sarcin-Ricin-Domänen-(SRD) RNA, die zwischen 11.97 kJ/mol und 44.26 kJ/mol liegen [96]. Demzufolge sind Basenpaarstabilitäten, die in früheren Studien an RNA Haarnadelschleifen und DNA/RNA-Hybriden bestimmt wurden, in Übereinstimmung mit den Resultaten, die in dieser Arbeit am FourU RNA-Thermometer gewonnen wurden.

In Abbildung 2.13C werden jeweils die ΔH_{diss} - bzw. $\Delta S_{\text{diss}} \cdot T$ -Werte beider RNAs und in Abbildung 2.13D die ΔG_{diss} -Werte beider RNAs miteinander verglichen. Die Nukleobasen zwischen U23 und U10 von Mutante und Wildtyp zeigen ein ähnliches Verhalten. Enthalpie-Werte der beiden RNAs sind genauso wie die Entropie-Werte miteinander korreliert (Abbildung 2.13C). Überraschenderweise sind die ΔH_{diss} - sowie die $\Delta S_{\text{diss}} \cdot T$ -Werte in der Wildtyp-RNA durchweg größer als in der Mutante. Dies führt allerdings nicht zu größeren ΔG_{diss} -Werten in der Wildtyp-RNA (Abbildung 2.13D). Die höheren stabilisierenden Enthalpie-Werte werden durch ungünstige Entropie-Werte überkompensiert, was zu kleineren ΔG_{diss} -Werten in der Wildtyp-RNA im Vergleich zur Mutante führt. Größere Stabilitätsunterschiede zwischen beiden RNAs existieren in der Nähe des A8-G31 *mismatches*, der durch ein C8-G31 Basenpaar in der Mutante ersetzt ist. Dies zeigt sich vor allem bei der Nukleobase G30 der Wildtyp-RNA, die eine reduzierte Stabilität im Vergleich zur RNA-Mutante aufweist, was höchstwahrscheinlich auf den destabilisierenden Effekt des A8-G31 *mismatch* der Wildtyp-RNA zurückzuführen ist (Abbildung 2.13D). Dieser Effekt wird durch einen kleineren ΔH_{diss} -Wert ausgelöst, der nicht vollständig durch einen kleineren $\Delta S_{\text{diss}} \cdot T$ -Werte kompensiert wird und so zu einem deutlich verringerten ΔG_{diss} -Wert in der Wildtyp-RNA im Vergleich zur Mutante führt. Die Nukleobase U32 zeigt ein Iminosignal in der RNA Mutante, aber nicht in der Wildtyp-RNA, was auf eine deutlich reduzierte Stabilität des A7-U32 Basenpaars in der Wildtyp-RNA, ausgelöst durch das A8-G31 *mismatch*, hinweist. Aus dem gleichen Grund ist auch für das darauf folgende Basenpaar G6-U33 in der Wildtyp-RNA eine reduzierte Stabilität zu beobachten. Zusammenfassend lässt sich also zeigen, dass die reduzierte Stabilität der Wildtyp-RNA durch das A8-G31 *mismatch* bedingt ist, das in der Folge die benachbarten Basenpaarinteraktionen destabilisiert. Interessanterweise ist die G14-C25 Basenpaarinteraktion in der Wildtyp-RNA ebenfalls deutlich weniger stabil als in der RNA-Mutante, obwohl sich dieses Basenpaar nicht in unmittelbarer Nachbarschaft zum A8-G31 *mismatch* befindet. Obwohl der genaue Mechanismus dieser Destabilisierung nicht bekannt ist, so wird sie jedoch eindeutig durch die A8C-Mutation verursacht. Sie wird demnach über langreichweitige Wechselwirkungen unbekannter Art vom A8-G31 *mismatch* durch die A-Form-Helix bis zum G14-C25 Basenpaar transduziert. Das führt dazu, dass die

Sekundärstruktur der Wildtyp-RNA bei physiologischen Wachstumstemperaturen ($T=37^{\circ}\text{C}$) bereits teilweise aufgeschmolzen ist. Das RNA-Thermometer befindet sich also bei diesen physiologischen Temperaturen in seinem Regelungsbereich.

2.3.5.1 Einfluss von MgCl_2 auf die thermodynamische Stabilität einzelner Nukleobasen

Im Zytosol von Bakterienzellen befinden sich Mg^{2+} -Ionen, die Struktur und Stabilität von RNA-Molekülen beeinflussen können. Da für die 4U-hp2-wt RNA Mg^{2+} -Bindestellen nachgewiesen werden konnten (siehe Abschnitt 2.3.9), wurde der Effekt von Mg^{2+} -Ionen auf die thermodynamische Stabilität der einzelnen Nukleobasen der 4U-hp2-wt RNA untersucht. Für die Untersuchung dieses Effekts wurde eine physiologische Mg^{2+} -Ionenkonzentration von 1.5 mM gewählt. Die NMR-Messungen fanden bei einer RNA-Konzentration von 0.7 mM statt. Nimmt man eine Dissoziationskonstante von 0.99 μM ($T=10^{\circ}\text{C}$, Verweis NMR-Titration) für die eindeutig identifizierte Mg^{2+} -Bindestelle an, so lässt sich die Konzentration an freien Mg^{2+} -Ionen für den Fall niedriger RNA-Konzentrationen (Bedingungen innerhalb der Zelle) über das Massenwirkungsgesetz berechnen. Demnach entspricht eine Mg^{2+} -Konzentration von 1.5 mM in der NMR-Probe einer freien Mg^{2+} -Konzentration von ca. 1.1 mM. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass weitere schwache Mg^{2+} -Bindestellen (siehe Abschnitte 2.3.9.1 und 2.3.9.4) zusätzlich Mg^{2+} -Ionen binden und so die freie Mg^{2+} -Ionenkonzentration in der NMR-Probe unter den berechneten 1.1 mM liegt.

Um die thermodynamischen Stabilitäten der einzelnen Nukleobasen in Anwesenheit von 1.5 mM MgCl_2 zu bestimmen, wurde die Temperaturabhängigkeit der Austauschraten $k_{\text{ex}}(T)$ für die einzelnen Nukleobasen bestimmt. Diese $k_{\text{ex}}(T)$ -Abhängigkeiten sind für die Nukleobasen U10, U11, U12 und U24 in Abbildung 2.14 dargestellt. Die Abbildung zeigt für diese Nukleobasen jeweils den Vergleich der $k_{\text{ex}}(T)$ -Abhängigkeiten in Anwesenheit von 1.5 mM MgCl_2 sowie ohne MgCl_2 . Die $k_{\text{ex}}(T)$ -Datenpunkte wurden mit Gleichung 2-19 gefittet, um die ΔG_{diss} -, ΔH_{diss} - und ΔS_{diss} -Werte zu bestimmen. Die entsprechenden Fits der $k_{\text{ex}}(T)$ -Datenpunkte mit und ohne MgCl_2 sind ebenfalls in Abbildung 2.14 dargestellt (durchgezogene

Linien). Etwaige Abweichungen der $k_{\text{ex}}(T)$ -Kurven von Gleichung 2-19 bei höheren Temperaturen wurden bei der Bestimmung der ΔG_{diss} -, ΔH_{diss} - und ΔS_{diss} -Werte nicht berücksichtigt (Diskussion siehe 2.3.4, Seite 2-65). Die in Anwesenheit von 1.5 mM MgCl_2 bestimmten ΔG_{diss} - ($T=20^\circ\text{C}$), ΔH_{diss} -, ΔS_{diss} - und $T^* \Delta S_{\text{diss}}$ - ($T=20^\circ\text{C}$)-Werte der einzelnen Nucleobasen der 4U-hp2-wt RNA sind in Tabelle 2-6 wiedergegeben.

Abbildung 2.15 fasst die Informationen zum Einfluss der Mg^{2+} -Ionen auf die Basenpaarstabilitäten der 4U-hp2-wt RNA zusammen. Auf der linken Seite sind die ΔG_{diss} -Werte ($T=20^\circ\text{C}$) der einzelnen Nucleobasen innerhalb der Sekundärstruktur der 4U-hp2-wt RNA ohne MgCl_2 dargestellt und auf der rechten Seite in Anwesenheit von 1.5 mM MgCl_2 . Blau bedeutet hierbei hohe Stabilität des geschlossenen Zustands im Vergleich zum offenen Zustand und rot entsprechend niedrige Stabilität des geschlossenen Zustands im Vergleich zum offenen Zustand. Das Diagramm in der Mitte zeigt die ΔG_{diss} -Werte der einzelnen Nucleobasen der 4U-hp2-wt RNA bei 20°C und bei 40°C in Anwesenheit von 1.5 mM MgCl_2 (rot) und ohne MgCl_2 (blau) im Vergleich.

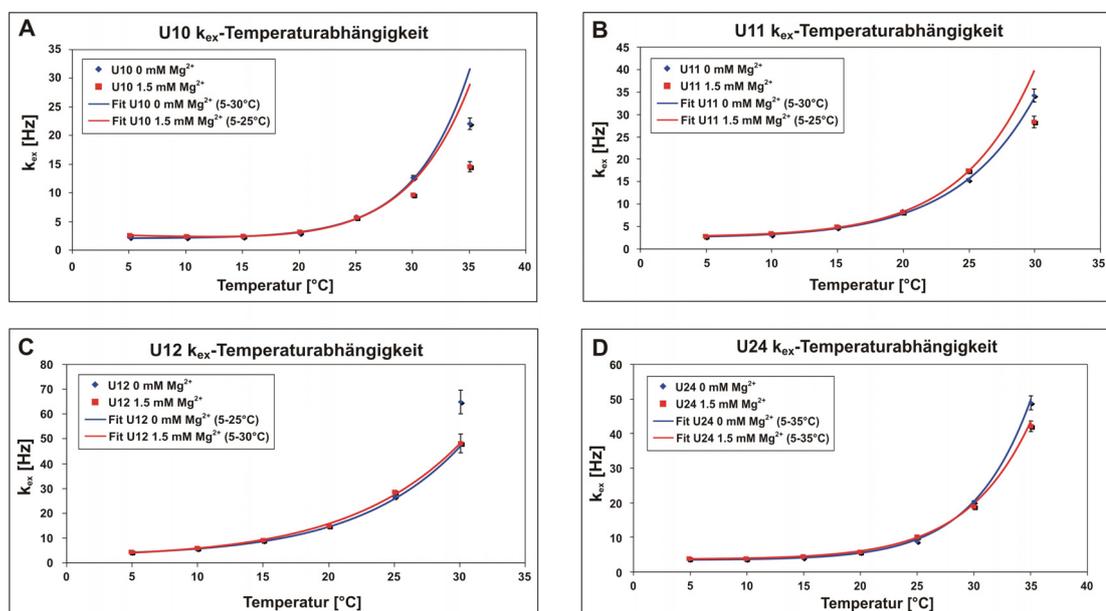


Abbildung 2.14 Temperaturabhängigkeit der Austauschraten $k_{\text{ex}}(T)$ für die Nucleobasen (A) U10, (B) U11, (C) U12 und (D) U24 der 4U-hp2-wt RNA. Für jede der vier dargestellten Nucleobasen sind die $k_{\text{ex}}(T)$ -Werte ohne MgCl_2 (blaue Rauten) sowie in Anwesenheit von 1.5 mM MgCl_2 (rote Quadrate) dargestellt. Die Fits der $k_{\text{ex}}(T)$ -Datenpunkte entsprechend Gleichung 2-19 sind jeweils als blaue (0 mM MgCl_2) bzw. rote (1.5 mM MgCl_2) Linien wiedergegeben.

Abbildung 2.16 zeigt den Einfluss der Mg^{2+} -Ionen (1.5 mM) auf die ΔH_{diss} (Abbildung 2.16A) und $T^*\Delta S_{diss}$ ($T=20^\circ C$) Werte (Abbildung 2.16B) der einzelnen Nukleobasen der 4U-hp2-wt RNA. Interessanterweise bewirkt die Anwesenheit der Mg^{2+} -Ionen für alle Nukleobasen mit Ausnahme von U11 und G14 eine Reduktion der ΔH_{diss} - sowie der $T^*\Delta S_{diss}$ -Werte ($T=20^\circ C$). Die Enthalpie-Entropie-Korrelation ist in Anwesenheit von $MgCl_2$ demnach ebenfalls vorhanden. Die Tatsache, dass sämtliche Nukleobasen (auch die, die nicht direkt an einer $MgCl_2$ -Bindung beteiligt sind) den durch $MgCl_2$ ausgelösten Effekt in gleicher Weise spüren, lässt vermuten, dass es sich auch hier um einen durch das Lösungsmittel vermittelten Effekt handelt. Die Anwesenheit der Mg^{2+} -Ionen scheint die Hydrathülle der RNA so zu beeinflussen, dass die ΔH_{diss} - und ΔS_{diss} -Werte der Basenpaaröffnung generell reduziert werden. Ein Effekt des $MgCl_2$ auf die Struktur des freien Wassers ist bei diesen geringen $MgCl_2$ -Konzentrationen (1.5 mM) auszuschließen. Das direkt an der Bindung des Mg^{2+} -Ions beteiligte U11 hingegen zeigt eine Erhöhung der ΔH_{diss} - und ΔS_{diss} -Werte, was möglicherweise ein direkter Effekt der Mg^{2+} -Bindung ist.

Der Effekt von $MgCl_2$ auf die ΔG_{diss} -Werte der Basenpaaröffnung ist keinesfalls einheitlich. Bei einer Temperatur von $20^\circ C$ wirkt $MgCl_2$ auf die meisten Nukleobasen leicht destabilisierend, während es auf G14 leicht stabilisierend wirkt (Abbildung 2.15). Im Gegensatz dazu wirkt $MgCl_2$ bei einer Temperatur von $40^\circ C$ leicht stabilisierend auf alle Nukleobasen mit Ausnahme von U11 (Abbildung 2.15). Generell lässt sich jedoch sagen, dass der Einfluss von physiologischen $MgCl_2$ -Konzentrationen auf die Basenpaarstabilitäten eher gering ausfällt.

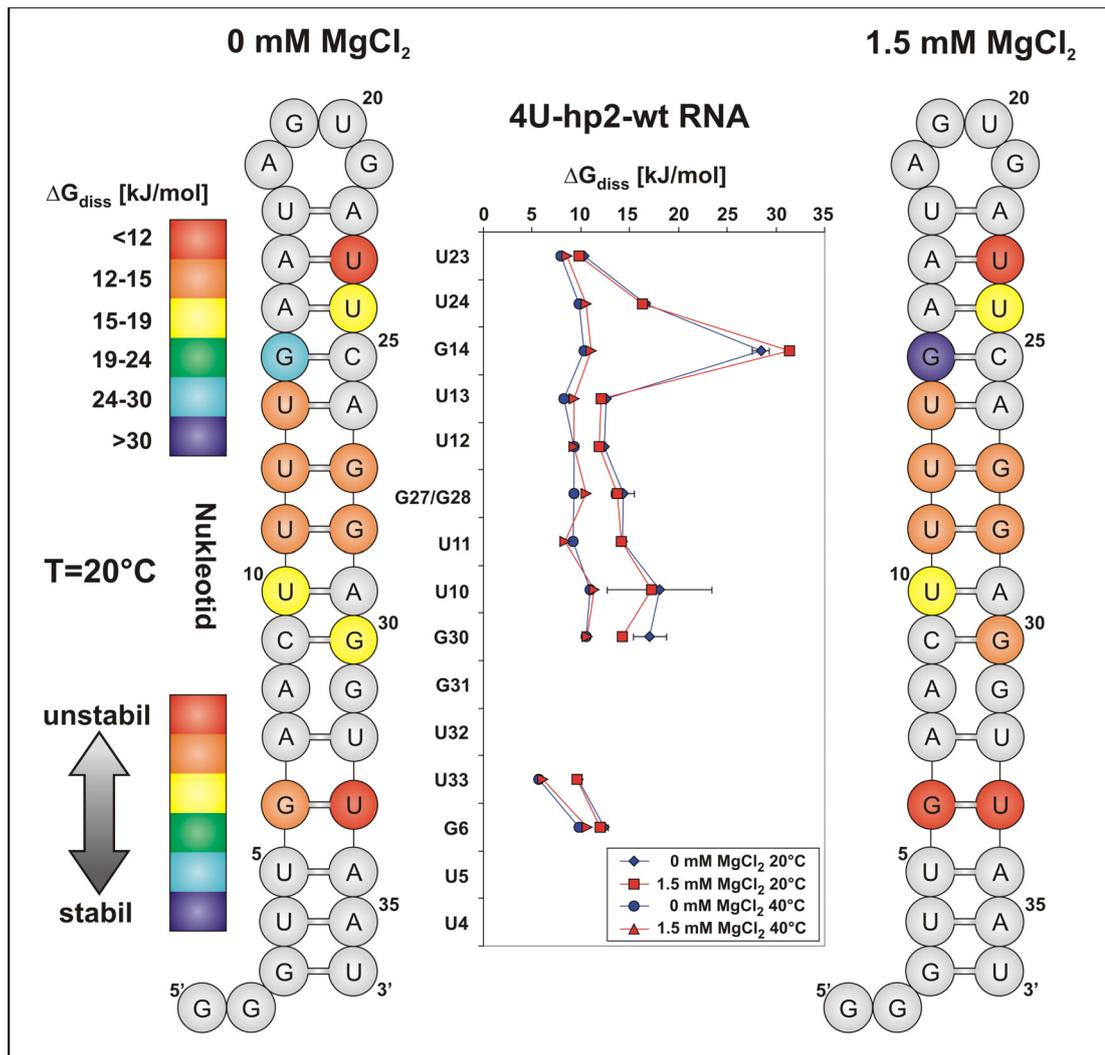


Abbildung 2.15 Einfluss von 1.5 mM MgCl₂ auf die Freie Enthalpie der Basenpaaröffnung ΔG_{diss} für die Nucleobasen der 4U-hp2-wt RNA. Die Stabilitäten der Nucleobasen bei 20°C sind in der Sekundärstrukturdarstellung der 4U-hp2-wt RNA ohne MgCl₂ (links) sowie in Anwesenheit von 1.5 mM MgCl₂ wiedergegeben. Die entsprechende Farbcodierung der ΔG_{diss} -Werte ist auf der linken Seite dargestellt. Die blaue Farbe entspricht hierbei einer hohen Stabilität des geschlossenen Zustands im Vergleich zum offenen Zustand während die rote Farbe einer geringen Stabilität entspricht. Das Diagramm in der Mitte zeigt die ΔG_{diss} -Werte der einzelnen Nucleobasen bei einer Temperatur von 20°C in Anwesenheit von 1.5mM MgCl₂ (rote Quadrate) bzw. ohne MgCl₂ (blaue Rauten). Zusätzlich dazu sind die ΔG_{diss} -Werte in Anwesenheit von 1.5mM MgCl₂ (rote Dreiecke) bzw. ohne MgCl₂ (blaue Kreise) bei einer Temperatur von 40°C dargestellt.

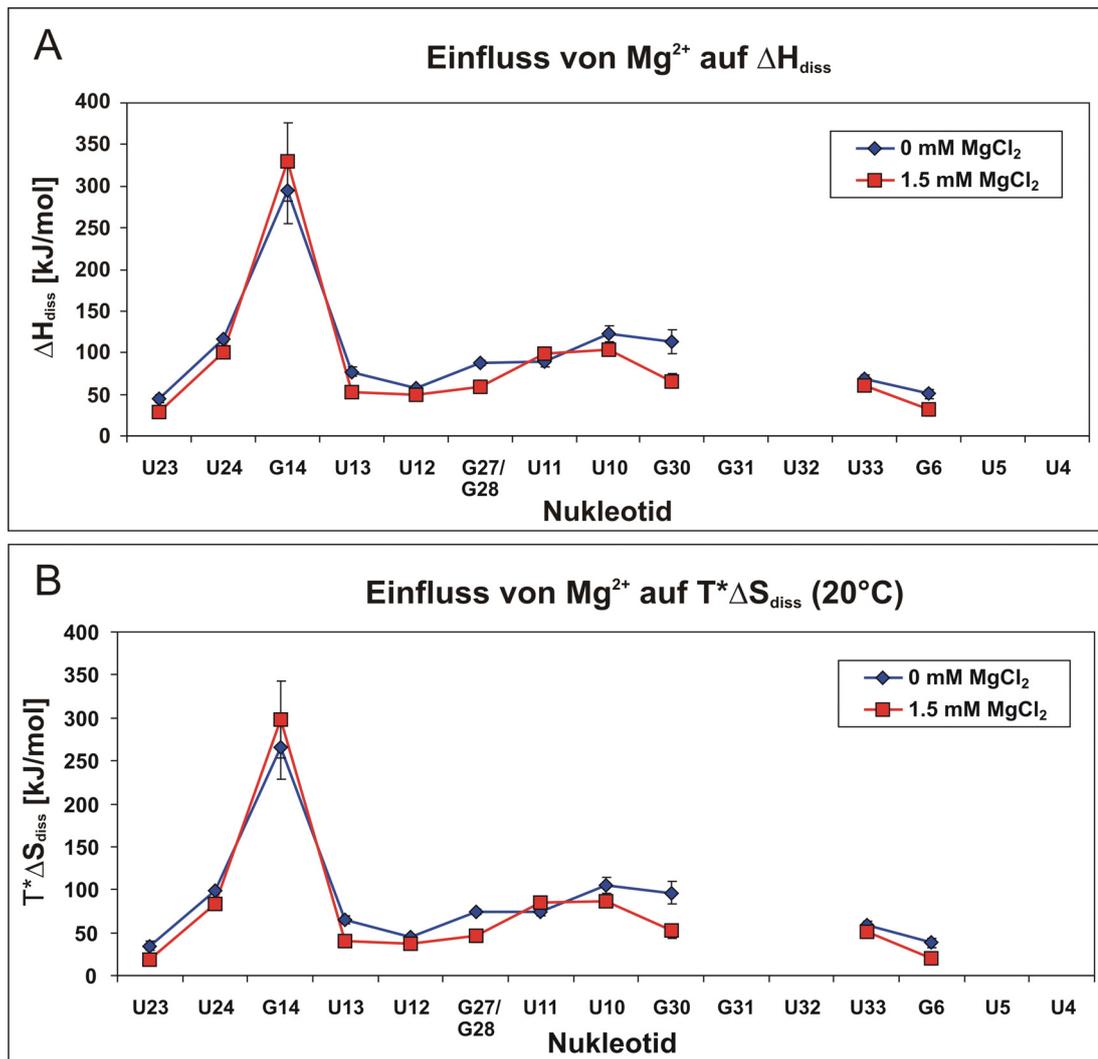


Abbildung 2.16 Einfluss von 1.5 mM $MgCl_2$ auf die (A) ΔH_{diss} -Werte bzw. (B) $T^*\Delta S_{diss}$ -Werte (20°C) der einzelnen Nucleobasen der 4U-hp2-wt RNA. (A) ΔH_{diss} -Werte der einzelnen Nucleobasen der 4U-hp2-wt RNA sind als blaue Rauten (0 mM $MgCl_2$) bzw. rote Quadrate (1.5 mM $MgCl_2$) dargestellt. (B) $T^*\Delta S_{diss}$ -Werte (20°C) der einzelnen Nucleobasen der 4U-hp2-wt RNA sind als blaue Rauten (0 mM $MgCl_2$) bzw. rote Quadrate (1.5 mM $MgCl_2$) dargestellt.

Die beobachteten $k_{ex}(T)$ -Kurven zeigen, dass die Austauschraten durch Mg^{2+} entweder nicht beeinflusst werden oder deutlich niedriger liegen (für einige Nucleobasen in der Nähe der Mg^{2+} -Bindestelle bei hohen Temperaturen zu beobachten; siehe Abbildung 2.14), was mit einer Stabilisierung der RNA-Struktur ausgelöst durch die Mg^{2+} -Bindung in der Nähe der Mg^{2+} -Bindestelle zu erklären ist. Die Nucleobasen in der Nähe der *outer sphere* Mg^{2+} -Bindestelle zeigen bei höheren

Temperaturen Abweichungen vom Fit mit Gleichung 2-19 (Abbildung 2.14A, B, C), während die meisten Nucleobasen keine Abweichungen vom Fit zeigen (z.B. U24, siehe Abbildung 2.14D). Die für einige Nucleobasen beobachteten Abweichungen vom Fit sind als $\Delta H_{\text{diss}}(T)$ - bzw. $\Delta S_{\text{diss}}(T)$ -Abhängigkeiten zu interpretieren. Die Kurven verlaufen bei höheren Temperaturen flacher, als der Fit es vorhersagt. Dies bedeutet, dass ΔH_{diss} sowie ΔS_{diss} eine negative Temperaturabhängigkeit besitzen. Ursache dieser negativen $\Delta H_{\text{diss}}(T)$ - und $\Delta S_{\text{diss}}(T)$ -Temperaturabhängigkeiten sind vermutlich temperaturabhängige Strukturveränderungen des nativen $[\text{RNA} \cdot \text{Mg}^{2+}]$ -Komplexes. Die aufgrund von MgCl_2 auftretenden $\Delta H_{\text{diss}}(T)$ - bzw. $\Delta S_{\text{diss}}(T)$ -Abhängigkeiten bei Temperaturen in der Nähe des Schmelzpunktes sind höchstwahrscheinlich auch die Ursache für den deutlich höheren Schmelzpunkt der RNA in Anwesenheit von MgCl_2 (Abbildung 2.24). Die $k_{\text{ex}}(T)$ -Kurven der Nucleobasen, die an der Mg^{2+} -Bindung beteiligt sind, verlaufen bei höheren Temperaturen deutlich flacher, als es die bei tieferen Temperaturen bestimmten ΔH_{diss} - bzw. ΔS_{diss} -Werte vorhersagen.

Demzufolge ist die Schmelzpunkterhöhung eine Folge von Strukturänderungen der 4U-hp2-wt RNA, die durch Mg^{2+} -Ionen ausgelöst wird und erst bei höheren Temperaturen auftritt. Da diese Effekte erst bei höheren Temperaturen auftreten und die Temperaturunabhängigkeit von ΔH_{diss} und ΔS_{diss} vorausgesetzt wird, werden sie bei der Analyse der ΔG_{diss} -, ΔH_{diss} - und ΔS_{diss} -Werte nicht erfasst. Die $k_{\text{ex}}(T)$ -Kurven zeigen jedoch klar die Abweichungen der an der Mg^{2+} -Bindung beteiligten Nucleobasen von Gleichung 2-19. Diese Abweichungen sind der Grund für die erhöhte Thermostabilität der 4U-hp2-wt RNA in Anwesenheit von MgCl_2 . Genaue Informationen über die Strukturveränderungen, die bei höheren Temperaturen in Anwesenheit von MgCl_2 stattfinden und die erhöhte Thermostabilität der RNA verursachen, sind jedoch nicht vorhanden.

2.3.6 Der thermische Entfaltungsübergang des RNA-Thermometers

Die Entfaltung der Wildtyp- (Abbildung 2.17B) und der Mutanten-RNA (Abbildung 2.17D) wurde mittels Circular dichroismus-(CD)-Spektroskopie untersucht. Die CD-Kurven ergeben einen Schmelzpunkt T_m von 41.1°C für die

Wildtyp- und 53.5°C für die Mutanten-RNA. Aus den über die Austauschraten bestimmten ΔH_{diss} - und ΔS_{diss} -Werten für die jeweiligen Basenpaaröffnungen können die ΔG_{diss} -Werte entsprechend der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (Gleichung 2-16) berechnet werden. Die berechneten ΔG_{diss} -Werte können zu Temperaturen über dem mit CD-Spektroskopie beobachteten Schmelzpunkt extrapoliert werden. Die $\Delta G_{\text{diss}}(T)$ -Abhängigkeiten wurden für die Wildtyp-RNA (Abbildung 2.17A) und die Mutanten-RNA (Abbildung 2.17C) für die einzelnen Nukleobasen berechnet. Interessanterweise zeigen die $\Delta G_{\text{diss}}(T)$ -Kurven der einzelnen Nukleobasen der jeweiligen RNA einen Schnittpunkt, der dem Schmelzpunkt dieser RNA, der aus den CD-Kurven ermittelt wurde, entspricht. Diese Beobachtung trifft für die Wildtyp-RNA (Abbildung 2.17A, B) und die Mutanten-RNA (Abbildung 2.17C, D) zu. Die Daten zeigen, dass beide RNA-Moleküle nicht entfalten bis alle Nukleotide in etwa die gleichen ΔG_{diss} -Stabilitäten aufweisen. Demzufolge können sogar einzelne stabile Basenpaarinteraktionen wie z.B. G14-C25 die Entfaltung der gesamten RNA-Helix verhindern. Aus dieser Beobachtung ergibt sich unweigerlich die Frage nach der Kooperativität des Entfaltungsübergangs.

Die Kooperativität des Entfaltungsübergangs kann anhand der CD-Schmelzkurven bestimmt werden, die eine ausgeprägte sigmoide Form aufweisen. Die normalisierten CD-Schmelzkurven der Wildtyp-RNA sowie der Mutanten-RNA können daher mit Gleichung 2-1 gefittet werden. Aus den Fits ergibt sich ein Hill-Koeffizient $b=10.6$ für die Wildtyp-RNA und ein Hill-Koeffizient $b=18.6$ für die Mutanten-RNA. Offensichtlich reduziert der A8-G31 *mismatch* der Wildtyp-RNA die Kooperativität der Entfaltung dramatisch. Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass *bulges* und *mismatches* die Kooperativität der Entfaltungsübergänge von RNA-Helices reduzieren. Ein hoher Anteil an GC-Basenpaaren erhöht dagegen die Stabilität und damit den Schmelzpunkt einer RNA-Helix. Es ist möglich, dass sich durch den Druck der Evolution eine Kombination von *bulges*, *mismatches* und GC-Gehalt herausbildet, um das für das jeweilige Genregulationsproblem notwendige Gleichgewicht zwischen binärem Ein/Aus-Schalter und Dimmer-artiger Regulation einzustellen. Zum Beispiel würde bei einer gegebenen physiologischen Schmelztemperatur eine lange Helix aus AU- und GU-Basenpaaren ohne *bulges* und *mismatches* zu einer binären schalterartigen Temperaturkennlinie führen, während

eine kurze Helix mit hohem GC-Gehalt und zusätzlichen *bulges* und/oder *mismatches* eine dimmerartige Temperaturkennlinie ergeben würde.

Entsprechend der Studie von Searle und Williams [135] kann die freie Enthalpie der Helixentfaltung ΔG_{Helix} durch Gleichung 2-33 approximiert werden.

Gleichung 2-33

$$\Delta G_{\text{Helix}} \approx \Delta H_{\text{Stapel}} - T * \Delta S_{\text{Rotation}}$$

ΔH_{Stapel} ist die Stapelenthalpie und $\Delta S_{\text{Rotation}}$ stellt den Entropieverlust aufgrund der Einschränkung von Rotationsfreiheitsgraden hauptsächlich des Phosphodiester-

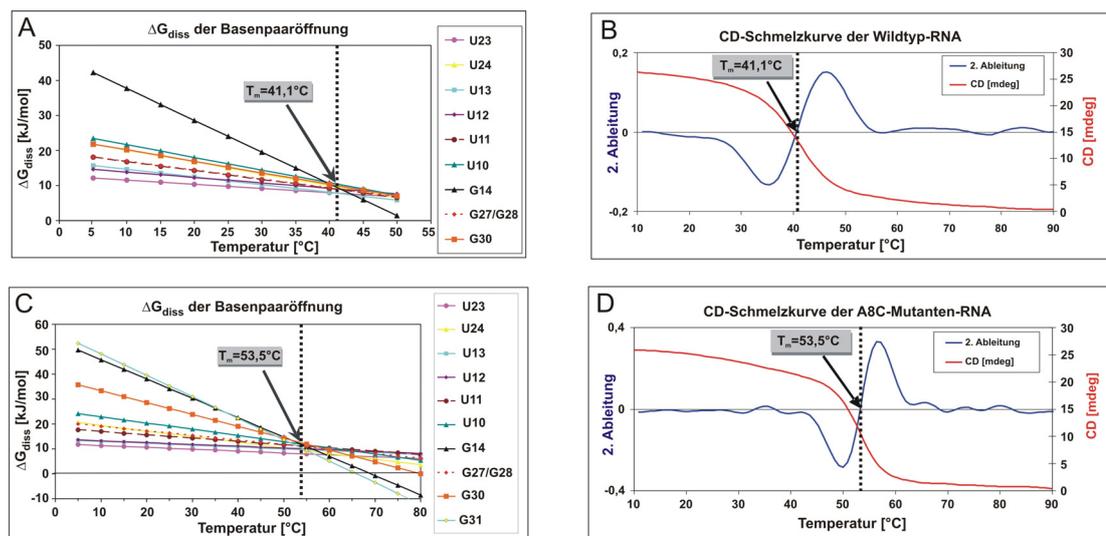


Abbildung 2.17 (A) $\Delta G_{\text{diss}}(T)$ -Funktionen für die Basenpaaröffnungen einzelner Nucleobasen in der 4U-hp2-wt RNA. $\Delta G_{\text{diss}}(T)$ -Werte wurden aus den dazugehörigen ΔH_{diss} - und ΔS_{diss} -Werten entsprechend der Gibbs-Helmholtz Gleichung (Gleichung 2-16) berechnet und zu höheren Temperaturen extrapoliert. Der aus der CD-Schmelzkurve ermittelte Schmelzpunkt T_m der 4U-hp2-wt RNA ist ebenfalls angegeben. (B) Die CD-Schmelzkurve der 4U-hp2-wt RNA wurde bei einer Wellenlänge von 258 nm aufgenommen und ist als rote Linie dargestellt. Zusätzlich dazu ist die 2. Ableitung der CD-Schmelzkurve nach der Temperatur als blaue Linie dargestellt. (C) Gleiche Darstellung wie in (A), allerdings für die 4U-hp2-A8C Mutanten-RNA. (D) Gleiche Darstellung wie in (B), allerdings für die 4U-hp2-A8C Mutanten-RNA.

rückgrats in Folge der Sekundärstrukturausbildung dar. Am Schmelzpunkt T_m wird der Verlust der Stapelwechselwirkung exakt durch den Gewinn an Rotationsfreiheitsgraden kompensiert, so dass beide Konformationen gleiche Stabilität aufweisen ($\Delta G_{\text{Helix}}=0$). Betrachtet man die Entfaltung einer Helix, die aus „n“ Basenpaaren ($2n$ Nukleobasen) besteht, so ist die komplette Entfaltung mit dem Verlust von „ $2n-2$ “ Stapelwechselwirkungen verknüpft, was in etwa einer Stapelwechselwirkung (ΔH_{Stapel}) pro beteiligter Nukleobase entspricht.

Die Annahme, dass das RNA-Rückgrat in der A-Form-helikalen Konformation verweilt, ist aus folgenden Gründen gerechtfertigt. Eine verzerrte Rückgratgeometrie würde sich destabilisierend auf benachbarte Basenpaare auswirken. Deshalb sind andere Rückgratkonformationen thermodynamisch ungünstig. Des Weiteren sind Änderungen der Rückgratkonformation auch aus kinetischen Gesichtspunkten nicht möglich oder zumindest unwahrscheinlich. Die Lebenszeiten des offenen Zustands liegen typischerweise im Bereich $\tau_{\text{offen}}=1-10$ ns [95]. Änderungen der Rückgratkonformation finden auf einer Zeitskala von einigen Dutzend Nanosekunden für einzelsträngige Dinukleotide statt [136] und sind vermutlich noch wesentlich langsamer in doppelsträngigen RNA-Molekülen. Mit anderen Worten, die Nukleobase ist bereits wieder in der geschlossenen Konformation, bevor eine konformationelle Änderung des Rückgrats überhaupt stattfinden kann. Aus diesen Gründen ist die Differenz der Rotationsentropie zwischen geschlossenem und offenem Zustand der Nukleobase vernachlässigbar klein ($\Delta S_{\text{Rotation}} \approx 0$). Folglich ist die Stapelinteraktion ΔG_{Stapel} die vorherrschende RNA-RNA Interaktion, die wiederum durch enthalpische Beiträge bestimmt wird ($\Delta G_{\text{Stapel}} \approx \Delta H_{\text{Stapel}}$).

Obwohl die genaue Beschaffenheit des austauschkompetenten Zustands unklar ist, können doch einige Aussagen über diesen Zustand getroffen werden. Die Iminoprotonen müssen im offenen Zustand dem Katalysator direkt zugänglich sein. In dieser Arbeit wurden Phosphate als Katalysator verwendet, aber in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass sterisch anspruchsvollere Substanzen wie z.B. TRIS, Triethanolamin oder Imidazol ebenso in der Lage sind, den Iminoprotonenaustausch sehr effizient zu katalysieren [74]. Folglich müssen die Iminoprotonen im offenen Zustand der RNA an der Oberfläche exponiert sein, was

nur durch eine deutliche Verlagerung der Nukleobase in die große Furche hinein erklärt werden kann. Diese Verlagerung führt höchstwahrscheinlich zu einer starken Abschwächung oder sogar zum Verschwinden der Stapelwechselwirkungen zu den benachbarten Nukleobasen. Dieser Argumentation folgend, gehen während einer unkorrelierten Basenpaaröffnung innerhalb einer A-Form-helikalen ds-RNA zwei Stapelwechselwirkungen verloren oder werden zumindest stark abgeschwächt ($\approx 2 \cdot \Delta H_{\text{Stapel}}$), während bei der globalen Entfaltung der gesamten RNA nur eine Stapelwechselwirkung pro Nukleobase verloren geht ($\approx \Delta H_{\text{Stapel}}$).

Interessanterweise liegt der Schnittpunkt (Abbildung 2.17A, C) der $\Delta G_{\text{diss}}(T)$ Werte bei ca. 10 kJ/mol. Das heißt, am Schmelzpunkt T_m ist der offene Zustand weniger stabil als der geschlossene Zustand. Intuitiv würde man am Schmelzpunkt gleiche Stabilitäten für den offenen und den geschlossenen Zustand erwarten. Dieser anscheinende Widerspruch kann aufgelöst werden, wenn man die Stapel (Stacking)-Interaktion zwischen den Nukleobasen mitberücksichtigt. Die unkorrelierten Basenpaaröffnungen, die bei tieferen Temperaturen stattfinden, gehen mit dem Verlust von näherungsweise zwei Stapelinteraktionen einher (siehe oben). Im Falle der kooperativen Entfaltung einer RNA-Helix ist die Situation unterschiedlich. Wenn die benachbarte Nukleobase sich bereits in der offenen Konformation befindet, wird die geschlossene Konformation aufgrund der fehlenden Stapelinteraktion destabilisiert. Deshalb geht eine Basenpaaröffnung in diesem intermediären Zustand mit dem Verlust von nur einer Stapelinteraktion einher. Dementsprechend können die Stapelinteraktionen zwischen den Nukleobasen innerhalb einer RNA-Helix für die beobachtete Kooperativität des globalen Entfaltungsübergangs in einem konsekutiven Reißverschluss-artigen Entfaltungsmodell verantwortlich gemacht werden [137].

Frühere Studien, die an RNA und DNA Oligonukleotiden wie poly(A), poly(C) und poly(dA) durchgeführt wurden, ergaben eine mittlere Enthalpie ΔH_{Stapel} für die Basenstapelung von 33-39 kJ/mol [135, 138]. Diesen Werten stehen kompensierende ΔS_{Stapel} -Werte von 31.3-39.6 J/(mol*K) gegenüber. In DNA-Oligomeren mit gemischter Sequenz allerdings ist die mittlere Stapelenthalpie pro Nukleobase ΔH_{Stapel} deutlich reduziert und beträgt lediglich 9.5-10.2 kJ/mol. Die mittlere

Stapelentropie ΔS_{Stapel} ist ebenfalls reduziert auf 9.1-10.1 J/(mol*K) [135, 139]. Der Entropieverlust, der mit der Basenstapelung in einzelsträngigen Oligonukleotiden einhergeht, wird durch die Einschränkung von Rotationsfreiheit des Zucker-Phosphatrückgrats verursacht.

Nimmt man an, dass nach der Basenpaaröffnung das Zucker-Phosphatrückgrat eines RNA-Doppelstranges in der A-Form-Konformation verweilt, wird der Entropieunterschied ΔS_{Stapel} zwischen offener und geschlossener Konformation null (siehe oben). In diesem Fall wird die Freie Enthalpie ΔG_{Stapel} durch ΔH_{Stapel} bestimmt und beträgt daher ca. 9.5-10.2 kJ/mol. Daraus lässt sich ableiten, dass der Ordinatenabschnitt am Schnittpunkt in Abbildung 2.17A, C der mittleren freien Stapelenthalpie pro Nukleobase entspricht, $\Delta G_{\text{diss}}(T_m) \approx \Delta G_{\text{Stapel}} \approx \Delta H_{\text{Stapel}}$, die in etwa 10kJ/mol beträgt.

2.3.7 Enthalpie-Entropie-Korrelationen und deren Auswirkungen

In Abbildung 2.18A, B sind die Enthalpie-Entropie-Korrelationen für die Basenpaaröffnungen der Wildtyp- und der Mutanten-RNA dargestellt. Offensichtlich sind in beiden RNAs ΔH_{diss} - und ΔS_{diss} -Werte strikt linear miteinander korreliert. Es besteht die Möglichkeit, dass ΔH_{diss} - und ΔS_{diss} -Werte aufgrund von Fehlerkompensationen miteinander korreliert werden. Solche Effekte treten vor allem dann auf, wenn man die ΔS_{diss} -Werte aus einem Wertepaar von ΔG_{diss} - und ΔH_{diss} -Werten über die Gibbs-Helmholtz-Gleichung berechnet. In einem solchen Fall ist es rein statistisch nicht möglich, einen Fehler für ΔS_{diss} zu bestimmen. Obwohl es möglich ist, mittels Fehlerfortpflanzung einen Fehler für ΔS_{diss} aus den Fehlern von ΔG_{diss} und ΔH_{diss} zu bestimmen, so kann dadurch nicht ausgeschlossen werden, dass die ΔH_{diss} - und ΔS_{diss} -Werte innerhalb dieser Grenzen miteinander korreliert sind. In dieser Arbeit wurden ΔH_{diss} - und ΔS_{diss} -Werte jedoch aus einer Regression der Temperaturabhängigkeit der ΔG_{diss} -Werte bestimmt. Es wurden also weit mehr als zwei verschiedene $\Delta G_{\text{diss}}(T)$ -Werte verwendet, um die beiden ΔH_{diss} - und ΔS_{diss} -Werte zu bestimmen. Diese Überbestimmtheit reduziert die Möglichkeit bzw. das Ausmaß der Fehlerkompensation beträchtlich. Mittels Regression können die statistisch korrekten Fehler für ΔH_{diss} und ΔS_{diss} ermittelt werden, die eine eventuelle

Korrelation zwischen ΔH_{diss} und ΔS_{diss} jedoch nicht ausschließen können. Es existieren jedoch statistische Tests für genau dieses Problem, mit denen sich zeigen lässt, dass die hier beobachteten $\Delta H_{\text{diss}}(\Delta S_{\text{diss}})$ -Korrelationen keine Artefakte aufgrund von Fehlerkompensationen darstellen [140]. Ein entsprechender Test wurde für die hier ermittelten $\Delta H_{\text{diss}}(\Delta S_{\text{diss}})$ -Korrelationen der Wildtyp-RNA und der Mutanten-RNA durchgeführt (siehe Abschnitt 2.3.7.1).

ΔG_{diss} - und ΔH_{diss} -Werte sind ebenfalls in beiden RNAs linear miteinander korreliert (Abbildung 2.18C, D), wenngleich diese Korrelation nicht so strikt wie die $\Delta H_{\text{diss}}(\Delta S_{\text{diss}})$ -Korrelationen sind. Die $\Delta G_{\text{diss}}(\Delta H_{\text{diss}})$ -Korrelationsgraphen (Abbildung 2.18C, D) sind für eine Temperatur von 20°C dargestellt. Die Steigungen m dieser linearen Korrelationen sind abhängig von der Temperatur und werden null bei der jeweiligen Temperatur $T=m$, wie anhand Gleichung 2-34 ersichtlich ist.

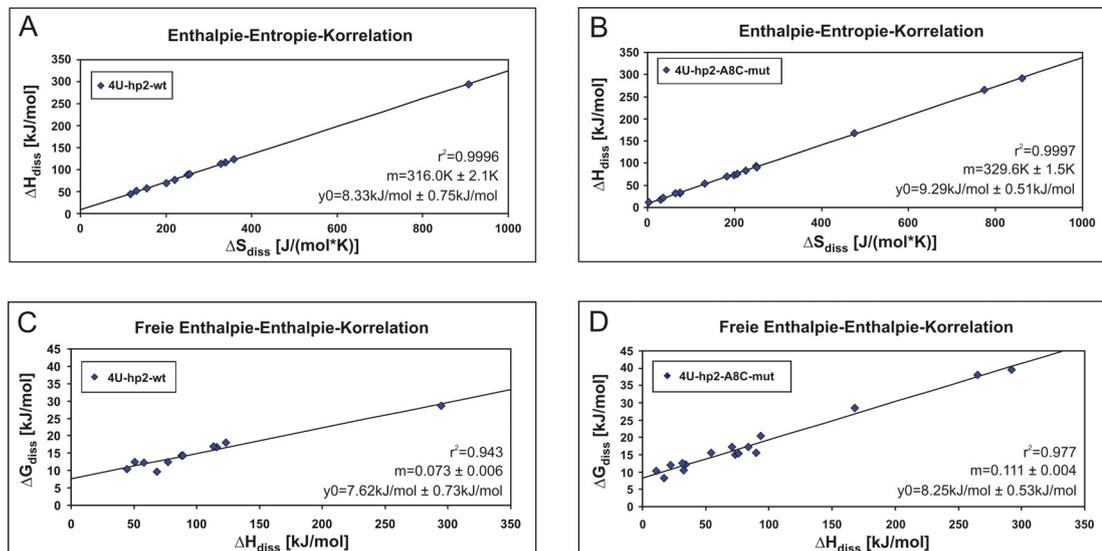


Abbildung 2.18 (A) Enthalpie-Entropie-Korrelation für die Basenpaaröffnung einzelner Nucleobasen innerhalb der 4U-hp2-wt RNA. (B) Enthalpie-Entropie-Korrelation für die Basenpaaröffnung einzelner Nucleobasen innerhalb der 4U-hp2-A8C-mut RNA. (C) Freie Enthalpie-Entropie-Korrelation für die Basenpaaröffnung einzelner Nucleobasen innerhalb der 4U-hp2-wt RNA. (D) Freie Enthalpie-Entropie-Korrelation für die Basenpaaröffnung einzelner Nucleobasen innerhalb der 4U-hp2-A8C-mut RNA.

Die Korrelation von ΔH_{diss} - und ΔS_{diss} -Werten hat einige wichtige Auswirkungen. Eine davon ist, dass Einsetzen der Korrelation in die Gibbs-Helmholtz-Gleichung (Gleichung 2-16) zu folgender Gleichung (Gleichung 2-34) führt.

Gleichung 2-34

$$\Delta G_{\text{diss}} = (m - T) * \Delta S_{\text{diss}} + y_0$$

In Gleichung 2-34 stellt m die Steigung der $\Delta H_{\text{diss}}(\Delta S_{\text{diss}})$ -Korrelation dar, die in Abbildung 2.18A, B dargestellt ist, T die Temperatur und y_0 den Ordinatenabschnitt. Aus dieser Gleichung folgt, dass aufgrund der $\Delta H_{\text{diss}}(\Delta S_{\text{diss}})$ -Korrelation bei der Temperatur $T=m$ alle ΔG_{diss} -Werte den gleichen Wert haben, der dem Ordinatenabschnitt y_0 entspricht (siehe auch Abbildung 2.17A, C). Die $\Delta H_{\text{diss}}(\Delta S_{\text{diss}})$ -Korrelation ist demnach die Ursache für den Schnittpunkt in Abbildung 2.17A (C) und der Ordinatenabschnitt y_0 aus Abbildung 2.18A (B) entspricht dem y -Wert (ΔG_{diss} -Wert) des Schnittpunkts in Abbildung 2.17A (C). Ein Vergleich mit den korrespondierenden CD-Schmelzkurven zeigt, dass die jeweilige Temperatur $T=m$ sehr nahe an der jeweiligen Schmelztemperatur liegt. Bei der Wildtyp-RNA beträgt die Steigung $m=316\pm 2.1$ K und die Schmelztemperatur $T_m=314.3$ K. Bei der Mutanten-RNA beträgt die Steigung $m=329.6\pm 1.5$ K und die Schmelztemperatur $T_m=326.7$ K. Lineare $\Delta H_{\text{diss}}(\Delta S_{\text{diss}})$ -Korrelationen konnten bereits in früheren Studien zu Basenpaaröffnungen in DNA-Duplexen [141, 142] beobachtet werden. Chen et al. bestimmten eine Steigung der $\Delta H_{\text{diss}}(\Delta S_{\text{diss}})$ -Korrelation von $m=306$ K für eine 12mer-Duplex-DNA.

Enthalpie-Entropie-Kompensation (EEK) ist ein weit verbreiteter Effekt, der bereits in einer Vielzahl von chemischen und biochemischen Reaktionen beobachtet wurde [143]. Des Weiteren ist auch die charakteristische lineare Korrelation von Enthalpie und Entropie eine Besonderheit, die in vielen Fällen wie z.B. der Entfaltung von Nukleinsäuren oder Proteinen beobachtet werden konnte [144]. Man nimmt gemeinhin an, dass diese lineare Korrelation eine ubiquitäre Eigenschaft von Wasser ist und dass die Steigung der Korrelation durch Solvatationsbeiträge bestimmt wird, während der Ordinatenabschnitt andere Wechselwirkungen als die zum

Lösungsmittel H_2O beinhaltet [143]. Auf die Basenpaaröffnungen in RNA-Doppelsträngen übertragen bedeutet dies, dass der Ordinatenabschnitt der $\Delta H_{\text{diss}}(\Delta S_{\text{diss}})$ -Korrelation als mittlere Freie Stapelenthalpie pro Nukleobase interpretiert werden kann. Man kann also schreiben $\Delta G_{\text{diss}}(T_m) \approx \Delta G_{\text{Stapel}} \approx \Delta H_{\text{Stapel}} \approx y_0$. Mit 8.33 ± 0.75 kJ/mol (Wildtyp-RNA) und 9.29 ± 0.51 kJ/mol (Mutanten-RNA) passen die y_0 -Werte bemerkenswert gut zu den ΔG_{Stapel} -Werten, die aus DNA- und RNA-Entfaltungstudien abgeleitet wurden [135].

Im Allgemeinen gilt, dass der offene Zustand der Nukleobasen eine höhere Entropie und eine niedrigere Enthalpie als der geschlossene basengepaarte Zustand besitzt. Interessanterweise ist dieser Effekt bei GC-Basenpaaren wesentlich deutlicher ausgeprägt als bei AU- oder GU-Basenpaaren. Tatsächlich lassen sich solche großen Enthalpie- und Entropieänderungen nur durch Solvatationseffekte erklären. Die Basenpaaröffnung, die bei A-Form-RNA-Helices zur großen Furche hin erfolgt, scheint hoch geordnete Wassermoleküle aus der großen Furche zu verdrängen und damit die Entropie des Wassers zu erhöhen und die Enthalpie des Wassers zu verringern.

Die Relevanz der Interaktionen zwischen Lösungsmittel und gelöster Substanz für die RNA-Faltung wurde bereits in früheren Studien untersucht. Auffinger und Westhof [145] führten MD-Simulationen an einer $r(\text{CpG})_{12}$ Duplex-RNA bei 5, 25 und 37°C durch und untersuchten die mittlere Verweildauer der Wassermoleküle in der ersten Hydrathülle. Sie fanden heraus, dass sich die Anzahl der Wassermoleküle in der ersten Hydrathülle von 22 (5°C) auf 17 (37°C) reduzierte. Gleichzeitig verringerten sich die mittleren Verweildauern von 1 ns (5°C) auf 0.5 ns (37°C). Die RNA-Struktur veränderte sich innerhalb dieses Temperaturbereichs (5-37°C) nicht. Abbildung 2.17A, C zeigen die $\Delta G_{\text{diss}}(T)$ -Abhängigkeiten, die durch Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel (H_2O) und gelöster Substanz (RNA) beeinflusst werden. Rufus et al. [143] beschrieb erstmals den Zusammenhang zwischen der Steigung der $\Delta H_{\text{diss}}(\Delta S_{\text{diss}})$ -Korrelation und der Solvatationswechselwirkung. Demzufolge beinhaltet der Ordinatenabschnitt die Wechselwirkungen innerhalb der gelösten Substanz. Entsprechend Gleichung 2-34 stabilisieren die RNA- H_2O -Interaktionen die geschlossene Konformation der

Nukleobase. Diese Stabilisierung kann durch thermodynamisch günstige ΔH_{diss} -Werte erklärt werden, die bei tiefen Temperaturen die ungünstigen $T \cdot \Delta S_{\text{diss}}$ -Werte überwiegen. Dieser stabilisierende Effekt auf ΔG_{diss} nimmt linear mit der Temperatur ab, bis er bei der Temperatur $T=m$ vollkommen verschwunden ist. Bei dieser Temperatur heben sich die stabilisierenden ΔH_{diss} -Werte und die destabilisierenden $T \cdot \Delta S_{\text{diss}}$ -Werte gerade auf.

In Übereinstimmung mit Auffinger und Westhof [145], die eine Änderung der RNA-H₂O-Interaktion deutlich unterhalb des Schmelzpunktes der RNA beobachten konnten, zeigen die hier dargestellten Ergebnisse eine Abschwächung der RNA-H₂O-Interaktion, die vor dem eigentlichen Schmelzvorgang der RNA stattfindet, wie man an den $\Delta G_{\text{diss}}(T)$ -Abhängigkeiten ablesen kann (Abbildung 2.17). Diese Abschwächung tritt bereits bei tiefen Temperaturen auf und ist linear mit der Temperatur korreliert. Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten RNAs gerade dann schmelzen, wenn die stabilisierende RNA-H₂O-Wechselwirkung vollständig verschwunden ist (Abbildung 2.17). Es lässt sich feststellen, dass das Schmelzen des Wassers in der Hydrathülle der RNA vor dem Schmelzvorgang der RNA stattfindet. Dies lässt die Interpretation zu, dass das Schmelzen des Wassers in der Hydrathülle eine Voraussetzung für das Schmelzen der RNA ist.

Bei der Temperatur $T=m$ hat die Hydratation der RNA weder stabilisierende noch destabilisierende Effekte auf die RNA. Deshalb wird bei $T=m$ die Stabilität der RNA alleine durch Interaktionen innerhalb der RNA bestimmt. Diese Interaktionen werden (wie oben diskutiert, [135]) durch die Stapelinteraktionen zwischen den benachbarten Basenpaaren (ΔH_{Stapel}) innerhalb der RNA dominiert. Die Stapelinteraktionen sind für die Kooperativität des Entfaltungsübergangs verantwortlich [137] (siehe 2.3.6). Dies gilt vor allem dann, wenn sich andere relevante Interaktionen wie z. B. die RNA-Lösungsmittel-Interaktionen gerade aufheben (bei $T=m$).

Interessanterweise ändert die A8C-Punktmutation die Steigung der linearen $\Delta H_{\text{diss}}(\Delta S_{\text{diss}})$ -Korrelation. Daraus ergibt sich, dass alle anderen Nukleotide innerhalb der RNA-Helix die Änderung der Steigung erfahren und Ihre ΔH_{diss} - und ΔS_{diss} -

Werte entsprechend anpassen, so dass sie auf der $\Delta H_{\text{diss}}(\Delta S_{\text{diss}})$ -Korrelationsgeraden liegen (Abbildung 2.18A, B). Daraus lässt sich schließen, dass langreichweitige Wechselwirkungen wie die reduzierte Stabilität von G14 im G14-C25 Basenpaar in der Wildtyp-RNA im Vergleich zur Mutanten-RNA durch die Hydratationshülle der RNA vermittelt werden müssen. Grundlage für diese Schlussfolgerung ist die Annahme, dass die Solvatationseffekte die Steigung der $\Delta H_{\text{diss}}(\Delta S_{\text{diss}})$ -Korrelationsgeraden bestimmen [143].

Durch eine Kombination aus NMR-Spektroskopie und CD-Spektroskopie konnte die temperaturabhängige Charakteristik der temperatursensitiven zweiten Helix des *Salmonella* FourU RNA-Thermometers und seiner korrespondierenden temperaturstabileren A8C-Mutante beschrieben werden. Es konnte gezeigt werden, dass Bestimmung der einzelnen Basenpaarstabilitäten der beiden untersuchten RNA-Oligonukleotide die Vorhersage der Schmelzpunkte der RNA-Helices bei höheren Temperaturen möglich macht. Die hier gewonnenen Resultate sind mit den *in vivo* Phänotypen der Wildtyp-RNA und der Mutanten-RNA konsistent [91]. Es konnte gezeigt werden, dass das temperaturabhängige Verhalten der beiden RNAs fundamentalen biophysikalischen Prinzipien gehorcht, die die helikale Stabilität doppelsträngiger RNA in wässriger Lösung im Allgemeinen bestimmen. Lineare $\Delta H_{\text{diss}}(\Delta S_{\text{diss}})$ -Korrelationen sind der Grund, weshalb Basenpaare bei einer definierten Temperatur, die identisch mit der Steigung der entsprechenden $\Delta H_{\text{diss}}(\Delta S_{\text{diss}})$ -Korrelation ist, annähernd gleiche Stabilitäten besitzen. Eben diese Temperatur stimmt mit der Schmelztemperatur für die globale Entfaltung der RNA-Helix überein. Dies ist damit zu erklären, dass gleiche Stabilitäten der Basenpaare innerhalb der RNA-Helix eine Voraussetzung für die kooperative Entfaltung der RNA-Helix sind. Wäre ein einziges Basenpaar wesentlich stabiler als die anderen, würde es die Entfaltung der gesamten RNA-Helix verhindern. Ein solches Verhalten weist auf einen konsekutiven Reißverschlussmechanismus für die RNA-Helix-Entfaltung hin.

2.3.7.1 Signifikanz der Enthalpie-Entropie-Korrelationen (EEK)

Die statistische Signifikanz der Enthalpie-Entropie-Korrelationen kann über Ungleichung 2-1 getestet werden [140].

Ungleichung 2-1

$$T_{hm} - 2\sigma < m < T_{hm} + 2\sigma$$

T_{hm} ist das harmonische Mittel der verschiedenen Temperaturen der Iminoprotonenaustauschraten, m ist die Steigung der $\Delta H_{diss}(\Delta S_{diss})$ -Korrelationsgeraden und σ ist die Standardabweichung von m aus der linearen Regression der $\Delta H_{diss}(\Delta S_{diss})$ -Korrelation. Wenn Ungleichung 2-1 erfüllt ist, ist die beobachtete Korrelation nicht signifikant. Für die Wildtyp-RNA berechnet sich T_{hm} zu 295.06 K und für die Mutanten-RNA berechnet sich T_{hm} zu 297.44 K. Die Steigung für die Wildtyp-RNA ist $m=316$ K und $m=329.6$ K für die Mutanten-RNA. Die Standardabweichung für die Wildtyp-RNA ist $\sigma = 2.1$ K und für die Mutanten-RNA $\sigma = 1.5$ K. Daher lässt sich schreiben

$$290.86 \text{ K} < 299.26 \text{ K} < 316.0 \text{ K} = m \quad (4U\text{-hp2-wt RNA})$$

$$294.44 \text{ K} < 300.44 \text{ K} < 329.6 \text{ K} = m \quad (4U\text{-hp2-A8C-mut RNA})$$

Da Ungleichung 2-1 in beiden Fällen nicht erfüllt ist, sind die beobachteten $\Delta H_{diss}(\Delta S_{diss})$ -Korrelationen eindeutig statistisch signifikant. Tatsächlich liegt für die Wildtyp-RNA die Steigung m 10 Standardabweichungen neben T_{hm} und für die Mutanten RNA 21.44 Standardabweichungen neben T_{hm} . Die Signifikanz ist demnach so deutlich, dass ein statistischer Irrtum ausgeschlossen werden kann.

2.3.8 Thermodynamische Analyse der globalen Entfaltung des Wildtyps sowie zweier Mutanten des FourU RNA-Thermometers

Es wurden die CD-Schmelz- und Rückfaltungskurven analysiert, um die thermodynamischen Parameter ΔH_{entf} , ΔS_{entf} , ΔG_{entf} ($T=20^\circ\text{C}$) sowie den Schmelzpunkt T_m der RNA-Entfaltung zu erhalten (siehe Material und Methoden, 2.2.5). Analysiert wurde die 4U-hp2-wt RNA, die stabilisierende 4U-hp2-A8C Mutante sowie die destabilisierende 4U-hp2-G14A-C25U Doppelmutante. In der Doppelmutante ist das stabile G14-C25 Basenpaar gegen ein A14-U25 Basenpaar ersetzt. Die Ergebnisse der NMR-Spektroskopischen Austauschexperimente zeigten eine außergewöhnlich hohe Stabilität des G14-C25 Basenpaars für die Wildtyp-RNA (siehe Abbildung 2.13, Tabelle 2-4). Eine Mutation dieses stabilen GC-Basenpaars in ein unstabileres AU-Basenpaar sollte demnach zu einer deutlichen Reduktion der thermischen Stabilität der 4U-hp2 RNA führen.

Es wurden CD-Schmelzkurven sowie CD-Rückfaltungskurven der drei RNAs aufgenommen. Die jeweiligen Schmelz- und Rückfaltungskurven wurden gemittelt (die gemittelte Kurve wird im Folgenden als Schmelzkurve bezeichnet). Aus diesen Schmelzkurven wurde entsprechend Gleichung 2-3 der Anteil entfalteter RNA α der jeweiligen RNA in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt. Diese $\alpha(T)$ -Abhängigkeiten sind in Abbildung 2.19A für die Wildtyp-RNA, die A8C-Mutante sowie die G14A-C25U Doppelmutante dargestellt. Aus den erhaltenen $\alpha(T)$ -Kurven wurden über Gleichung 2-4 und Gleichung 2-5 die thermodynamischen Parameter der RNA-Entfaltung bestimmt. Die Ergebnisse für die drei untersuchten RNAs sind in Tabelle 2-7 wiedergegeben. Abbildung 2.19A bestätigt das erwartete temperaturabhängige Verhalten der drei RNAs. Die A8C-Mutante, in der der A8-G31 *mismatch* gegen ein stabiles C8-G31 Basenpaar ersetzt ist, schmilzt deutlich später als die Wildtyp-RNA ($\Delta T_m=11.1^\circ\text{C}$). Die G14A-C25U Doppelmutante hingegen schmilzt früher ($\Delta T_m=5.2^\circ\text{C}$) als die Wildtyp-RNA. Die Ergebnisse der CD-Schmelzkurven sind somit in Übereinstimmung mit *in vivo* Resultaten, die die temperaturabhängige Induktion der Genexpression des FourU RNA-Thermometers beschreiben [91, 146].

Tabelle 2-7 Thermodynamische Parameter ΔH_{entf} , ΔS_{entf} , ΔG_{entf} , sowie T_m der globalen RNA-Entfaltung der Haarnadelschleife 2 des FourU RNA-Thermometers sowie einer stabilisierenden und einer destabilisierenden Mutante.

| | ΔH [kJ/mol] | ΔS [J/(mol*K)] | ΔG [kJ/mol] (T=20°C) | T_m [°C] |
|--------------------------|---------------------|------------------------|---------------------------------|------------|
| Wildtyp | 248.9 | 792.0 | 16.75 | 41.1 |
| G14A-C25U Mutante | 214.2 | 692.9 | 11.05 | 35.9 |
| A8C Mutante | 351.1 | 1079 | 34.81 | 52.2 |

Aus den jeweiligen ΔH_{entf} - und ΔS_{entf} -Werten können die entsprechenden $\Delta G_{\text{entf}}(T)$ -Kurven über die Gibbs-Helmholtz-Gleichung berechnet werden. Diese $\Delta G_{\text{entf}}(T)$ -Kurven für die Wildtyp-RNA und die beiden Mutanten sind in Abbildung 2.19B dargestellt. Die Kurven weisen einen Schnittpunkt bei $T_K=81.8^\circ\text{C}$ auf. Bei dieser Temperatur besitzen alle drei RNAs mit $\Delta G_{\text{entf}}(81.8^\circ\text{C}) = -31.94$ kJ/mol die gleiche Stabilität. Bei dieser Kompensationstemperatur T_K liegt das Gleichgewicht zwischen gefalteter und entfalteter Konformation weit auf der Seite der entfalteten RNA. Der Schnittpunkt der $\Delta G_{\text{entf}}(T)$ -Kurven ist eine Folge der linearen Enthalpie-Entropie-Korrelation der globalen RNA-Entfaltung. Diese Enthalpie-Entropie-Korrelation ist in Abbildung 2.19C dargestellt. Die Steigung der $\Delta H_{\text{entf}}(\Delta S_{\text{entf}})$ -Korrelation beträgt $m=354.9\text{K}$ und der Ordinatenabschnitt beträgt $y_0=-31.95$ kJ/mol \pm 0.95 kJ/mol.

Abbildung 2.19D zeigt, dass für die globale Entfaltung der 4U-hp2 RNA ebenfalls eine strikte lineare Korrelation von ΔG_{entf} und ΔH_{entf} existiert. Die Steigung dieser Korrelationen ist temperaturabhängig und ist in Abbildung 2.19D für eine Temperatur von 20°C dargestellt.

Einsetzen der Enthalpie-Entropie-Korrelation in die Gibbs-Helmholtz-Gleichung ergibt die folgende Gleichung.

Gleichung 2-35

$$\Delta G_{\text{entf}} = (m - T) * \Delta S_{\text{entf}} + y_0$$

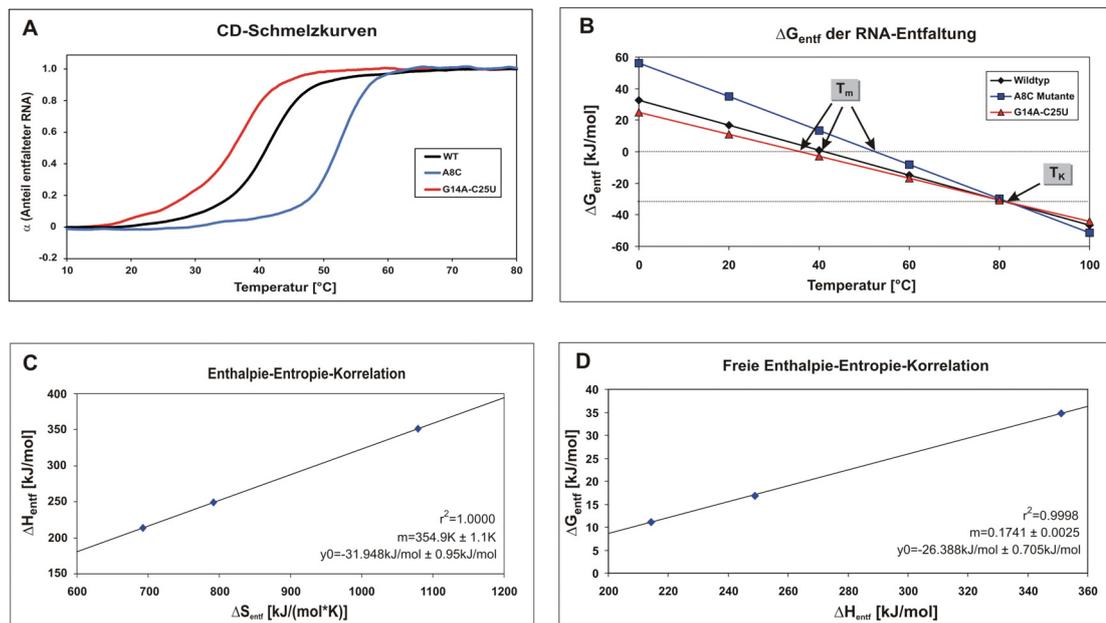


Abbildung 2.19 (A) Anteil α entfalteter RNA errechnet aus den CD-Schmelzkurven der 4U-hp2-wt RNA (schwarze Linie), der 4U-hp2-A8C Mutanten-RNA (blaue Linie) und der 4U-hp2-G14A-C25U Doppelmutanten-RNA (rote Linie). Der Anteil entfalteter RNA α wurde über Gleichung 2-3 berechnet. (B) $\Delta G_{\text{entf}}(T)$ -Funktionen für die globale Entfaltung der 4U-hp2-wt RNA (schwarz), der A8C Mutanten-RNA (blau) und der G14A-C25U Doppelmutante (rot). $\Delta G_{\text{entf}}(T)$ -Werte wurden aus den dazugehörigen ΔH_{entf} - und ΔS_{entf} -Werten über die Gibbs-Helmholtz-Gleichung berechnet. T_m gibt den jeweils unterschiedlichen Schmelzpunkt ($\alpha=0.5$) der RNAs wieder. $T_K=354.9$ K ist die Kompensationstemperatur, bei der alle drei RNAs die gleiche Stabilität besitzen. (C) Enthalpie-Entropie-Korrelation der globalen RNA-Entfaltung bestimmt anhand der drei untersuchten RNAs. (D) Freie Enthalpie-Entropie-Korrelation der globalen RNA-Entfaltung ($T=20^\circ\text{C}$) bestimmt anhand der drei untersuchten RNAs. Die linearen Korrelationen in (C) und (D) wurden linear entsprechend der Gleichung $f = y_0 + mx$ gefittet. Die Resultate der Fits sind in den entsprechenden Abbildungen (C) und (D) wiedergegeben.

An der Kompensationstemperatur ($T_K = m$) heben sich Enthalpie und Entropie Beiträge der RNA-Lösungsmittel-Interaktionen gerade auf [143, 144], es verbleiben also lediglich die Wechselwirkungen innerhalb der RNA selbst.

Die Helix-Entfaltung kann nach Searle und Williams [135] über Gleichung 2-33 (Seite 2-80) beschrieben werden. Daraus ergibt sich für die Kompensationstemperatur T_K die folgende Beziehung

Gleichung 2-36

$$\Delta G_{\text{entf}}(T_K) = y_0 \approx \Delta H_{\text{Stapel}} - T * \Delta S_{\text{Rotation}}$$

$\Delta G_{\text{entf}}(T_K)$ wird näherungsweise über den Entropiegewinn, der hauptsächlich durch den Gewinn an Rotationsfreiheit $\Delta S_{\text{Rotation}}$ des RNA-Rückgrats verursacht wird, und den Verlust der Stapelwechselwirkung ΔH_{Stapel} zwischen den Nukleobasen bestimmt. Bei der Kompensationstemperatur überwiegt $\Delta S_{\text{Rotation}}$ deutlich über ΔH_{Stapel} , so dass die RNA fast vollständig in entfalteter Form vorliegt.

2.3.9 Nachweis und Lokalisierung von Mg^{2+} -Bindestellen innerhalb des FourU RNA-Thermometers

2.3.9.1 Mg^{2+} -Titration der 4U-hp2-wt RNA

Mg^{2+} -Titrations der 4U-hp2-wt RNA wurden bei 10°C durchgeführt, um die Bindung der Mg^{2+} -Ionen an die RNA genauer zu charakterisieren. Abbildung 2.20D zeigt Verschiebungen der Iminosignale im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC von U5 und U13 aufgrund der Zugabe von MgCl_2 . Die Abhängigkeit der CSPs der Iminosignale von der $c(\text{Mg}^{2+})/c(\text{RNA})$ Rate ist in Abbildung 2.20A, B, C dargestellt. Die Fits dieser Abhängigkeiten entsprechend Gleichung 2-26 sind als durchgezogene Linien wiedergegeben. Tabelle 2-8 fasst die Fitresultate der CSPs zusammen. Angegeben sind jeweils der Betrag der CSPs bei maximaler Mg^{2+} -Konzentration (CSP_{max}) sowie die Dissoziationskonstante K_{diss} . Interessanterweise zeigen nicht alle Iminosignale den gleichen K_{diss} -Wert. Die niedrigsten K_{diss} -Werte finden sich für U4 (0.85 ± 0.18 mM), U12 (0.95 ± 0.11 mM) und G14 (1.17 ± 0.12 mM). Die K_{diss} -Werte für U5, G6 und U13 liegen bei ca. 2.34 mM und die K_{diss} -Werte für U23 und U24 liegen bei ca. 3.56 mM. Den mit Abstand größten CSP_{max} -Wert besitzt U13 (0.250 ± 0.008 ppm). Alle anderen Iminosignale weisen wesentlich geringere CSPs auf.

Mehrere Konformationen eines $[\text{RNA} * \text{Mg}^{2+}]$ -Komplexes und die Annahme einer einzigen Mg^{2+} -Bindestelle können die unterschiedlichen K_{diss} -Werte sowie die biphasischen CSP-Kurven nicht erklären. Die unterschiedlichen K_{diss} -Werte sind nur mit unterschiedlichen Mg^{2+} -abhängigen Effekten zu erklären. Es ist denkbar, dass

zusätzlich zu einer hochaffinen Bindestelle noch zwei (oder mehr) niederaffine Bindestellen existieren. Es ist allerdings ebenso möglich, dass die niederaffinen Effekte nicht durch Mg^{2+} -Bindung sondern durch strukturelle Änderungen der RNA hervorgerufen werden, die durch Änderung der Ionenstärke oder Änderung der Wasserstruktur hervorgerufen werden, welche wiederum abhängig von der Mg^{2+} -Konzentration sind. Allerdings ist die Existenz von niederaffinen Mg^{2+} -Bindestellen wahrscheinlicher, da Änderungen der Wasserstruktur erst bei höheren Ionenkonzentrationen erwartet werden und Änderungen der Ionenstärke bei den gegebenen Pufferbedingungen (25 mM KCl, 15 mM $K_xH_yPO_4$) ebenfalls erst bei höheren Mg^{2+} -Konzentrationen einen Effekt haben sollten.

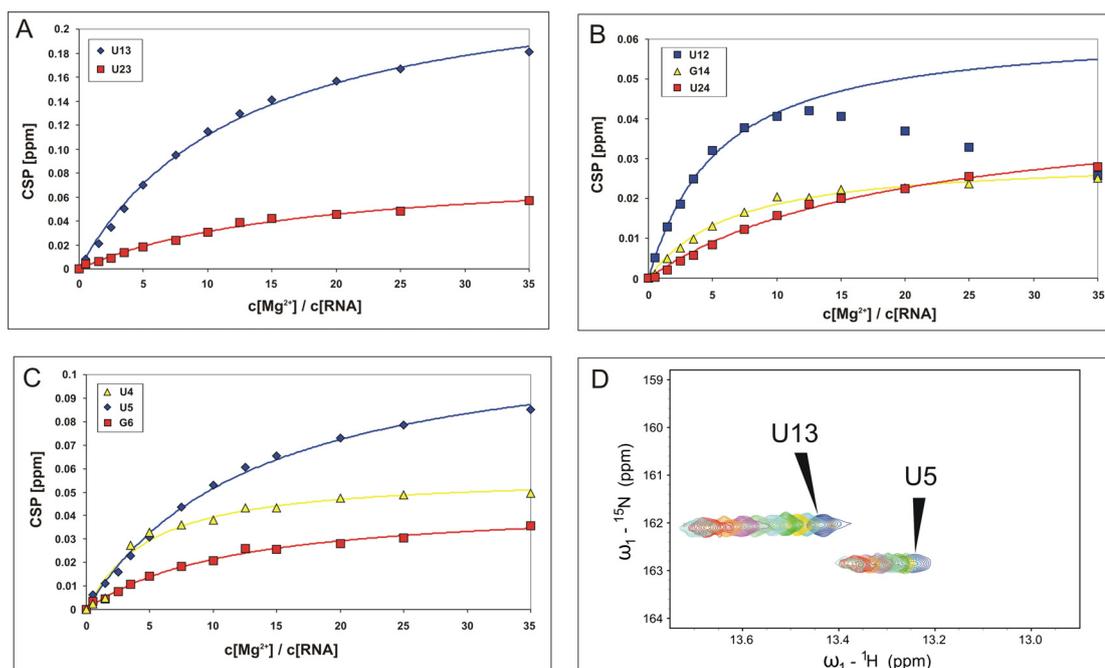


Abbildung 2.20 CSPs der Iminogruppen der Nucleobasen der 4U-hp2-wt RNA ausgelöst durch Zugabe von $MgCl_2$ bei einer Temperatur von $10^\circ C$. (**A**, **B**, **C**) Gezeigt sind jeweils die Datenpunkte der Mg^{2+} -Titration für einzelne Nucleobasen sowie der entsprechende Fit mit Gleichung 2-26. (**D**) Ausschnitt der Iminoregion des $[^1H, ^{15}N]$ -HSQCs aufgenommen bei $10^\circ C$ und einer B_0 -Feldstärke von 900 MHz. Gezeigt ist eine Überlagerung der Spektren der Mg^{2+} -Titrationsschritte, um die CSPs sichtbar zu machen. Die gezeigten Mg^{2+} -Titrationsschritte sind: 0 mM; 0.3 mM; 0.5 mM; 0.7 mM, 1.0 mM, 1.5 mM, 2.0 mM, 3.0 mM, 5.0 mM, 7.0 mM.

Tabelle 2-8 Durch Zugabe von MgCl_2 ausgelöste CSPs der Iminogruppen der Nucleobasen der 4U-hp2-wt RNA. Die CSP_{max} - und K_{diss} -Werte wurden aus den Fits der CSP-Kurven mit Gleichung 2-26 erhalten. CSP_{max} : CSP bei unendlicher Mg^{2+} -Konzentration; K_{diss} : Dissoziationskonstante

| | CSP_{max} [ppm] | K_{diss} [mM] |
|----------------|---------------------------------|-------------------------------|
| U4 | 0.057 ± 0.003 | 0.85 ± 0.18 |
| U5 | 0.119 ± 0.004 | 2.51 ± 0.19 |
| G6 | 0.045 ± 0.002 | 2.12 ± 0.21 |
| U33 | ./. ^c | ./. ^c |
| U32 | ./. ^a | ./. ^a |
| G30 | ./. ^a | ./. ^a |
| U10 | ./. ^b | ./. ^b |
| U11 | ./. ^b | ./. ^b |
| G27/G28 | ./. ^b | ./. ^b |
| U12 | 0.063 ± 0.003 | 0.95 ± 0.11 |
| U13 | 0.250 ± 0.008 | 2.38 ± 0.16 |
| G14 | 0.030 ± 0.001 | 1.17 ± 0.12 |
| U24 | 0.045 ± 0.003 | 3.77 ± 0.42 |
| U23 | 0.085 ± 0.005 | 3.34 ± 0.36 |

a: Iminosignale zu schwach oder nicht detektierbar

b: kein CSP

c: kein fit möglich

Das ^1H -2D-NOESY in Anwesenheit von $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, die PRE-Effekte und die Analyse der durch Mg^{2+} -Zugabe ausgelösten CSPs ergeben somit ein differenziertes Bild der Mg^{2+} -Bindung an die 4U-hp2-wt RNA.

Das ^1H -2D-NOESY in Anwesenheit von $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ weist auf **eine** *outer sphere* Mg^{2+} -Bindestelle der 4U-hp2-wt RNA in der Region der Nucleobasen U11, U12, G27, G28 hin (siehe Abschnitt 2.3.9.3). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass weitere *inner sphere* Mg^{2+} -Bindestellen existieren. Die Mg^{2+} -Titrationsexperimente ergeben eine Bindungskonstante für die *outer sphere* Mg^{2+} -Bindestelle von $\text{K}_{\text{diss}} = 0.99$ mM. Die PRE-Daten in Anwesenheit von Mn^{2+} weisen ebenfalls auf die mit $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ detektierte *outer sphere* Mg^{2+} -Bindestelle zwischen U11, U12, G27 und G28 hin (siehe Abschnitt 2.3.9.2). Für eine weitere Mg^{2+} - bzw. Mn^{2+} -Bindestelle liefern die PRE-Daten keine Indizien. Allerdings ist es möglich, dass weitere schwächere *inner sphere* Bindestellen existieren, die einen geringeren PRE-Effekt auslösen. Liegen diese Bindestellen im Bereich der hochaffinen *outer sphere* Mg^{2+} -Bindestelle, wird der schwache PRE-Effekt zusätzlicher niederaffiner Mg^{2+} -Bindestellen überlagert. Die Mg^{2+} -Titrationsexperimente weisen hingegen auf zwei

weitere Mg^{2+} -Bindestellen hin, die K_{diss} -Werte von 2.34 mM und 3.56 mM besitzen. Bei diesen Bindestellen muss es sich um *inner sphere* Bindestellen handeln, da weitere *outer sphere* Bindestellen ausgeschlossen werden können. Da alle Kurven in Abbildung 2.20 einen hyperbolen Verlauf haben, können allosterische Effekte zwischen den drei Mg^{2+} -Bindestellen ausgeschlossen werden. Eine genaue Lokalisation der niederaffinen Bindestellen ist nicht zweifelsfrei möglich, da die Effekte über das gesamte RNA-Molekül verteilt sind. Da U23 und U24 die Bindestelle mit einem K_{diss} von 3.56 mM registrieren, wird vermutet, dass sich diese niederaffine Bindestelle in der *loop*-Region des RNA-Moleküls befindet.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die 4U-hp2-wt RNA eine *outer sphere* Mg^{2+} -Bindestelle in räumlicher Nähe zu U11, U12, G27 und G28 besitzt. Diese Bindestelle ist ebenso eine Bindestelle für ein *outer sphere* koordiniertes Mn^{2+} -Ion sowie ein $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ -Ion. Die verschiedenen K_{diss} -Werte der MgCl_2 -Titrationsexperimente lassen auf mindestens zwei weitere niederaffine *inner sphere* Mg^{2+} -Bindestellen mit K_{diss} -Werten von 2.34 mM und 3.56 mM schließen, die allerdings nicht genau lokalisiert werden können.

2.3.9.2 Lokalisierung der Mg^{2+} -Bindestelle der 4U-hp2-wt RNA über Analyse der Linienverbreiterungen ausgelöst durch paramagnetische Mn^{2+} -Ionen

Um den PRE-Effekt zu quantifizieren, wurden $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -HSQCs der Iminoregion einer 4U-hp2-wt RNA-Probe aufgenommen. Die Probe beinhaltete 300 μM RNA in NMR-Puffer (15 mM $\text{K}_x\text{H}_y\text{PO}_4$ (pH6.5), 25 mM KCl, 90% H_2O und 10% D_2O) und zusätzlich 5 mM MgCl_2 . Die Spektren wurden bei 10°C einmal ohne MnCl_2 und einmal in Anwesenheit von 4 μM MnCl_2 aufgenommen. Die Akquisitionsparameter waren für beide aufgenommenen $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren gleich. Die Linienbreiten in der ^{15}N -Dimension ebenso wie die Signalintensitäten wurden mit Sparky 3.1.1.3 extrahiert. Abbildung 2.21 zeigt die Linienbreitenveränderungen $\Delta\nu$ der ^{15}N -Iminoresonanzen sowie die Intensitätsunterschiede der Iminosignale, die sich durch die Zugabe von 4 μM Mn^{2+} -Ionen zur

4U-hp2-wt RNA-Probe ergaben. Die Linienbreiten des Doppelsignals G27/G28 wurden nicht analysiert. Die Nukleobasen U32 und U31 haben keine Iminosignale, das Signal von G30 ist zu schwach für eine Analyse. Die Signale von U4 und U33 zeigen in Anwesenheit von 5 mM Mg^{2+} ungewöhnliche Linienformen, die vermutlich durch konformationellen Austausch, ausgelöst durch Mg^{2+} , entstehen (nicht gezeigt). Außerdem sind diese Signale relativ schwach, weshalb eine Analyse der Linienbreite für diese Signale nicht möglich ist.

Die Analyse von Intensitäts- sowie Linienbreitenveränderungen sind zueinander konsistent (Abbildung 2.21). Die größten Veränderungen zeigen das Doppelsignal G27/G28 sowie die Signale der in der RNA-Doppelhelix gegenüberliegenden Nukleobasen U11 und U12. Die Nukleobasen U13 und G14 zeigen ebenfalls noch erhöhte R_{2e} -Relaxation, wohingegen die Nukleobase U10 einen sehr geringen PRE-Effekt aufweist.

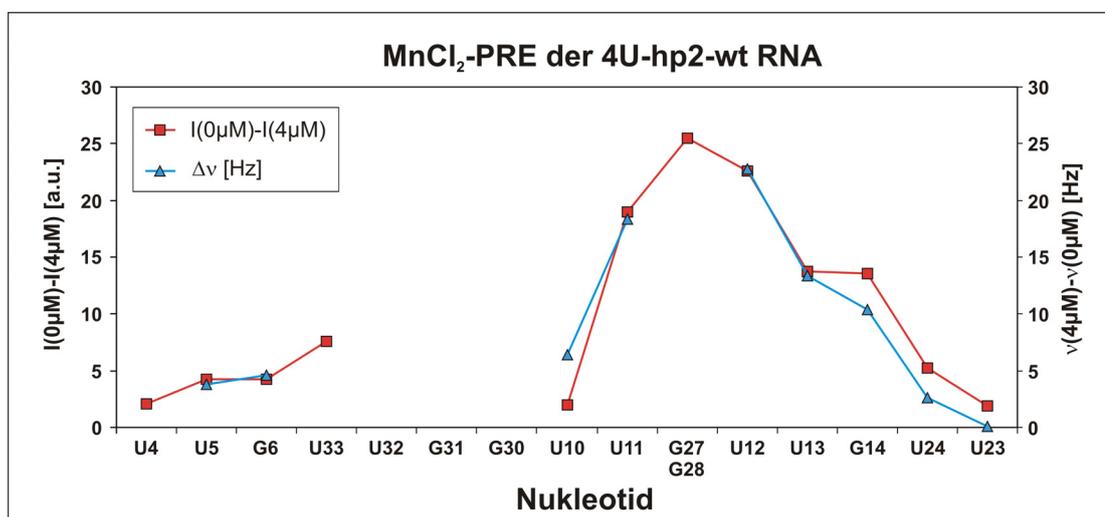


Abbildung 2.21 PRE der Iminosonanzen der 4U-hp2-wt RNA hervorgerufen durch die Zugabe von $4\mu M$ $MnCl_2$. Die Linienbreitenveränderungen der ^{15}N -Dimension $\Delta\nu$ sind in blau dargestellt, die Differenz der Intensitäten in rot.

Die PRE-Analyse zeigt die Existenz einer Mn^{2+} -Bindestelle innerhalb der 4U-hp2-wt RNA auf. Die Bindestelle befindet sich in der Region zwischen den Nucleobasen U11-U12 bzw. G27/G28. Die Existenz dieser Mn^{2+} -Bindestelle ist ein starkes Indiz für eine Mg^{2+} -Bindestelle an derselben Stelle der 4U-hp2-wt RNA.

2.3.9.3 Lokalisierung von Mg^{2+} -Bindestellen mit Hilfe von $Co(NH_3)_6^{3+}$

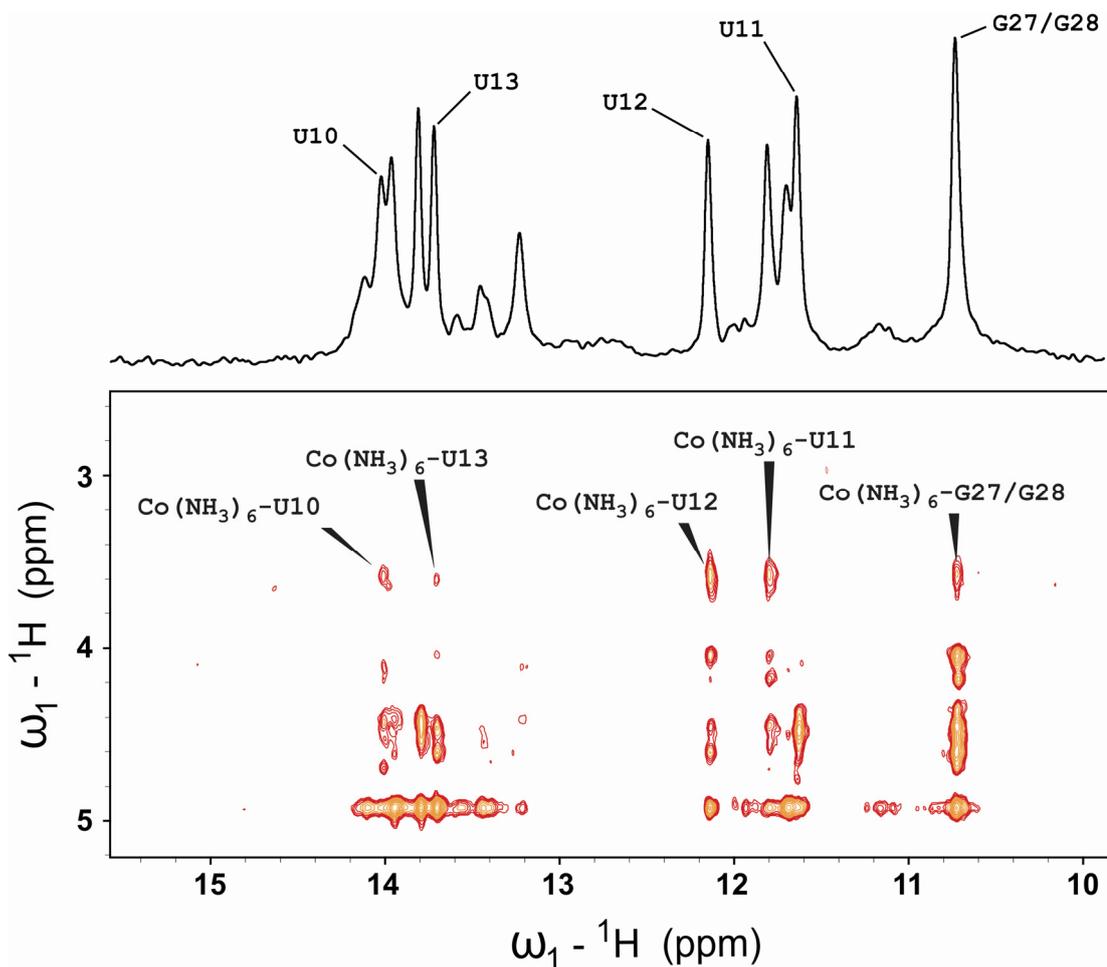


Abbildung 2.22 Ausschnitt aus dem 2D- 1H Watergate NOESY einer 0.9 mM 4U-hp2-wt RNA-Probe in Anwesenheit von 5 mM $Co(NH_3)_6^{3+}$. Die Kreuzsignale zwischen den Protonen des Kobalthexammins und den Iminoprotonen der RNA sind entsprechend zugeordnet. Über dem NOESY-Spektrum ist die Iminoregion eines 1H -1D NMR-Spektrums gezeigt. Pufferzusammensetzung: 15 mM $K_xH_yPO_4$ (pH6.5), 25 mM KCl, 90% H_2O und 10% D_2O .

Abbildung 2.22 zeigt einen Ausschnitt des 2D- ^1H -NOESY-Experiments der 4U-hp2-wt RNA in Anwesenheit von $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ -Ionen. Die Protonen des freien Kobalthexamins zeigen starke NOEs zu den Iminoprotonen der Nucleobasen U11, U12, G27 und/oder G28 sowie schwache NOEs zu den Iminoprotonen von U10 und U13. Dies lässt darauf schließen, dass sich die Bindestelle des Kobalthexamins an die RNA-Helix zwischen U11 und U12 bzw. G27 und G28 befindet. Ein Vergleich mit anderen bekannten Kobalthexamin-Bindestellen an aufeinanderfolgenden GU-Basenpaaren lässt vermuten, dass das Kobalthexamin-Ion an bestimmte funktionelle Gruppen der Nucleobasen koordiniert ist [147]. Als potentielle Bindungspartner kommen hier vor allem die Atome N7 und O6 der Guanine G27 und G28 sowie die O4-Atome der Nucleobasen U11 und U12 in Frage. Alle diese Atome sind der großen Furche der RNA zugewandt und sind prinzipiell in der Lage Wasserstoffbrücken mit den Protonen des Kobalthexamins einzugehen, ähnlich wie dies für die Struktur der P5b-Haarnadelschleife des Gruppe I Introns gezeigt werden konnte (Abbildung 2.23) [147].

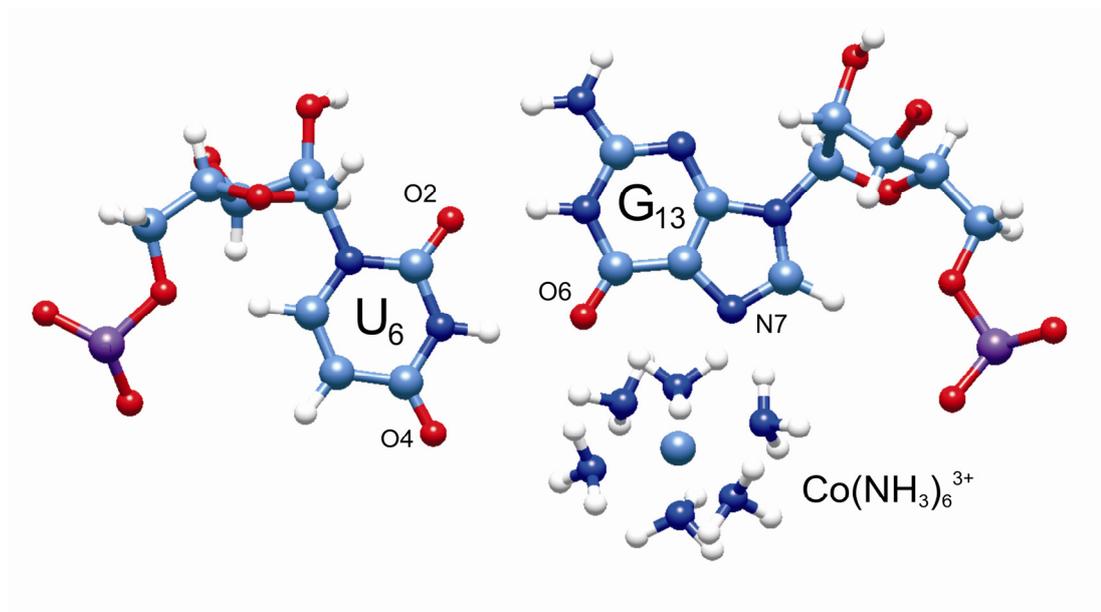


Abbildung 2.23 U6-G13 Basenpaar aus der Struktur der P5b-Haarnadelschleife des Gruppe I Introns (pdb 1D 1AJF) [147] im Komplex mit dem $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ Ion.

2.3.9.4 Bestimmung der Mg^{2+} -Dissoziationskonstante K_{Mg} mittels CD-Spektroskopie

Es wurde die Mg^{2+} -Abhängigkeit des Schmelzpunktes T_m der 4U-hp2-wt RNA mittels CD-Spektroskopie bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.8.4). Hierzu wurde der Schmelzpunkt für folgende MgCl_2 -Konzentrationen bestimmt: 0 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 0.75 mM, 1.0 mM, 1.5 mM, 2.0 mM, 3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM. Die RNA-Konzentration betrug dabei 25 μM . Die $T_m(\text{Mg}^{2+})$ -Abhängigkeit sowie deren Fit mit Gleichung 2-31 ist in Abbildung 2.24 dargestellt. Die Resultate des Fits sind in Tabelle 2-9 zusammengefasst.

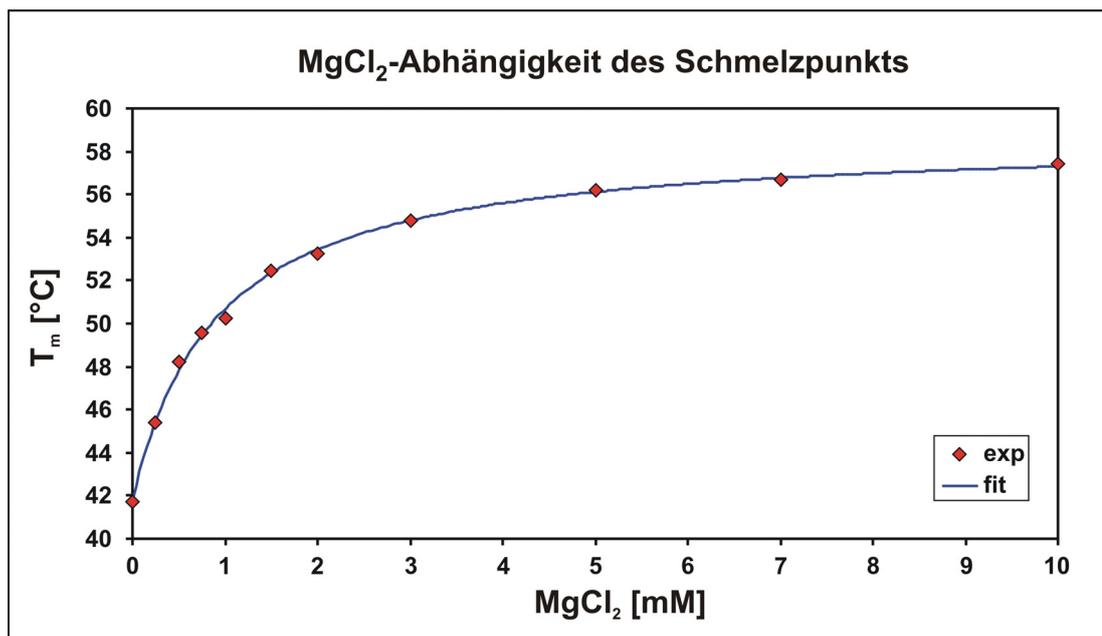


Abbildung 2.24 Abhängigkeit des Schmelzpunktes T_m der 4U-hp2-wt RNA von der MgCl_2 -Konzentration. Die Datenpunkte sind in rot und der entsprechende Fit nach Gleichung 2-32 in blau dargestellt.

Tabelle 2-9 Resultate des Fits der $T_m(\text{Mg}^{2+})$ -Abhängigkeit der 4U-hp2-wt RNA nach Gleichung 2-31 bzw. Gleichung 2-32.

| 4U-hp2-wt | T_m^{noMg} [°C] | $\Delta T_{m,max}$ [°C] | K_{Mg} [μM] | ΔG_{Mg} [J/mol] |
|-------------|-------------------|-------------------------|------------------|-------------------------|
| Absolutwert | 41.77 | 16.93 | 899 ^a | -18860 |
| Fehler | 0.22 | 0.25 | 47.9 | 143 |

^a K_{Mg} wurde für eine Temperatur von 50.24°C berechnet

Die NMR-Experimente weisen auf eine starke und mehrere (zwei oder mehr) schwache Mg^{2+} -Bindestellen hin. Die mit CD-Spektroskopie bestimmte $T_m(\text{Mg}^{2+})$ -Abhängigkeit (Abbildung 2.24) lässt sich mit einem Modell, das nur eine Bindungskonstante annimmt, beschreiben. Dies mag daran liegen, dass höhere K_{Mg} -Werte eine flachere Kurve sowie eine kleineres $\Delta T_{m,max}$ hervorrufen würden. Folglich ist der Effekt schwacher Mg^{2+} -Bindestellen auf T_m möglicherweise zu schwach, um zu deutlichen Abweichungen von Gleichung 2-32 zu führen. Trotzdem besteht die Möglichkeit, dass der apparente K_{Mg} -Wert aufgrund zusätzlicher schwacher Mg^{2+} -Bindestellen zu kleineren Werten hin verschoben ist. Die apparente K_{Mg} -Konstante ist demnach niedriger als die der stärksten Mg^{2+} -Bindestelle.

Wenn man die apparente Bindungskonstante K_{Mg} für eine Temperatur von 10°C ausrechnet, indem man die Temperaturabhängigkeit von ΔG_{Mg} vernachlässigt, so erhält man einen Wert von $K_{Mg}=332 \mu\text{M}$. Dieser Wert liegt deutlich niedriger als der Wert der Bindungskonstante der stärksten Mg^{2+} -Bindestelle, die NMR-spektroskopisch identifiziert werden konnte (siehe Tabelle 2-8). Im Umkehrschluss ist diese Abweichung also ein starkes Indiz für die Existenz weiterer schwacher Mg^{2+} -Bindestellen in der 4U-hp2-wt RNA.

3 Dynamische Untersuchungen am Phosphodiester-rückgrat einer perdeuterierten cUUCGg-tetraloop-RNA mittels ^{31}P -NMR-Relaxationsanalyse

3.1 Einleitung

In vielen Fällen stehen die Aufgaben, die RNA-Oligonukleotide übernehmen, in Beziehung zu den vielfältigen funktionellen Dynamiken, die an diesen RNA-Molekülen beobachtet werden können [55, 148]. Zum Beispiel sind bistabile RNAs in der Lage, unterschiedliche Konformationen von beinahe gleicher Stabilität anzunehmen [61, 65, 149-153]. Riboswitch-RNAs, die an der transkriptionellen und translatorischen Regulation der Genexpression beteiligt sind, zeigen sowohl lokale als auch langreichweitige konformationelle Änderungen, die durch das Binden eines spezifischen Metaboliten an die RNA ausgelöst werden [85, 154-157]. RNA-Thermometer messen die Umgebungstemperatur, indem Doppelhelixbereiche bei bestimmten Temperaturen aufschmelzen, wodurch die Translation des nachgeschalteten Gens initiiert wird [86, 90, 91]. Die pharmakologisch interessante TAR-RNA ist in der Lage, verschiedene Konformationen anzunehmen, von denen viele tatsächlich populiert werden, wenn sich die RNA im freien Zustand befindet [53, 158, 159].

RNA-Dynamik findet auf sehr unterschiedlichen Zeitskalen statt. Vibrationen und Winkelfluktuationen treten im Bereich von Pikosekunden auf, währenddessen katalytische Funktionen und globale Umfaltungen im Sekundenbereich stattfinden [65, 153]. Molekulardynamische Simulationen bieten eine genaue Beschreibung der dynamischen Trajektorie, aus der dynamische Parameter extrahiert werden können [160-165]. NMR-Spektroskopie ist in der Lage, Dynamiken im niedrigen Nanosekundenbereich zu charakterisieren, die schneller sind als die globale Rotationskorrelationszeit. Dafür ist es erforderlich, heteronukleare Relaxationsexperimente durchzuführen (R_1 -, R_2 -, und $R_{1\rho}$ -Raten sowie den heteronuklearen Gleichgewichts-NOE). Supra- τ_c Bewegungen sind über die

Messung von residualen dipolaren Kopplungen (RDC) zugänglich. Die Dynamik im Subnanosekundenbereich kann auf Basis von NMR-Relaxationsmessungen mit Hilfe des sogenannten Modelfree Formalismus analysiert werden. Diese aus NMR-Messungen extrahierten S_{LS}^2 -Ordnungsparameter können mit S_{LS}^2 -Ordnungsparametern verglichen werden, die aus der Analyse von MD-Trajektorien resultieren [166-168]. Wenn diese Lipari-Szabo Ordnungsparameter bekannt sind, ist es möglich, Subnanosekundendynamik von supra- τ_c Bewegung zu trennen, indem man den S_{LS}^2 -Ordnungsparameter mit dem aus RDC-Daten extrahierten S_{RDC}^2 -Ordnungsparameter vergleicht. Dabei sollte immer $S_{LS}^2 \geq S_{RDC}^2$ gelten.

Eine Vielzahl von Methoden zur Untersuchung der dynamischen Eigenschaften von RNA wurde bisher entwickelt. Dazu gehören Techniken, um die ^{13}C -Relaxation in kleinen, einheitlich ^{13}C -markierten RNAs [169-171] und in großen spezifisch ^{13}C -markierten RNAs [172, 173] zu bestimmen sowie Methoden zur Messung der Relaxationsdispersion [170, 174-177]. Messungen der Relaxations-eigenschaften an spezifisch selektiv-markierten ^{13}C -Kernen [178-182], einheitlich ^{13}C -angereicherten Proben [183, 184] oder Messungen an ^{13}C -Kernen bei natürlicher Häufigkeit [185-187] konnten bisher durchgeführt werden, um die Dynamiken der individuellen Ribosereste und Nukleobasen von RNAs zu untersuchen. ^{15}N -Relaxationsmessungen in einheitlich ^{15}N -markierter RNA konnten unter Anwendung von an Proteinen etablierten Methoden erfolgreich durchgeführt werden [188]. Allerdings sind Messungen der ^{15}N -Relaxationseigenschaften beschränkt auf Iminoresonanzen, die an Wasserstoffbrückenbindungen partizipieren, da andernfalls der Austausch mit dem Lösungsmittel (H_2O) zu schnell ist. Folglich sind instabile Bereiche der RNA mit dieser Methode nicht zugänglich.

Über Messungen der ^{31}P -Relaxationsraten in RNA lassen sich Informationen über die Dynamik des Phosphodiesterückgrats ableiten. Solche Untersuchungen wurden bisher für die Summe aller ^{31}P -Kerne der sich in vollständigen Viruspartikeln befindlichen RNA durchgeführt [189, 190]. Andere Studien beschäftigten sich mit dem Relaxationsverhalten der Summe der ^{31}P -Kerne von Ribosomen [191]. In diesem Kapitel werden nun erstmalig orts aufgelöst die Relaxationseigenschaften

individueller ^{31}P -Kerne einer 14mer-Haarnadelschleifen-RNA untersucht. Hierfür wurde die cUUCGg-*tetraloop*-RNA, die ein häufig vorkommendes RNA-Motiv von außergewöhnlicher Stabilität ($T_m \sim 70^\circ\text{C}$) darstellt, verwendet. Dieses cUUCGg-Motiv war bereits Gegenstand umfangreicher NMR-spektroskopischer [192-195] und kristallographischer Studien [196].

Eine ganze Reihe von Relaxationsanalysen für das UUCG-*tetraloop*-Motiv wurden bisher berichtet. Akke et al. (1997) analysierten die Subnanosekunden Dynamiken der Iminoresonanzen der cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA bei 273 K. Dabei konnten S_{LS}^2 -Ordnungsparameter von 0.75-0.8 aus den ^{15}N -Relaxationsdaten von allen (^1H - ^{15}N)-Bindungsvektoren, die sich in stabilen Wasserstoffbrücken befinden, extrahiert werden. Eine Modelfree Analyse wurde ebenfalls auf der Basis von ^{13}C -Relaxationsdaten der aromatischen C6H6/C8H8-Bindungsvektoren als Reporter für die Nukleobasen und der C1'H1'-Bindungsvektoren als Reporter für die Zuckerreste durchgeführt [168, 169]. Die dabei bestimmten S_{LS}^2 -Ordnungsparameter liegen zwischen 0.87 und 0.99 für die Nukleobasen des A-Form-helikalen Abschnitts der RNA. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 298 K durchgeführt. Die C1'H1'-Bindungsvektoren des helikalen Bereichs der RNA sind mit S_{LS}^2 -Ordnungsparametern zwischen 0.90 und 0.94 gut definiert, währenddessen die Reste des *loops* genau wie die Reste G1 und C14 mit S_{LS}^2 -Ordnungsparametern zwischen 0.84 und 0.89 geringfügig flexibler sind. Im UUCG-*tetraloop* ist U7 ($S^2 = 0.68$) flexibler als der Rest der Nukleobasen. Diese Resultate können mit Hilfe von MD-Simulationen der cUUCGg-*tetraloop*-RNA reproduziert werden [168, 197]. Shajani et al. führten ^{13}C -Relaxationsexperimente an den C5/C6/C8- und den C1'-Kernen an einer unterschiedlichen RNA durch, die aber trotzdem einen cUUCGg-*tetraloop* trug [170]. Unter der Verwendung eines isotropen Modells für die Rotationsdiffusion wurden S^2 -Ordnungsparameter von ca. 0.9 für die Ribosereste bei einer Temperatur von 298 K bestimmt. Die Nukleobasen des A-Form-helikalen Bereichs der RNA zeigen ebenfalls S^2 -Ordnungsparameter von etwa 0.9. Für die *loop* Nukleobasen ist die Variation der S^2 -Ordnungsparameter mit Werten zwischen 0.66-1.0 stärker ausgeprägt. In einer darauffolgenden zweiten Studie, wurden die S^2 -

Ordnungsparameter auf der Grundlage von neueren ^{13}C -CSA-Werten, die aus Flüssigkristallmessungen abgeleitet wurden, neu bestimmt [171]. Diese neueren S^2 -Ordnungsparameter lagen nun zwischen 0.94 (erste Uracilbase im *loop*) und 0.73 (zweite Uracilbase im *loop*). Diese neueren Werte ähneln damit stark den S^2 -Ordnungsparametern, die von Ferner et al. (2008) publiziert wurden. Hall und ihre Mitarbeiter analysierten mit experimentellen (UV-Schmelzkurven) und *in silico* Methoden die Effekte einer 2'-Ribosesubstitution im Hinblick auf die thermodynamische Stabilität des UUCG-*tetra*loops [161, 162, 198]. Hierbei konnte die wichtige Rolle der 2'-Hydroxylgruppe des ersten *loop*-Uridins auf die thermodynamische Stabilität des UUCG-*tetra*loops nachgewiesen werden.

Ein Hindernis bei der Interpretation von ^{31}P R_1 - und R_2 -Relaxationsraten ist die Tatsache, dass in protonierten RNA-Proben jedes Phosphoratom ein dipolares Feld mehrerer Protonen spürt, die drei oder vier frei rotierbare Bindungen entfernt sind. Aus diesem Grund ist der dipolare Beitrag zur Relaxation abhängig von der Konformation des Phosphodiesterückgrats und deshalb schwer zu quantifizieren. Um dieses Problem zu umgehen, haben wir unsere Relaxationsmessungen an einer perdeuterierten RNA-Probe durchgeführt. Ein weiteres Problem ist, dass die ^{31}P -CSA-Tensorgröße und -orientierung nicht genau genug bekannt sind. Aus diesem Grund wurden hier Festkörper-NMR-Messungen unter verschiedenen Salz- und Hydratationsbedingungen durchgeführt. Ziel war es hierbei, die drei Tensorachsen des diagonalisierten CSA-Tensors im statischen Zustand, also ohne dynamische Beiträge, zu bestimmen. Der auf diese Weise extrahierte CSA-Wert wurde schließlich als Grundlage für die Modelfree Analyse der ^{31}P -Relaxationsdaten verwendet. Die Analyse lieferte orts aufgelöste Informationen über schnelle Dynamiken des Phosphodiesterückgrats der 14mer-Haarnadelschleifen-RNA.

3.2 Methoden

3.2.1 Probenpräparation

Flüssig-NMR-Messungen wurden an einer einheitlich ^2H -markierten cUUCGg-*tetra*loop-14mer-RNA-Probe mit der Sequenz 5'- PO_4^{2-} - PO_3^- - PO_3^- -

GGCAC(UUCG)GUGCC-OH-3' durchgeführt. Die Probe wurde bei der Silantes GmbH (Munich, Germany) gekauft. Die Sekundärstruktur des Moleküls ist in Abbildung 3.1A gezeigt. Die RNA wurde mit Hilfe von Vivaspin-20 Konzentratoren mit einem „MWCO“ (*molecular weight cutoff*) von 3000 Da der Firma Sartorius stedim biotech (Aubagne Cedex, France) aufkonzentriert. Rückfaltung der RNA erfolgte über Denaturierung für 10 Minuten bei einer Konzentration von 0.25 mM und einer Temperatur von 95°C und anschließender 20facher Verdünnung mit eiskaltem Wasser. Daraufhin wurde die RNA für weitere 30 Minuten bei 0°C inkubiert. Die RNA wurde mit Hilfe von Vivaspin-20 Konzentratoren (MWCO = 3000 Da) aufkonzentriert und gegen NMR-Puffer ausgetauscht. Die korrekte Faltung wurde mit nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft. Die fertige NMR-Probe beinhaltete 0.8 mM RNA, 20 mM $K_xH_yPO_4$ (pH 6.4 in H_2O), 50 mM KCl, 0.4 mM EDTA und 99.99% D_2O . Eine ^{13}C -, ^{15}N -markierte 14mer-cUUCGg-*tetraloop*-RNA-Probe wurde für die Resonanzzuordnung der ^{31}P -Kerne bei 37°C verwendet. Die Probe wurde in der gleichen Weise hergestellt wie die 2H -markierte Probe.

Festkörper-NMR-Messungen wurden mit einer unmarkierten, chemisch synthetisierten 20mer RNA der Sequenz 5'-OH-GCGCGCGCGCGCGCGCGCGC-OH-3' durchgeführt. Die RNA wurde bei Dharmacon (Boulder, CO) bestellt. Sie wurde entsprechend den Herstellerangaben entschützt und gefriergetrocknet. Anschließend wurde die RNA in Wasser gelöst und bei -20°C über Nacht mit 5 Volumen von 2%igem $LiClO_4$ in Aceton gefällt. Das Präzipitat wurde in Wasser aufgelöst. Die Rückfaltung der RNA in die Duplexkonformation wurde über Denaturierung für 20 min bei einer Temperatur von 95°C und einer Konzentration von 1 mM erreicht. Anschließend wurde die Lösung innerhalb von 30 min langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Pufferaustausch erfolgte mit Hilfe von Vivaspin-20 Konzentratoren (MWCO = 3000 Da). Die richtige Faltung der RNA wurde über native Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft. RNA-Proben in gefrorenem NMR-Puffer wurden direkt im NMR-Spektrometer eingefroren, wohingegen RNA-Proben, die als Lyophilisat gemessen wurden, zuerst in den jeweiligen Puffer umgepuffert, anschließend mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren und daraufhin gefriergetrocknet wurden. Eine der gefriergetrockneten NMR-Proben wurde in einem Exsiccator innerhalb von vier Tagen bei 84%

Luftfeuchtigkeit äquilibriert. Dazu wurde ein Reservoir mit einer gesättigten KCl/H₂O-Lösung benutzt. Alle NMR-Puffer enthielten 10 mM MES, pH 6.5 aber jeweils unterschiedliche KCl-Konzentrationen zwischen 0 und 1000 mM.

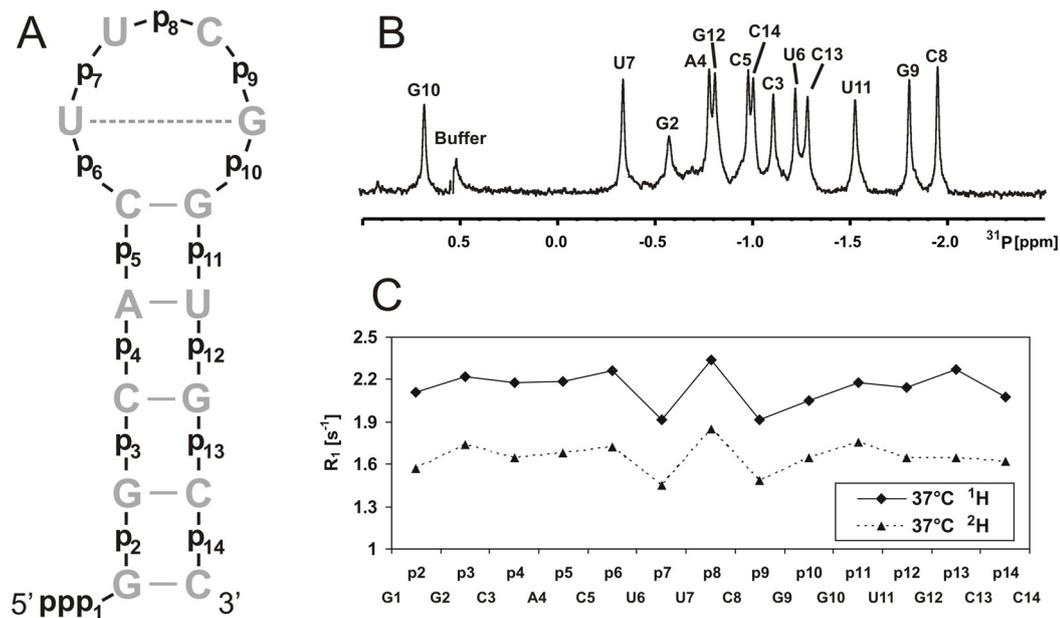


Abbildung 3.1 (A) Sekundärstruktur der cUUCGg-tetraloop-14mer-RNA (B) ³¹P-1D-Spektrum einer perdeutierten cUUCGg-tetraloop-14mer-RNA-Probe aufgenommen bei einer B₀-Feldstärke von 300 MHz (¹H) und einer Temperatur von 37°C. Experimentelle Parameter wurden wie folgt gesetzt: Transienten = 1024, d1 = 3 s, Akquisitionszeit = 1.7 s. (C) R₁-Relaxationsraten der cUUCGg-tetraloop-14mer-RNA aufgenommen bei einem B₀-Feld von 600 MHz (¹H) und einer Temperatur von 37°C. Die R₁-Relaxationsraten der protonierten RNA-Probe sind als gefüllte Rhomben verbunden mit einer durchgezogenen Linie dargestellt. Die R₁-Relaxationsraten der deutierten RNA-Probe sind als gefüllte Dreiecke verbunden mit einer gestrichelten Linie dargestellt.

3.2.2 Native Gelelektrophorese

5x Probenpuffer war zusammengesetzt aus 87% Glycerol, 0.1% (w/v) Xylen Cyanol FF and 0.1% (w/v) Bromphenolblau. Einfacher Laufpuffer beinhaltete 50 mM Tris-Acetat und 50 mM Natriumphosphat (pH 8.3). Das Gel wurde mit einer Acrylamidkonzentration von 15% und einem Acrylamid/Bisacrylamid

Konzentrationsverhältnis von 37.5:1 gegossen. Die Laufbedingungen des Gels wurden folgendermaßen gewählt: $U = 70 \text{ V}$, $P < 0.5 \text{ W}$ für 4 Stunden, dazu Wasserkühlung, um Überhitzung des Gels zu vermeiden. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt.

3.2.3 Flüssig-NMR-Spektroskopie

Die NMR-spektroskopischen Messungen der flüssigen Proben wurden an drei verschiedenen Bruker NMR-Spektrometern durchgeführt, einem 300-MHz-Spektrometer mit einem 5 mm BBO z-Gradienten Probenkopf, einem 600-MHz-Spektrometer mit einem 5 mm HCP Kryoprobenkopf und einem 900-MHz-Spektrometer mit einem 5 mm HCP xyz-Tripelgradienten Probenkopf. Transversale und longitudinale Relaxationsdaten wurden mittels modifizierter Bruker Standardpulsesequenzen zur R_1 -(t1ir) und R_2 -(cpmg) Relaxationsratenbestimmung gemessen. Dabei wurde die ^{31}P -Trägerfrequenz auf das Phosphatpuffersignal bei 0.61 ppm gesetzt. Um das Phosphatpuffersignal zu unterdrücken, wurde ein Sättigungspuls mit einer B_1 -Feldstärke von $\gamma B_1/2\pi = 2.5 \text{ Hz}$ während der Warteperiode zur Wiederherstellung der Gleichgewichtsmagnetisierung (d1) in den cpmg- und t1ir-Pulsesequenzen und während der variablen R_1 -Relaxationsperiode der t1ir-Pulsesequenz angewendet. Die d1-Warteperiode wurde für die R_1 -Relaxationsmessungen auf 10 s gesetzt. Bei 900 MHz (364.4 MHz; ^{31}P) wurden 16 Inkremente mit jeweils 480 Einzelmessungen, bei 600 MHz (242.8 MHz; ^{31}P) 16 Inkremente mit jeweils 224 Einzelmessungen und bei 300 MHz (121.4 MHz; ^{31}P) 18 Inkremente mit jeweils 512 Einzelmessungen zur R_1 -Relaxationsratenbestimmung durchgeführt. Für die R_2 -Relaxationsratenbestimmungen wurden Pseudo-2D-Experimente mit 12 verschiedenen Relaxationsperioden mit jeweils 640 Einzelmessungen (600MHz) beziehungsweise 1696 Einzelmessungen (300 MHz) aufgenommen. Während der R_2 -Relaxationsperioden wurde ein konstantes CPMG-Feld von 50 Hz angewendet. Die d1-Warteperiode zur Wiederherstellung der Gleichgewichtsmagnetisierung wurde dabei auf 3 s gesetzt. Die Resonanzzuordnung der ^{31}P -Kerne bei 25°C wurde von Fürtig et al. [126] übernommen. Für die Resonanzzuordnung bei 37°C wurde ein 3D-HCP-Experiment an einer einheitlich ^{13}C , ^{15}N -markierten cUUCGg-tetraloop-14mer-RNA-Probe aufgenommen. Als

Grundlage für die Zuordnung diente die Zuordnung der gleichen RNA bei 25°C [126].

3.2.4 Festkörper-NMR-Spektroskopie

Festkörper-NMR-Messungen wurden an einem Bruker 400-MHz-Spektrometer, ausgestattet mit einem Bruker 4 mm DVT HXY Probenkopf, durchgeführt. Für die Aufnahme der ^{31}P -CP-MAS-Spektren wurde ein ^1H -90°-Anregungspuls von 2.5 μs Länge verwendet. Die CP-Kontaktzeit wurde auf 1500 μs (RNA als gefriergetrocknetes Pulver) beziehungsweise 2500 μs (RNA in gefrorenem Puffer) optimiert. Für die ^1H -Entkopplung während der Datenaufnahme wurde eine Spinal64-Pulsfolge mit einer B_1 -Feldstärke von 70 kHz verwendet. Die d1-Wartezeit wurde auf 2 s gesetzt. Alle Spektren wurden bei einer MAS-Drehgeschwindigkeit von 2000 bzw. 3000 Hz aufgenommen.

3.2.5 Datenanalyse

3.2.5.1 Festkörper-NMR-Spektren

Die Größe des ^{31}P -CSA-Tensors wurde über die Analyse der MAS-Seitenbandenintensitäten des ^{31}P -Spektrums bestimmt. Hierzu wurden Linienformanalysealgorithmen des Programms Topspin 2.1 (Bruker, Germany) verwendet. Die Linienbreite des ^{31}P -Spektrums wurde während der Fittingprozedur des ^{31}P -CSA-Tensors bestimmt. Sie ergab sich aus dem Mittel der Linienbreiten aller Seitenbanden und des isotropen Signals. Aus dem CSA-Tensor wurde die Größe der CSA über folgende Formel berechnet:

Gleichung 3-1

$$CSA = \sqrt{1.5 * [(\delta_{11} - \delta_{iso})^2 + (\delta_{22} - \delta_{iso})^2 + (\delta_{33} - \delta_{iso})^2]}$$

In Gleichung 3-1 stellt δ_{iso} die isotrope chemische Verschiebung dar während δ_{11} , δ_{22} und δ_{33} die Hauptachsenkomponenten des ^{31}P -CSA-Tensors repräsentieren.

3.2.5.2 Flüssig-NMR-Spektren

Die Spektren wurden mit Hilfe des Programms Topspin 2.1 (Bruker, Germany) prozessiert. R_1 - und R_2 -Relaxationsraten wurden ermittelt, indem eine Zwei-Parameter-Monoexponentialfunktion an die Signalintensitäten angepasst wurde. Hierzu wurde die Software Sigma Plot 10.0 (Systat Software GmbH, Germany) verwendet. Die auf diese Weise gewonnenen Relaxationsparameter wurden anschließend mit dem Programm modelfree 4.20 [199] (Copyright ©1998 Arthur G. Palmer) analysiert. Dieses Programm benutzt für die Analyse den Modelfree-Formalismus, der erstmalig von Lipari und Szabo (1982a, b) [37, 38] eingeführt und anschließend von Clore et al. (1990) [39] weiterentwickelt wurde. Ziel der Analyse ist es, Aussagen über Art und Ausmaß interner Bewegungen (Dynamiken), hier der Phosphatgruppen des RNA-Phosphodiesterückgrats, treffen zu können. Der dipolare Relaxationsterm wurde während der Analyse auf null gesetzt. Die Modellselektion wurde über das sogenannte Akaike Informationskriterium (AIC) durchgeführt [200]. Das AIC lässt sich folgendermaßen berechnen:

Gleichung 3-2

$$AIC = \chi^2 + 2k$$

In Gleichung 3-2 ist k die Anzahl der Modelfree-Parameter im entsprechenden Modell. χ^2 stellt eine Zielfunktion dar, die beschreibt, wie gut die experimentell bestimmten Relaxationsparameter mit den berechneten Relaxationsparametern übereinstimmen. χ^2 lässt sich über Gleichung 3-3 folgendermaßen berechnen

Gleichung 3-3

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M \left\{ \frac{(R_{1ij} - R_{1ij}^{\#})^2}{\sigma_{R_{1ij}}^2} + \frac{(R_{2ij} - R_{2ij}^{\#})^2}{\sigma_{R_{2ij}}^2} \right\}$$

In Gleichung 3-3 sind R_{1ij} , R_{2ij} die R_1 - und R_2 -Relaxationsraten des i -ten Spins bei der j -ten B_0 -Feldstärke. $R_{1ij}^{\#}$ und $R_{2ij}^{\#}$ sind die entsprechenden aus dem Fit

zurückgerechneten Relaxationsraten und σ_{R1ij}^2 bzw. σ_{R2ij}^2 sind die experimentellen Fehler der R_1 - und R_2 -Relaxationsratenbestimmungen. Es wurde aus fünf Modellen jeweils das Modell mit dem geringsten AIC-Wert ausgewählt. Eine Übersicht über die fünf zur Auswahl stehenden Modelle ist in Tabelle 3-1 gegeben.

Tabelle 3-1 Beschreibung der fünf unterschiedlichen Modelle der Modelfree-Analyse. Parameter, die mit einem „x“ gekennzeichnet sind, wurden während der Fitting-Prozedur optimiert. Die restlichen Parameter wurden auf den in der Tabelle angegebenen Wert gesetzt.

| | S_s^2 | τ_e | R_{ex} | S_f^2 |
|----------|---------|----------|----------|---------|
| Modell 1 | x | 0 | 0 | 1 |
| Modell 2 | x | x | 0 | 1 |
| Modell 3 | x | 0 | x | 1 |
| Modell 4 | x | x | x | 1 |
| Modell 5 | x | x | 0 | x |

Die globale Rotationskorrelationszeit τ_c wurde während der iterativen Fitting-Prozedur optimiert. Das Ergebnis wurde anschließend mit dem Resultat der hydrodynamischen Berechnung mit dem Programm *hydronmr* 5a [201] verglichen. Die Rotationsdiffusion wurde entweder als isotrop oder als axialsymmetrisch angenommen. Im Falle axialsymmetrischer Diffusion wurde der ^{31}P -CSA-Tensor entlang der P-O3' Bindung orientiert. Diese Annahme weicht lediglich 7° von der Orientierung des ^{31}P -CSA-Tensors von Bariumdiethylphosphat ab [202]. Der anfängliche Diffusionstensor, der in der modelfree Fitting-Prozedur verwendet wurde, wurde basierend auf der NMR-Struktur der *cUUCGg-tetraloop-14mer-RNA* [195] mit dem Programm *hydronmr* 5a [201] berechnet. Während der modelfree Berechnungen wurde dem Diffusionstensor erlaubt, Größe und Orientierung zu verändern. In die modelfree Berechnungen gingen die R_1 -Relaxationraten ein, die bei magnetischen Feldstärken von 300 MHz (121,4 MHz; ^{31}P), 600 MHz (242.8 MHz; ^{31}P) und 900 MHz (364.4 MHz; ^{31}P) aufgenommen wurden sowie die R_2 -Relaxationsraten, die bei 600 MHz (242.8 MHz; ^{31}P) bestimmt wurden.

3.3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.1 Native Gelelektrophorese

Vor der Durchführung von NMR-Messungen wurde die korrekte Faltung der cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA (Abbildung 3.2A) sowie der GC-20mer-Duplex-RNA über native Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft (siehe Abbildung 3.2B). Die cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA zeigte eine monomere Bande, die der erwünschten monomeren Konformation entsprach. Die GC-20mer-RNA zeigte ebenfalls nur eine, der Duplex-RNA (siehe Abbildung 3.2 B) entsprechende, Bande.

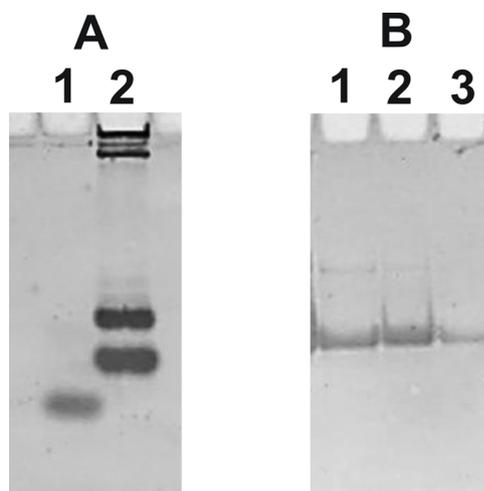


Abbildung 3.2 (A) 15% natives PAA-Gel (1) cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA rückgefaltet, (2) 20mer-Haarnadelschleifen-RNA als Mischung von Monomer und Dimer. (B) 15% natives PAA-Gel. Die Bahnen (1), (2) und (3) zeigen jeweils rückgefaltetes GC-20mer in unterschiedlichen Mengen aufgetragen.

3.3.2 R_1 - und R_2 -Relaxation in Lösung

R_1 - und R_2 -Relaxationsprozesse in Lösung werden durch Fluktuationen des lokalen magnetischen Feldes ausgelöst, das den NMR-aktiven Kern umgibt. In RNA werden diese Fluktuationen durch die chemische Verschiebungsanisotropie (CSA) oder verschiedene Dipol-Dipol Wechselwirkungen ausgelöst. Die dipolaren Relaxationsmechanismen von ^{15}N - oder ^{13}C -Kernen werden in aller Regel von dem

direkt gebundenen Proton dominiert. Im Falle des ^{31}P -Phosphodiesterückgrats in Oligonukleotiden gibt es keine direkt gebundenen Protonen. Der ^{31}P -Kern spürt jedoch den Einfluss von mehreren Wasserstoffkernen, die drei oder vier Bindungen entfernt sind ($\text{H3}'$, $\text{H4}'$, $\text{H5}'$, $\text{H5}''$, $\text{H2}'$). Die Trennung dieser beiden Beiträge zur autokorrelierten Relaxation der ^{31}P -Kerne des Phosphodiesterückgrats in RNA ist eine Voraussetzung für die korrekte Interpretation der Relaxationsdaten. Magusin et al. [190] berechnete den Beitrag der dipolaren Relaxation zu R_2 auf 37% bei einer B_0 magnetischen Feldstärke von 300 MHz (^1H) und 18% bei einer B_0 magnetischen Feldstärke von 500 MHz (^1H). Folglich dürfen die dipolaren Relaxationsmechanismen in protonierten RNA-Molekülen nicht vernachlässigt werden.

3.3.3 Dipolare Beiträge zur Relaxation

Die dipolare Interaktion zeigt eine r^{-6} -Abhängigkeit vom Abstand der beiden interagierenden Kerne. Deshalb ist es unerlässlich, die exakte Distanz zwischen den interagierenden Kernen zu kennen, um den Effekt quantifizieren zu können. Aufgrund der Tatsache, dass die Protonen, die dipolare Relaxation auslösen, mindestens drei flexible Torsionswinkel (α , β ; ϵ , ζ ; α , β , γ ; Pseudorotationsphase P) von den ^{31}P -Kernen des RNA-Phosphodiesterückgrats entfernt sind, ist es schwierig, die exakten ^1H - ^{31}P Distanzen zu bestimmen. Deswegen ist eine genaue Quantifizierung der dipolaren Relaxationsbeiträge in protonierten RNA-Proben zu den ^{31}P R_1 - und R_2 -Relaxationsraten schwierig.

Um die dipolaren Relaxationsbeiträge zu R_1 -Relaxationsraten bestimmen zu können, wurden R_1 -Relaxationsraten einer protonierten und einer perdeutierten cUUCGg-tetraloop-14mer-RNA (Abbildung 3.1A) miteinander verglichen. Bei dieser RNA sind die ^{31}P -Signale des Phosphodiesterückgrats im ^{31}P -1D-Spektrum aufgelöst (siehe 1D Spektrum, aufgenommen bei einer B_0 -Feldstärke von 300 MHz in Abbildung 3.1B). Dies bietet den Vorteil, dass die ^{31}P -Relaxationsraten direkt auf den ^{31}P -Spins detektiert werden können, ohne dass die Magnetisierung mit anderen Kernen korreliert werden muss, wie zum Beispiel im HCP- [203], HCP-CCH-TOCSY- [204] oder HP-TOCSY-Experiment [205]. Der Vergleich der R_1 -

Relaxationsraten, bestimmt bei einer Temperatur von 37°C, ist in Abbildung 3.1C dargestellt. Die R_1 -Relaxationsraten der protonierten RNA sind im Mittel um 0.4 Hz höher als die der perdeutierten RNA. Folglich wird die Differenz durch die Summe aller dipolaren ^1H - ^{31}P Relaxationsbeiträge verursacht, da ^2H - ^{31}P dipolare Relaxation in der perdeutierten Probe um einen Faktor 16 kleiner ist als ^1H - ^{31}P dipolare Relaxation. Dies ergibt sich unter Berücksichtigung der kleineren gyromagnetischen Konstante und der Unterschiede in der Spinquantenzahl von ^2H ($\gamma_{\text{D}} = 4.11 \cdot 10^7 \text{T}^{-1} \text{s}^{-1}$; $I_{\text{D}} = 1$) und ^1H ($\gamma_{\text{H}} = 26.75 \cdot 10^7 \text{T}^{-1} \text{s}^{-1}$; $I_{\text{D}} = 1/2$). Der maximale Effekt der ^2H - ^{31}P R_1 -Relaxationsrate berechnet sich daraus auf 0.02 Hz. Er ist somit kleiner als der experimentelle Fehler der R_1 -Ratenbestimmung und daher nicht detektierbar.

3.3.4 CSA-Relaxationsbeiträge

In einer perdeutierten RNA können die ^{31}P -Kerne des Phosphodiesterückgrats als isolierte Spins betrachtet werden. Wenn paramagnetische Verunreinigungen ausgeschlossen werden können, trägt nur die CSA des ^{31}P -Kerns zur R_1 -Relaxation desselben Kerns bei. Die R_2 -Relaxationsraten werden zusätzlich zu der CSA unter Umständen auch von chemischem Austausch bestimmt. Aus diesem Grund ist es möglich, durch die gemeinsame Betrachtung von R_1 - und R_2 -Relaxationsraten die CSA-abhängigen Relaxationsterme von den chemischen Austauschtermen zu trennen.

Wenn die globale Rotationsdiffusion der betrachteten RNA als isotrop angenommen werden kann, ist der CSA-Beitrag zu R_1 - und R_2 -Relaxation nur von der Größe und nicht von der Orientierung der CSA abhängig. Falls der Rotationsdiffusionstensor allerdings axialsymmetrisch ist, hängt die Relaxation von der Orientierung des CSA-Tensors relativ zum Rotationsdiffusionstensor des RNA-Moleküls ab. Diese Orientierung kann nur bestimmt werden, wenn die Orientierung des CSA-Tensors im Molekülkoordinatensystem des Phosphodiesterückgrats und die Konformation des Phosphodiesterückgrats bezüglich der globalen Form des Moleküls bekannt sind.

3.3.5 Der ^{31}P -CSA-Tensor: Größe und Orientierung

Die Orientierung des ^{31}P -CSA-Tensors innerhalb des Molekülkoordinatensystems wurde anhand von Bariumdiethylphosphat, welches in seiner chemischen Struktur dem Phosphodiesterückgrat ähnelt, bestimmt [202]. Allerdings können die Größen der CSA-Tensorkomponenten von der Konformation des Phosphodiesterückgrats abhängig sein. Vergleichbare Abhängigkeiten von CSA-Tensoren wurden zum Beispiel für die ^{15}N -Kerne der Amidgruppen des Proteinrückgrats beschrieben [206-210].

In den siebziger Jahren konnte die Größe der Tensorachsenkomponenten des ^{31}P -CSA-Tensors von RNA-Molekülen mittels Festkörper-NMR-Messungen für polyU, polyG, polyC, polyA und tRNA bestimmt werden [211]. Aus diesen Werten lässt sich die Größe der ^{31}P -CSA entsprechend Gleichung 3-1 zu 172.0 ppm (tRNA), 174.7 ppm (polyU), 182.0 ppm (polyC), 173.2 ppm (polyG) und 175.8 ppm bestimmen. Für doppelsträngige DNA konnte mittels Festkörper-NMR-Messungen ein ^{31}P -CSA-Wert von 157.8 ppm bestimmt werden [212]. Dieser CSA-Wert ist deutlich kleiner als die CSA-Werte, die für RNA bestimmt werden konnten. Da tRNA für die meisten Nukleotide A-Form-helikale Konformation annimmt, erscheint die Annahme eines CSA-Werts von 172 ppm am sinnvollsten, da die meisten strukturierten RNA-Moleküle A-Form-helikale Bereiche besitzen. Allerdings sind die Unterschiede zwischen den berichteten CSA-Werten für verschiedene RNA-Moleküle beträchtlich. Man nimmt allgemein an, dass eine polyN-RNA keine geordnete Struktur besitzt und nur durch ein Strukturensamble unterschiedlicher Strukturen beschrieben werden kann. Demnach ist die Ursache für die unterschiedlichen CSA-Werte möglicherweise eine Abhängigkeit dieser Werte von der gemittelten Konformation des Phosphodiesterückgrats, die für die unterschiedlichen homopolymeren Oligonukleotide höchstwahrscheinlich unterschiedlich ist. Kürzlich durchgeführte DFT-Rechnungen bezüglich der Konformationsabhängigkeit des ^{31}P -CSA-Tensors im Phosphodiesterückgrat von DNA- und RNA-Molekülen unterstützen diese Interpretation. Aus den Werten der ^{31}P -CSA-Hauptachsenkomponenten der DFT-Rechnungen berechnet sich die Größe der ^{31}P -CSA zu 176.5 ppm für RNA. Andererseits spricht die geringe Dispersion der

isotropen ^{31}P chemischen Verschiebungen im RNA-Phosphodiesterückgrat ($\sigma_{\text{CS}} = \pm 1.5\text{-}2$ ppm) (BMRB Datenbank) für eine eher geringe Konformationsabhängigkeit der ^{31}P -CSA.

Es wurden ^{31}P -Festkörper-NMR-Messungen an einer GC-20mer-Duplex-RNA durchgeführt, um die Größe der ^{31}P -CSA für die Relaxationsanalyse in Lösung zu bestimmen. Mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde kontrolliert, dass sich die RNA in die erwartete Duplex-Konformation faltete. Im Duplex nehmen alle Nukleotide voraussichtlich A-Form-helikale Konformation an, was zu einer ähnlichen elektronischen Umgebung aller ^{31}P -Kerne im RNA-Duplex führt. ^{31}P -1D-CP-MAS-Spektren wurden bei einer Vielzahl von verschiedenen Bedingungen aufgenommen. Es wurden hierbei der Einfluss der Parameter Salzkonzentration, Luftfeuchtigkeit und Temperatur untersucht. Außerdem wurden die Proben entweder als gefriergetrocknetes Pulver oder in gefrorenem Puffer gemessen. Die Spektren wurden gefittet, um die CSA-Hauptachsenkomponenten des ^{31}P -CSA-Tensors zu ermitteln. Abbildung 3.3 zeigt exemplarisch ein ^{31}P -1D-CP-MAS-Festkörper-NMR-Spektrum einer gefriergetrockneten GC-20mer-Duplex-RNA-Probe ohne Kaliumchlorid (KCl). Das Spektrum wurde bei einer Protonenträgerfrequenz von 400 MHz (161.976 MHz, ^{31}P) und einer Temperatur von 250 K aufgenommen. Das simulierte Spektrum, das unter der Annahme eines einzigen ^{31}P -CSA-Tensors entstanden ist, ist in grün dargestellt. Offensichtlich ist die Annahme eines einzigen CSA-Tensors ausreichend, um das experimentelle Spektrum genau zu simulieren. Dementsprechend nehmen die 38 ^{31}P -Kerne des Duplex entweder sehr ähnliche Konformationen ein oder die konformationelle Abhängigkeit des ^{31}P -CSA-Tensors ist klein. Die ^{31}P -CSA wurde für unterschiedliche KCl-Konzentrationen und Temperaturen analysiert. Außerdem wurden Unterschiede zwischen gefriergetrockneter RNA und RNA in gefrorenem Puffer genauer untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst.

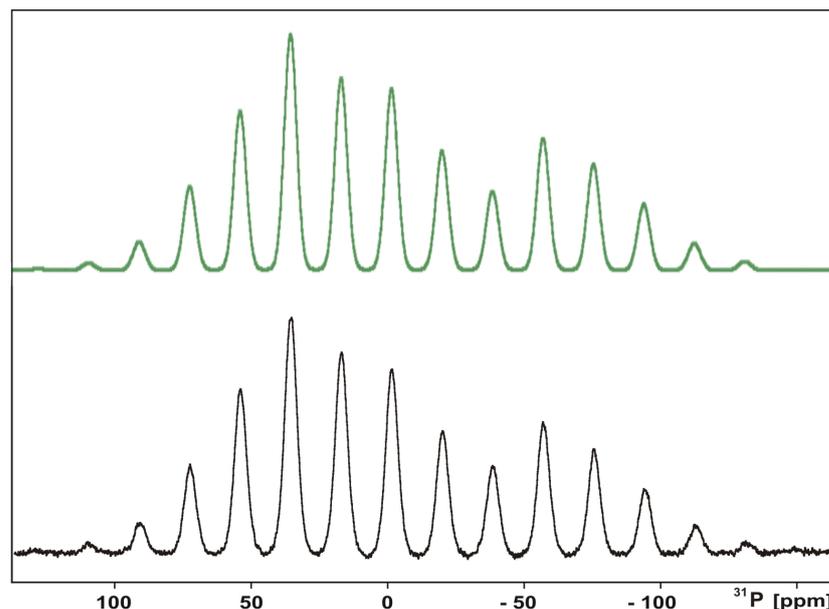


Abbildung 3.3 ^{31}P -1D-CP-MAS-Festkörper-NMR-Spektrum einer gefriergetrockneten GC-20mer-Duplex-RNA ohne KCl, aufgenommen bei einer B_0 -Feldstärke von 400 MHz (^1H) und einer Temperatur von 250 K (schwarze Linie).

Tabelle 3-2 Experimentell bestimmte ^{31}P -CSA-Tensor-Hauptachsenkomponenten, die entsprechende isotrope chemische Verschiebung, der CSA-Wert berechnet nach Gleichung 3-1 und die Linienbreite aus dem CSA-Fit. Die Daten wurden an GC-20mer-Duplex-RNA-Proben bei verschiedenen Salzkonzentrationen und unterschiedlichen Temperaturen gemessen.

| Probe | KCl | T | δ_{11} | δ_{22} | Δ_{33} | δ_{iso} | CSA | Linienbreite |
|---------------------------|------|-----|---------------|---------------|---------------|-----------------------|-------|--------------|
| | [mM] | [K] | [ppm] | [ppm] | [ppm] | [ppm] | [ppm] | [Hz] |
| Eis ^a | 0 | 250 | 79.8 | 17.8 | -102.7 | -1.68 | 160.7 | 313 |
| Eis ^a | 50 | 250 | 79.2 | 17.6 | -101.9 | -1.68 | 159.5 | 315 |
| Eis ^a | 100 | 250 | 80.4 | 17.6 | -103.1 | -1.73 | 161.5 | 298 |
| Eis ^a | 1000 | 250 | 79.4 | 18.1 | -102.4 | -1.60 | 160.2 | 308 |
| gefriergetr. ^b | 0 | 250 | 86.4 | 23.8 | -115.0 | -1.61 | 178.4 | 979 |
| gefriergetr. ^b | 500 | 250 | 88.6 | 25.6 | -119.4 | -1.73 | 184.8 | 989 |
| gefriergetr. ^b | 1000 | 250 | 89.9 | 27.5 | -122.3 | -1.63 | 188.9 | 987 |
| gefriergetr. ^b | 100 | 310 | 85.8 | 22.2 | -111.5 | -1.18 | 174.4 | 723 |
| 84% humid ^c | 100 | 310 | 79.1 | 17.0 | -99.8 | -1.24 | 157.4 | 403 |

^aRNA-Probe in gefrorenem Puffer gemessen ^bgefriergetrocknete Probe (entspricht 0% Luftfeuchtigkeit) ^cgefriergetrocknete Probe an 84% Luftfeuchtigkeit äquilibriert

In Eis beträgt die ^{31}P -CSA 160.5 ppm und ist unabhängig von der KCl-Konzentration des Puffers. Im Gegensatz dazu ist die ^{31}P -CSA der gefriergetrockneten RNA wesentlich größer und in Bereichen hoher unphysiologischer Salzkonzentrationen außerdem abhängig von der KCl-Konzentration. Der CSA-Wert steigt mit der Salzkonzentration von 178.5 ppm in der Abwesenheit von KCl auf 188.9 ppm bei 1M KCl. Wenn die gefriergetrocknete Probe vor der Messung auf 84% Luftfeuchtigkeit äquilibriert wird, reduziert sich die CSA auf 157.4 ppm.

Für Kollagenfibrillen wurde berichtet, dass Dynamiken auf der schnellen bzw. intermediären Zeitskala die mit Festkörper-NMR bestimmten CSA-Werte beeinflussen können [213]. Diese Dynamiken können mit einem Ordnungsparameter S beschrieben werden, der den Wert der unbeeinflussten CSA skaliert. Bei Kollagenfibrillen hängt der Ordnungsparameter S vom Ausmaß der Hydratisierung ab. Odahara et al. [191] berichteten über die Abhängigkeit des ^{31}P -CSA-Tensors von der Temperatur in Proben pelletierter Ribosomen sowie den Einfluss von Temperatur und relativer Luftfeuchtigkeit auf die ^{31}P -CSA von Kalbsthymus-DNA-Proben. Die homogene Linienbreite der Seitenbanden in Spektren von Tabakmosaikvirus (TMV)-Proben betrug 90 Hz, während die inhomogene Linienbreite dieser Proben eine ausgeprägte Abhängigkeit vom Wassergehalt der Proben aufwies [214]. Diese inhomogene Linienverbreiterung wurde als konformationelle Heterogenität interpretiert, die in Proben mit höherem Wassergehalt aufgrund von Dynamik ausgemittelt wird. Magusin und Hemminga [190, 215] führten eine detaillierte ^{31}P -CSA-Tensor- und Relaxationsanalyse an M13- und TMV-Proben durch. In dieser Studie wurden Änderungen der Linienbreite auf schnelle eingeschränkte Fluktuationen der Dihedralwinkel des Phosphodiesterückgrats zurückgeführt. Zusammengefasst lässt sich demnach sagen, dass die Größe der Hauptachsenkomponenten des beobachteten ^{31}P -CSA-Tensors sowie die Linienbreite der Seitenbanden aufgrund von Dynamiken auf der μs -Zeitskala stark von der Probenpräparation abhängen.

Im Falle der GC-20mer-Duplex-RNA reicht Äquilibrierung der Probe an 84% relative Luftfeuchtigkeit offensichtlich aus, um Dynamiken des Phosphodiesterückgrats zu induzieren. Aufgrund dessen wird die gemessene ^{31}P -CSA von

174.4 ppm auf 157.4 ppm reduziert. In Übereinstimmung damit kann eine Verringerung der Linienbreite von 723 Hz auf 403 Hz beobachtet werden. Vergleicht man diese Werte mit den CSA-Tensorwerten, die an RNA-Proben in Eis gemessen wurden, so fällt auf, dass sowohl CSA-Werte und Linienbreiten geringer sind als im gefriergetrockneten Feststoff. Dies lässt auf Dynamiken des Phosphodiester-rückgrats in Eis schließen. Die Effekte der Dynamik auf CSA und Linienbreite sind korreliert: Je kleiner der CSA-Wert, desto kleiner die Linienbreite. Daraus lässt sich schließen, dass der CSA-Wert des statischen ^{31}P -CSA-Tensors ohne Dynamik größer oder gleich 178.5 ppm ist.

Es gibt zwei mögliche Erklärungen für die beobachtete Abhängigkeit der CSA von der KCl-Konzentration in gefriergetrockneten RNA-Proben. Es wäre möglich, dass die K^+ -Kationen die Elektronendichte um die ^{31}P -Kerne beeinflusst. Dieser Effekt würde sich nur dann auswirken, wenn die Kationen den ^{31}P -Kernen sehr nahe kommen, wie es im gefriergetrockneten Zustand der RNA der Fall ist. In diesem Fall wäre ein CSA-Wert von 178.5 ppm richtig, da in Lösung bei einer KCl Konzentration von 50 mM die mittlere Distanz zwischen K^+ -Ion und Phosphatgruppe zu groß ist, um die Elektronendichte um den ^{31}P -Kern zu beeinflussen. Alternativ dazu könnte die KCl-Abhängigkeit der CSA aber auch ein dynamischer Effekt sein. Es wäre möglich, dass eine Erhöhung der KCl-Konzentration die residuale Dynamik des Phosphodiester-rückgrats verringert, indem sich die kleinen K^+ - und Cl^- -Ionen in die Lücken nahe des Phosphodiester-rückgrats der RNA setzen. In diesem Fall wäre ein CSA-Wert von 188.9 ppm, den man bei hohen KCl-Konzentrationen im gefriergetrockneten Zustand der RNA erhält, der richtige Wert für die Relaxationsanalyse der ^{31}P -Kerne in Lösung.

Ein Einfluss der K^+ -Ionen auf die Elektronendichte der Phosphatgruppe ist die wahrscheinlichere Erklärung, da eine Erhöhung der KCl-Konzentration im gefriergetrockneten Zustand der RNA nicht mit einer Erhöhung der Linienbreite einhergeht, was bei einem weiteren Verlust an Dynamik zu erwarten wäre. Aus diesem Grund wurde die Lösungs-NMR-Relaxationsanalyse mit einem CSA-Wert von 178.5 ppm durchgeführt. Allerdings wurde zur Sicherheit der Effekt veränderter CSA-Werte auf die Ergebnisse der Modelfree Analyse untersucht.

Die aus Festkörper-NMR-Messungen an gefriergetrockneten RNA-Proben gewonnenen Daten zeigen, dass die Größe der ^{31}P -CSA stark abhängig von der Probenpräparation ist. Diese Abhängigkeit von der Probenpräparation ist in der Lage, die großen Unterschiede der CSA des Phosphodiesterückgrats, die in der Vergangenheit über Festkörper-NMR bestimmt wurden, zu erklären. Aufgrund der geringen beobachteten Dispersion der ^{31}P -chemischen Verschiebungen des Phosphodiesterückgrats in RNA ist davon auszugehen, dass die Konformationsabhängigkeit der CSA gering ist, zumindest für die erlaubten Rückgratwinkelkombinationen. Daher wurde ein konstanter Wert von 178.5 ppm für alle Phosphodiester- ^{31}P -Kerne innerhalb der *cUUCGg-tetra*loop-14mer-RNA verwendet. Dieser Wert ist dem mittels DFT-Rechnungen bestimmten ^{31}P -CSA-Wert für A-Form-RNA sehr ähnlich [216]. Für ^{15}N -Kerne des Proteinrückgrats liegt die Dispersion der isotropen Chemischen Verschiebung bei 25-30 ppm. Allerdings beträgt die Konformationsabhängigkeit der ^{15}N -CSA nur 5-10% [207, 208]. Aus diesem Grund wird die Relaxationsanalyse in Proteinen üblicherweise mit einem konstanten ^{15}N -CSA-Wert für alle ^{15}N -Kerne des Proteinrückgrats durchgeführt. In RNA beträgt die Dispersion der chemischen Verschiebung der Phosphodiestergruppen hingegen nur ± 1.5 -2 ppm (BMRB Datenbank). Daraus lässt sich ableiten, dass obwohl die Konformationsabhängigkeit der ^{31}P -CSA bisher nicht näher untersucht wurde, sie höchstwahrscheinlich deutlich kleiner als die Konformationsabhängigkeit der ^{15}N -CSA im Proteinrückgrat ist. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die Annahme eines konstanten Werts für die Größe der ^{31}P -CSAs im Phosphodiesterückgrat der RNA eine relativ gut erfüllte Näherung darstellt.

3.3.6 Relaxationsanalyse der perdeutერიerten RNA

In Abbildung 3.4A, B sind exemplarisch R_1 - bzw. R_2 - ^{31}P -Relaxationskurven der Nukleotide U6 und U7, aufgenommen bei einer Protonen- B_0 -Feldstärke von 600 MHz und einer Temperatur von 37°C, dargestellt. Diese Kurven konnten monoexponentiell gefittet werden. Daraus lässt sich schließen, dass die RNA während der Messung in einer homogenen, monomeren Konformation vorlag. R_1 -Relaxationsraten wurden für eine perdeutერიerte *cUUCGg-tetra*loop-14mer-RNA, die

in 100% D₂O-Puffer gelöst war, bei unterschiedlichen B₀ magnetischen Feldstärken von 300, 600 und 900 MHz (für ¹H-Kerne) bestimmt (Abbildung 3.4C). Wie man es für Moleküle mit einer globalen Rotationskorrelationszeit von ca. 2 ns erwartet, beobachtet man ein Ansteigen der R₁-Relaxationsraten mit der B₀-Feldstärke. Allerdings ist das Ausmaß der B₀-Feldabhängigkeit für die verschiedenen ³¹P-Kerne der RNA unterschiedlich groß. Die R₁-Relaxationsraten der Phosphate p2, p10 und p14 zeigen eine höhere B₀-Feldabhängigkeit als andere ³¹P-Kerne. Vergleicht man die R₁-Relaxationsraten bei der gleichen B₀-Feldstärke, zeigen die ³¹P-Kerne p7 und p9 des *loops* kleine R₁-Raten, während p8 eine vergleichsweise hohe R₁-Rate aufweist. Dieser charakteristische Nukleotid-abhängige Verlauf der R₁-Raten tritt bei 300, 600 und 900 MHz auf (Tabelle 3-3).

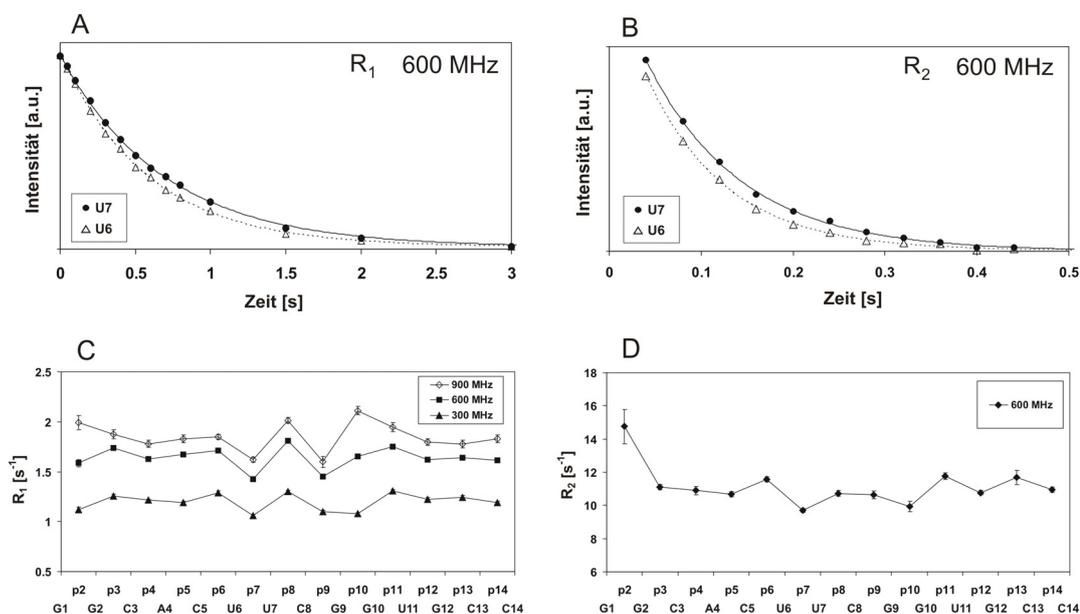


Abbildung 3.4 (A) R₁-Relaxationsabfallkurven und (B) R₂-Relaxationsabfallkurven dargestellt für die ³¹P-Kerne p6 und p7 bei einer B₀-Feldstärke von 600 MHz und einer Temperatur von 37°C. Die Signalintensitäten sind gegen die Relaxationsperiode aufgetragen. (C) R₁-Relaxationsraten der ³¹P-Kerne der cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA gemessen bei unterschiedlichen B₀-Feldstärken von 300 MHz (gefüllte Dreiecke), 600 MHz (gefüllte Quadrate), 900 MHz (offene Kreise) und einer Temperatur von 37°C. (D) R₂-Relaxationsraten der ³¹P-Kerne der cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA gemessen bei einer B₀-Feldstärke von 600 MHz und einer Temperatur von 37°C

R_2 -Relaxationsraten wurden bei B_0 -Feldstärken von 300 MHz (Tabelle 3-3, Abbildung 3.6) und 600 MHz (Abbildung 3.4D; Tabelle 3-3) bei einer Temperatur von 37°C bestimmt. Die R_2 -Raten, die bei 600 MHz bestimmt wurden, liegen zwischen 9.6 und 11.8 Hz mit Ausnahme von p2. Es fällt auf, dass die Phosphate des *loops* p7, p8, p9 und p10 niedrigere R_2 -Raten aufweisen als die Phosphate des Helixstamms. Eine außergewöhnlich hohe R_2 -Rate weist p2 mit 14.75 Hz auf. Bereits im ^{31}P -1D (Abbildung 3.1B)-Spektrum der 14mer-RNA erscheint das p2-Signal breiter und schwächer als die anderen ^{31}P -Signale. Diese Beobachtung weist auf einen deutlichen Beitrag chemischen Austauschs zur R_2 -Rate von p2 hin.

Tabelle 3-3 ^{31}P R_1 - und R_2 -Relaxationsraten der cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA gemessen bei B_0 -Feldstärken von 300 MHz, 600 MHz und 900 MHz und einer Temperatur von 37°C

| | R_1 [Hz] | R_1 [Hz] | R_1 [Hz] | R_2 [Hz] | R_2 [Hz] |
|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| | 300 MHz | 600 MHz | 900 MHz | 300 MHz | 600 MHz |
| p2-G2 | 1.117 ± 0.028 | 1.585 ± 0.034 | 1.993 ± 0.069 | 3.706 ± 0.159 | 14.750 ± 1.434 |
| p3-C3 | 1.258 ± 0.015 | 1.735 ± 0.021 | 1.876 ± 0.045 | 3.232 ± 0.042 | 11.098 ± 0.250 |
| p4-A4 | 1.214 ± 0.012 | 1.628 ± 0.016 | 1.779 ± 0.037 | 3.092 ± 0.041 | 10.891 ± 0.209 |
| p5-C5 | 1.188 ± 0.015 | 1.674 ± 0.018 | 1.830 ± 0.039 | 3.222 ± 0.040 | 10.680 ± 0.221 |
| p6-U6 | 1.286 ± 0.020 | 1.714 ± 0.018 | 1.849 ± 0.028 | 3.369 ± 0.075 | 11.567 ± 0.253 |
| p7-U7 | 1.060 ± 0.015 | 1.428 ± 0.019 | 1.624 ± 0.026 | 2.812 ± 0.035 | 9.693 ± 0.197 |
| p8-C8 | 1.304 ± 0.013 | 1.809 ± 0.021 | 2.014 ± 0.032 | 3.054 ± 0.062 | 10.721 ± 0.276 |
| p9-G9 | 1.098 ± 0.014 | 1.451 ± 0.020 | 1.600 ± 0.055 | 3.267 ± 0.055 | 10.629 ± 0.364 |
| p10-G10 | 1.081 ± 0.014 | 1.654 ± 0.018 | 1.612 ± 0.043 | 2.738 ± 0.059 | 9.931 ± 0.398 |
| p11-U11 | 1.308 ± 0.012 | 1.749 ± 0.022 | 1.945 ± 0.047 | 3.364 ± 0.071 | 11.779 ± 0.213 |
| p12-G12 | 1.226 ± 0.017 | 1.620 ± 0.014 | 1.796 ± 0.032 | 3.069 ± 0.052 | 10.760 ± 0.165 |
| p13-C13 | 1.246 ± 0.014 | 1.639 ± 0.018 | 1.776 ± 0.038 | 3.242 ± 0.061 | 11.697 ± 0.627 |
| p14-C14 | 1.194 ± 0.010 | 1.614 ± 0.014 | 1.830 ± 0.039 | 3.126 ± 0.076 | 10.932 ± 0.232 |

3.3.7 Modelfree-Analyse

Als Eingabedaten für die Modelfree-Analyse dienten die R_1 -Relaxationsraten bestimmt bei B_0 -Feldstärken von 300, 600 und 900 MHz und die R_2 -Relaxationsraten bestimmt bei einer B_0 -Feldstärke von 600 MHz. Alle Messungen

Tabelle 3-4 Resultate der ^{31}P -Modelfree-Analyse der cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA. Die CSA wurde dabei auf 178.5 ppm gesetzt. Die Analyse wurde unter der Annahme isotroper bzw. anisotroper Rotationsdiffusion durchgeführt.

| | S^2 | S_s^2 | S_f^2 | τ_e [ps] | R_{ex} [s^{-1}] | Rotations- diffusion | Modell |
|----------------|-------------------|----------------------------|-------------------|-----------------|------------------------------|-------------------------|--------|
| p2-G2 | 0.695 ± 0.022 | | | 79.9 ± 11.3 | 4.95 ± 1.46 | iso | 4 |
| | 0.690 ± 0.022 | | | 73.2 ± 11.3 | 5.25 ± 1.46 | aniso | 4 |
| p3-C3 | 0.778 ± 0.036 | 0.928 ± 0.041 | 0.839 ± 0.011 | 1300 ± 1167 | | iso | 5 |
| | 0.821 ± 0.022 | | | 34.4 ± 12.2 | | aniso | 2 |
| p4-A4 | 0.795 ± 0.009 | | | 26.2 ± 8.7 | | iso | 2 |
| | 0.796 ± 0.009 | | | 25.4 ± 8.7 | | aniso | 2 |
| p5-C5 | 0.748 ± 0.020 | 0.928 ± 0.020 | 0.807 ± 0.012 | 786 ± 553 | | iso | 5 |
| | 0.745 ± 0.02 | 0.924 ± 0.022 | 0.806 ± 0.012 | 840 ± 563 | | aniso | 5 |
| p6-U6 | 0.847 ± 0.011 | | | 23.1 ± 11.1 | | iso | 2 |
| | 0.847 ± 0.011 | | | 23.6 ± 11.0 | | aniso | 2 |
| p7-U7 | 0.691 ± 0.009 | | | 24.2 ± 4.8 | | iso | 2 |
| | 0.682 ± 0.011 | | | 22.5 ± 5.1 | 0.42 ± 0.24 | aniso | 4 |
| p8-C8 | 0.662 ± 0.088 | 0.780 ± 0.103 | 0.849 ± 0.009 | 2915 ± 1522 | | iso | 5 |
| | 0.670 ± 0.087 | 0.790 ± 0.102 | 0.849 ± 0.009 | 2872 ± 1552 | | aniso | 5 |
| p9-G9 | 0.733 ± 0.007 | | | | 0.58 ± 0.38 | iso | 3 |
| | 0.741 ± 0.006 | | | | | aniso | 1 |
| p10-G10 | 0.663 ± 0.014 | | | 110.9 ± 9.2 | | iso | 2 |
| | 0.654 ± 0.015 | | | 106.4 ± 9.5 | 0.49 ± 0.27 | aniso | 4 |
| p11-U11 | 0.855 ± 0.009 | | | 45.9 ± 14.6 | | iso | 2 |
| | 0.850 ± 0.010 | | | 30.0 ± 15.3 | 0.33 ± 0.24 | aniso | 4 |
| p12-G12 | 0.790 ± 0.009 | | | 29.8 ± 7.7 | | iso | 2 |
| | 0.792 ± 0.009 | | | 22.7 ± 8.0 | | aniso | 2 |
| p13-C13 | 0.830 ± 0.006 | | | | | iso | 1 |
| | 0.826 ± 0.006 | | | | | aniso | 1 |
| p14-C14 | 0.779 ± 0.008 | | | 37.2 ± 7.7 | | iso | 2 |
| | 0.779 ± 0.008 | | | 41.1 ± 7.7 | | aniso | 2 |
| | $\tau_c = 1.926$ | | | | | iso | |
| | $\tau_c = 1.908$ | $D_{\text{aniso}} = 1.153$ | | | | aniso | |

wurden bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Die R_2 -Raten, aufgenommen bei einer B_0 -Feldstärke von 300 MHz, wurden nicht als Eingabedaten verwendet. Sie wurden für die Kreuzvalidierung der Resultate der Modelfree-Analyse benutzt (Abbildung 3.6). Die Resultate der Modelfree-Analyse unter der Annahme einer ^{31}P -CSA von 178.5 ppm sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst. Tabelle 3-4 zeigt die Modelfree-Parameter S^2 , S_s^2 , S_f^2 , τ_e , R_{ex} und das gewählte Modell unter der Annahme eines isotropen Rotationsdiffusionstensors sowie eines axialsymmetrischen Rotationsdiffusionstensors. Es wurde jeweils das Modell mit dem geringsten AIC-Wert gewählt [200].

Tabelle 3-5 Resultate der ^{31}P -Modelfree-Analyse der cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA. Die CSA wurde dabei auf 168.0 ppm gesetzt. Die Analyse wurde unter der Annahme isotroper Rotationsdiffusion durchgeführt.

| | S^2 | S_s^2 | S_f^2 | τ_{ex} [ps] | R_{ex} [s^{-1}] | Modell |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------------------|--------|
| p2-G2 | 0.783 ± 0.025 | | | 137 ± 17.6 | 4.96 ± 1.46 | 4 |
| p3-C3 | 0.877 ± 0.041 | 0.926 ± 0.041 | | 1326 ± 1172 | | 5 |
| p4-A4 | 0.898 ± 0.010 | | | 62.3 ± 18.6 | | 2 |
| p5-C5 | 0.844 ± 0.022 | 0.927 ± 0.020 | 0.910 ± 0.014 | 795 ± 553 | | 5 |
| p6-U6 | 0.955 ± 0.013 | | | 101 ± 36.5 | | 2 |
| p7-U7 | 0.780 ± 0.010 | | | 39.3 ± 7.3 | | 2 |
| p8-C8 | 0.745 ± 0.100 | 0.777 ± 0.104 | 0.958 ± 0.011 | 2938 ± 1524 | | 5 |
| p9-G9 | 0.828 ± 0.007 | | | | 0.57 ± 0.38 | 3 |
| p10-G10 | 0.746 ± 0.016 | | | 181 ± 13.5 | | 2 |
| p11-U11 | 0.962 ± 0.011 | | | 291 ± 102 | | 2 |
| p12-G12 | 0.891 ± 0.010 | | | 68.7 ± 15.7 | | 2 |
| p13-C13 | 0.938 ± 0.007 | | | | | 1 |
| p14-C14 | 0.879 ± 0.009 | | | 80.8 ± 15.2 | | 2 |
| | $\tau_c = 1.928$ | | | | | |

Tabelle 3-6 Resultate der ^{31}P -Modelfree-Analyse der cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA. Die CSA wurde dabei auf 188.9 ppm gesetzt. Die Analyse wurde unter der Annahme isotroper Rotationsdiffusion durchgeführt.

| | S^2 | S_s^2 | S_f^2 | τ_{ex} [ps] | R_{ex} [s^{-1}] | Modell |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------------------|--------|
| p2-G2 | 0.622 ± 0.019 | | | 55.9 ± 8.4 | 4.94 ± 1.46 | 4 |
| p3-C3 | 0.695 ± 0.032 | 0.928 ± 0.041 | 0.749 ± 0.010 | 1300 ± 1167 | | 5 |
| p4-A4 | 0.710 ± 0.008 | | | 16.4 ± 5.6 | | 2 |
| p5-C5 | 0.668 ± 0.017 | 0.928 ± 0.020 | 0.720 ± 0.011 | 786 ± 553 | | 5 |
| p6-U6 | 0.756 ± 0.010 | | | 12.9 ± 6.4 | | 2 |
| p7-U7 | 0.617 ± 0.008 | | | 17.4 ± 3.5 | | 2 |
| p8-C8 | 0.591 ± 0.078 | 0.780 ± 0.103 | 0.758 ± 0.008 | 2913 ± 1521 | | 5 |
| p9-G9 | 0.654 ± 0.006 | | | | 0.58 ± 0.38 | 3 |
| p10-G10 | 0.593 ± 0.012 | | | 79.4 ± 7.0 | | 2 |
| p11-U11 | 0.764 ± 0.008 | | | 24.7 ± 8.2 | | 2 |
| p12-G12 | 0.705 ± 0.008 | | | 18.8 ± 5.1 | | 2 |
| p13-C13 | 0.741 ± 0.005 | | | | | 1 |
| p14-C14 | 0.695 ± 0.007 | | | 23.9 ± 5.1 | | 2 |
| | $\tau_c = 1.926$ | | | | | |

Zusätzlich dazu wurde die Modelfree-Analyse unter der Annahme einer ^{31}P -CSA von 168 ppm bzw. 188.9 ppm durchgeführt, um den Effekt unterschiedlicher CSAs auf die Resultate der Modelfree-Analyse herauszufinden. Die resultierenden Modelfree-Parameter sind in Tabelle 3-5 (CSA = 168 ppm) und Tabelle 3-6 (CSA = 188.9 ppm) dargestellt.

Validierung der Modelfree-Analyse:

^{31}P - R_1 -Relaxationsraten gemessen bei B_0 -Feldstärken von 300, 600 und 900 MHz sowie ^{31}P - R_2 -Relaxationsraten gemessen bei einer B_0 -Feldstärke von 600 MHz wurden als Eingabedaten für die Modelfree-Analyse verwendet. In Gegensatz dazu wurden die ^{31}P - R_2 -Relaxationsraten die bei einer B_0 -Feldstärke von 300 MHz gemessen wurden zur Kreuzvalidierung der Modelfree-Resultate verwendet.

Abbildung 3.5 und Abbildung 3.6 zeigen, dass es möglich ist, die R_1 - und R_2 -Relaxationsraten zu simulieren, indem man die Modelfree-Parameter zur Berechnung der Relaxationsraten verwendet. Daraus wird ersichtlich, dass die erhaltenen

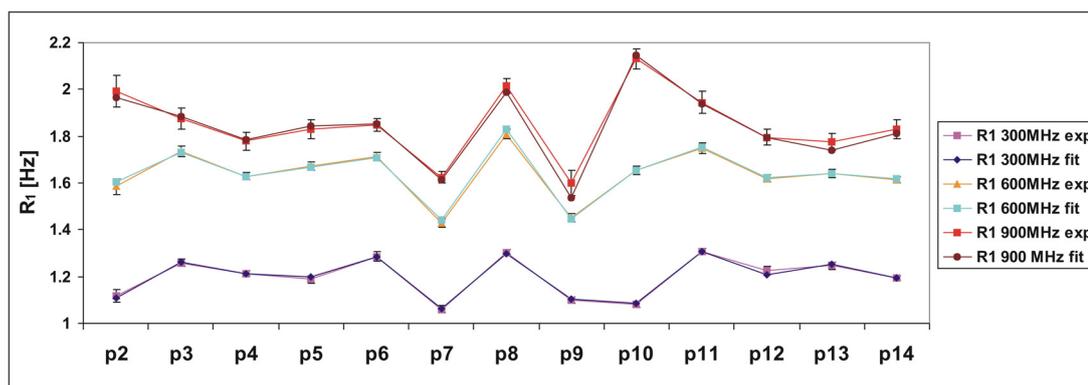


Abbildung 3.5 Vergleich von experimentellen und simulierten ^{31}P - R_1 -Relaxationsraten der cUUCG-tetraloop-14mer-RNA bei B_0 -Feldstärken von 300, 600 und 900 MHz und einer Temperatur von 37°C . Die Simulationen basieren auf den Resultaten der Modelfree-Analyse unter Annahme isotroper Rotationsdiffusion und einer CSA von 178.5 ppm.

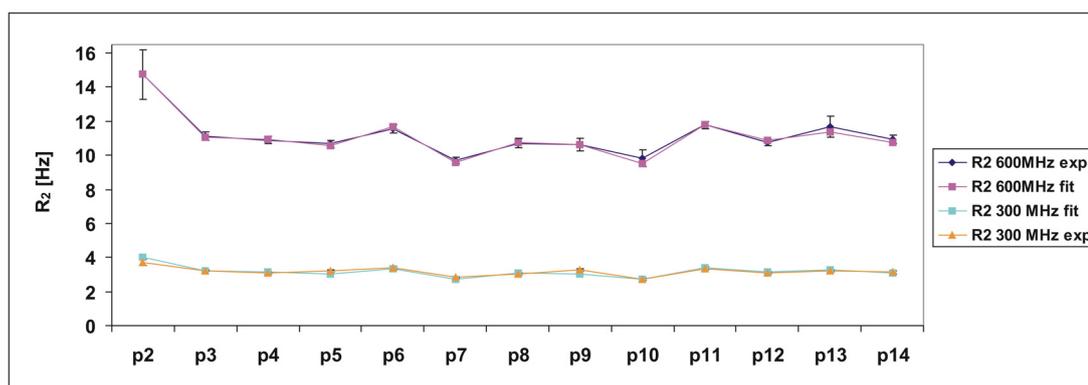


Abbildung 3.6 Vergleich von experimentellen und simulierten ^{31}P - R_2 -Relaxationsraten der cUUCG-tetraloop-14mer-RNA bei B_0 -Feldstärken von 300 bzw. 600 MHz und einer Temperatur von 37°C . Die Simulationen basieren auf den Resultaten der Modelfree-Analyse unter Annahme isotroper Rotationsdiffusion und einer CSA von 178.5 ppm.

Modelfree-Parameter mit den Eingabedaten konsistent sind. Zusätzlich dazu ist es ebenfalls möglich, die R_2 -Relaxationsraten, die bei 300 MHz gemessen wurden, auf Grundlage der erhaltenen Modelfree-Parameter sehr präzise vorherzusagen (siehe Abbildung 3.6). Das bedeutet, dass das jeweils selektierte Modell in der Lage ist, ^{31}P R_1 - und R_2 -Relaxationsraten bei beliebigen magnetischen Feldern korrekt vorherzusagen.

Abbildung 3.7 zeigt die S^2 -Ordnungsparameter, die sich aus den Modelfree-Analysen für CSA-Werte von 168, 178.5 und 188.9 ppm unter Annahme isotroper Rotationsdiffusion ergaben. Zusätzlich dazu sind die S^2 -Parameter unter der Annahme eines axialsymmetrischen Rotationsdiffusionstensors für eine ^{31}P -CSA von 178.5 ppm dargestellt. Ein Vergleich der S^2 -Ordnungsparameter für verschiedene ^{31}P -CSAs zeigt, dass beim Fitten der Relaxationsdaten an das Lipari-Szabo-Modell die S^2 -Ordnungsparameter und die CSA-Werte antikorreliert sind. Das heißt, das Programm kompensiert kleiner werdende CSA-Werte mit höheren S^2 -Werten und umgekehrt. Allerdings zeigt sich, dass der relative Verlauf der S^2 -Ordnungsparameter bezüglich der Nukleotidsequenz unabhängig von der gewählten ^{31}P -CSA ist. Die CSA skaliert den S^2 -Ordnungsparameter, ohne die Modellselektion, τ_c , R_{ex} oder S_s^2 zu beeinflussen. Allerdings ergeben sich bei ^{31}P -Kernen, die durch Modell 2 beschrieben werden, Veränderungen von τ_c in Richtung höherer Werte bei kleiner werdenden ^{31}P -CSA-Werten. Eine Diskriminierung zwischen verschiedenen ^{31}P -CSA-Werten mit statistischen Mitteln ist nicht möglich, da die resultierenden Abweichungen zwischen Experiment und Modell in allen Fällen beinahe gleich sind. Sie betragen $\chi^2 = 11.89$ (CSA = 188.9 ppm), $\chi^2 = 11.98$ (CSA = 178.5 ppm) und $\chi^2 = 12.42$ (CSA = 168.0 ppm). Allerdings weisen unsere Festkörper-NMR-Messungen darauf hin, dass die Annahme einer ^{31}P -CSA von 178.5 ppm sinnvoll erscheint. Aus der Modelfree Analyse ergab sich eine globale Rotationskorrelationszeit τ_c von 1.926 ns. Dieser Wert liegt sehr nahe an dem Wert hydrodynamischer Berechnungen mit dem Programm hydronmr 5a ($\tau_c = 1.94$ ns) basierend auf der NMR-Lösungsstruktur der cUUCGg-tetraloop-14mer-RNA [195].

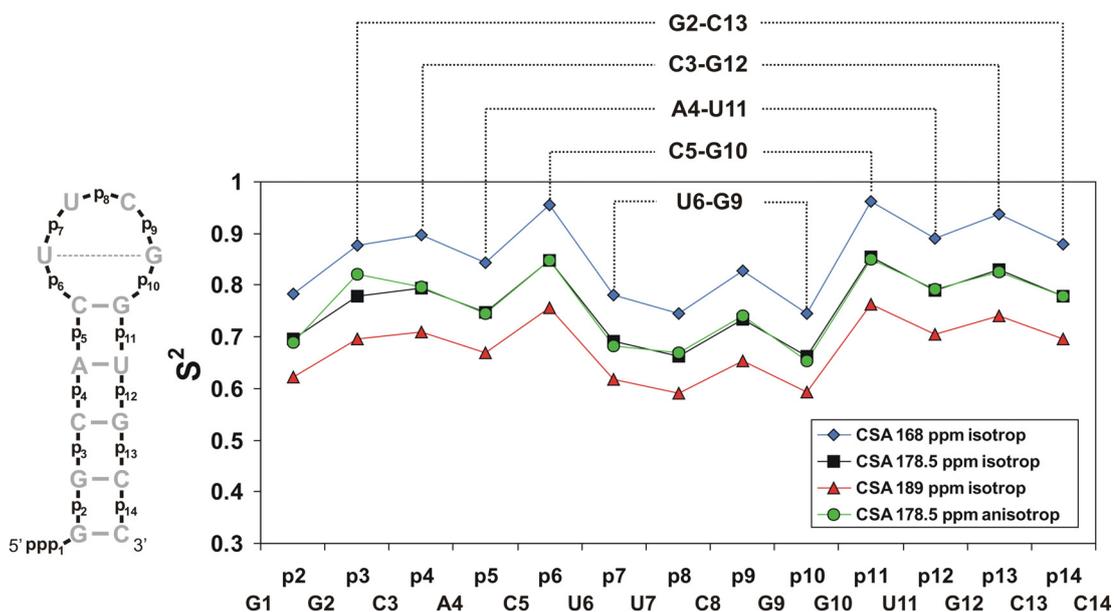


Abbildung 3.7 S^2 -Ordnungsparameter der ^{31}P -Kerne in der cUUCGg-tetraloop-14mer-RNA bestimmt bei einer Temperatur von 37°C . Die S^2 -Parameter sind für verschiedene CSA-Werte von 168 ppm (blau), 178.5 ppm (schwarz) und 189 ppm (rot) dargestellt. Bei einem CSA-Wert von 178.5 ppm ist außerdem der Effekt von isotroper (schwarz) versus anisotroper (grün) Rotationsdiffusion dargestellt. S^2 -Parameter der ^{31}P -Kerne, die sich auf der 3'-Seite bezüglich desselben Basenpaares befinden sind durch gestrichelte Linien miteinander verbunden.

Des Weiteren wurde der Effekt anisotroper Rotationsdiffusion auf die Resultate der Modelfree-Analyse untersucht. Ein Vergleich von isotroper und axialsymmetrischer Rotationsdiffusion (Tabelle 3-4, Abbildung 3.7) zeigt deutlich, dass die sich daraus ergebenden Unterschiede in den Endergebnissen der Modelfree-Analyse klein sind. Die Anisotropie des mit dem Programm modelfree berechneten axialsymmetrischen Rotationsdiffusionstensors beträgt ~ 1.2 . Der Gesamtfehler der modelfree Rechnung mit axialsymmetrischem Rotationsdiffusionstensor betrug $\chi^2 = 12.54$ (CSA = 178.5 ppm) und ist damit nur unwesentlich größer als der Gesamtfehler aus der Rechnung mit isotroper Rotationsdiffusion ($\chi^2 = 12.54$; CSA = 178.5 ppm). Nur p3 zeigt größere Unterschiede, die mit der Selektion eines anderen Bewegungsmodells für den anisotropen Fit erklärt werden können.

Die S^2 -Ordnungsparameter, die über die Modelfree-Analyse mit einer CSA von 178.5 ppm erhalten wurden, liegen zwischen 0.66 und 0.86. Die ^{31}P -Kerne p2, p7,

p8, p9 und p10 zeigen niedrigere S^2 -Werte als der Durchschnitt. Das Phosphat p2 liegt neben dem abschließenden Basenpaar des Helixstammes, während sich die Phosphate p7, p8, p9 und p10 im *loop* befinden. Die Position dieser Phosphate innerhalb der 14mer-RNA liefert möglicherweise eine Erklärung für deren höhere Dynamik. Diese Bereiche sind voraussichtlich flexibler, da sie von der kanonischen A-Form-helikalen Konformation des Phosphodiesterückgrats abweichen. Die höchsten S^2 -Werte erhält man für p6 ($S^2=0.847$) und p11 ($S^2=0.855$). Während sich p11 inmitten der A-Helix der 14mer-RNA in Nachbarschaft eines stabilen GC-Basenpaars befindet, befindet sich p6 innerhalb des *cUUCGg-tetraloops*. Die Dynamik individueller ^{31}P -Kerne im Phosphodiesterückgrat wird offensichtlich vom 5'-benachbarten Nukleotid und nicht vom 3'-benachbarten Nukleotid bestimmt. Das erklärt auch, warum p2 ($S^2 = 0.695$) einen deutlich geringeren S^2 -Wert als p14 ($S^2 = 0.779$) besitzt. Des Weiteren scheint die Flexibilität eines Basenpaars die Flexibilität der 3'-benachbarten Phosphodiestergruppe zu beeinflussen. Dies führt dazu, dass immer beide Phosphate, die sich in 3'-Position zu einem bestimmten Basenpaar befinden ähnliche Dynamiken aufweisen (Abbildung 3.7). Zum Beispiel sind die Dynamiken von p3 und p14 über das Basenpaar G2-C13 miteinander verknüpft.

Die meisten Phosphodiestergruppen zeigen eine schnelle Bewegungs-komponente zwischen $\tau_e = 22$ ps und $\tau_e = 111$ ps. Nur die Phosphate p9 und p13 weisen Dynamiken auf, deren Korrelationszeit kürzer als 20 ps ist. Winkelfluktuationen der Phosphodiesterwinkel α , β , γ , ε and ζ innerhalb einer Konformation des Phosphodiesterückgrats sind höchstwahrscheinlich verantwortlich für diese schnellen Dynamiken auf der ps-Zeitskala. Zusätzlich zu den schnellen Dynamiken weisen p3 und p5 auch noch langsamere Bewegung auf. Diese langsamere Bewegung zeichnet sich durch eine kleine Amplitude und eine Korrelationszeit von ca. 1 ns aus. Im Gegensatz dazu zeigt p8 eine langsame Bewegung mit einer großen Amplitude, die noch langsamer als die Bewegung von p3 und p5 zu sein scheint. Konformationelle Übergänge zwischen den beiden stabilen Ribosekonformationen C2'-endo und C3'-endo finden auf einer Zeitskala von in etwa 1 ns statt. Im Gegensatz dazu können Änderungen der Phosphodiesterückgratkonformationen, also Änderungen bezüglich der Winkel α , β , γ , ε and ζ , entweder gar nicht beobachtet

werden oder finden auf einer Zeitskala zwischen 10-100 ns statt wie mit Hilfe von MD-Simulationen an ApA-, ApC-, CpA- und CpC-Dinukleosidmonophosphaten gezeigt werden konnte [136]. Dynamiken, die deutlich langsamer als die globale Rotationskorrelationszeit des RNA-Moleküls sind, haben keinen Einfluss auf R_1 - und R_2 -Relaxation in Lösung und können daher auch nicht über die Analyse dieser Relaxationsraten detektiert werden. Vokacova et al. [136] konnten anhand ihrer MD-Simulationen zeigen, dass Übergänge zwischen verschiedenen Phosphodiester-rückgratkonformationen nur über konzertierte Winkeländerungen von mindestens zwei Rückgratwinkeln erfolgen können. Diese starke gegenseitige Korrelation der Rückgratwinkel kann als Erklärung herangezogen werden, warum Konformationsänderungen des Phosphodiester-rückgrats vergleichsweise langsam sind. Allerdings konnten in dieser Studie schnelle Fluktuationen der Rückgratwinkel innerhalb einer Konformation mit Amplituden von 30° - 40° beobachtet werden. Diese schnellen Fluktuationen entsprechen höchstwahrscheinlich den schnellen Bewegungen, die bei der Modelfree-Analyse der Phosphatgruppen der cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA detektiert wurden. Die Bewegung mit kleiner Amplitude, die für p3 und p5 detektiert wurde, könnte durch konformationelle Dynamik in der Ribosekonformation der benachbarten Zuckerreste erklärt werden. Eine Änderung der Zuckerkonformation würde lediglich eine geringfügige Neuausrichtung der Phosphatgruppe auslösen. Es ist bekannt, dass Änderungen der Zuckerkonformation auf dieser Zeitskala (~ 1 ns) stattfinden [136]. Die Phosphatgruppe p8 zeigt Bewegung auf einer noch langsameren Zeitskala. Die größere Amplitude unterscheidet diese Art von Bewegung deutlich von der Art der Dynamik, die die Phosphatreste p3 und p5 zeigen. Innerhalb der cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA ist p8 die am meisten exponierte Phosphatgruppe und deshalb die vermeintlich flexibelste. Es wäre möglich, dass deshalb p8 eine Ausnahme der Regel darstellt und Konformationsänderungen dieser Phosphodiestergruppe auf einer Zeitskala von wenigen ns stattfinden.

Die Phosphatgruppe p2 unterliegt chemischem Austausch. Die Austauschrate beträgt $R_{\text{ex}} = 5.0 \pm 1.5$ Hz. Diese Phosphatgruppe befindet sich in 3'-Richtung zu G1, welches Teil des Abschlussbasenpaares des Helixstammes der 14mer-RNA-Haarnadelschleife ist. Tatsächlich wurde bereits zuvor an Duplex-DNA gezeigt, dass

chemischer Austausch der ^{31}P -Kerne im Millisekundenbereich mit Basenpaarlebenszeiten der benachbarten Basenpaare korreliert ist [217]. Imino-1D-Spektren, die an einer H_2O -Probe der 14mer-RNA bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen wurden, zeigen eine deutliche Linienverbreiterung des G1-Signals, was auf eine Destabilisierung des G1-C14 Basenpaars bei 37°C hinweist (Nozinovic et al., unveröffentlichte Resultate).

3.4 Fazit

Es wurden ^{31}P -Relaxationsraten an einer *cUUCGg-tetraloop*-14mer-RNA gemessen und auf Grundlage des Lipari-Szabo-Modells analysiert. Der *cUUCGg-tetraloop* repräsentiert eines der stabilsten *tetraloop*-Motive. Seine dynamischen Eigenschaften wurden bereits vorher für die Basen und Zuckerreste eingehend untersucht [168-170, 218]. Deshalb stellt dieses Molekül ein ideales Modellsystem für die Messung der ^{31}P -Relaxationseigenschaften der einzelnen ^{31}P -Kerne entlang des Phosphodiesterückgrats dieser RNA dar. Diese Ortsauflösung ist möglich, da die ^{31}P -Signale dieser RNA in der ^{31}P -Dimension aufgelöst sind. In größeren RNA-Molekülen, müsste man die RNA selektiv in der Art $\text{H1}', \text{C1}', \text{D2}', \text{D3}', \text{D4}', \text{D5}' \text{D5}''$ markieren, um eine ortsaufgelöste ^{31}P -Relaxationsanalyse durchzuführen. Durch ein solches Markierungsschema wäre es möglich, ein P-C-H Kohärenztransferschema zu verwenden, um die ^{31}P -Resonanzen in der $\text{H1}'$ - $\text{C1}'$ Ebene aufzulösen.

Wie bereits vorher prognostiziert, wird die ^{31}P -Relaxation in protonierten RNA-Molekülen durch H-P dipolare Beiträge beeinflusst. Um diesen abstandsabhängigen Effekt zu beseitigen, wurde die R_1 - und R_2 -Relaxationsanalyse an einer perdeuterierten RNA-Probe durchgeführt. Für die Interpretation der Relaxationsraten mit Hilfe des Modelfree-Formalismus ist es wichtig, Größe und, im Falle von anisotroper Rotationsdiffusion, Orientierung des ^{31}P -CSA-Tensors genau zu kennen. Um die Größe der ^{31}P -CSA in RNA zu bestimmen, wurden Festkörper-NMR-Experimente durchgeführt. Es zeigte sich, dass die gemessene CSA stark von der Hydratisierung der Probe abhängig war. Dieser Effekt kann durch Dynamiken auf der ns- μs Zeitskala erklärt werden und ist in Übereinstimmung zu früheren Ergebnissen, die durch ^{31}P -Festkörper-NMR-Studien an TMV (Tabakmosaikvirus)-

und M13-Virus-Proben [190, 214, 215] gewonnen wurden. Des Weiteren konnte ein Einfluss der KCl-Konzentration auf die ^{31}P -CSA von RNA-Proben im gefriergetrockneten Zustand nachgewiesen werden. Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen erscheint ein ^{31}P -CSA-Wert von 178.5 ppm in Abwesenheit von Dynamik als plausibel.

Auf Basis dieser CSA konnte gezeigt werden, dass mit Ausnahme der flexiblen Base U7 das Phosphodiesterückgrat flexibler ist als die Ribosereste (C1'H1') und die Nukleobasen (C8-H8, C6-H6) [168, 169]. Außerdem scheint die Dynamik des Phosphodiesterückgrats deutlich von der Dynamik des 5'-benachbarten Nukleotids abhängig zu sein (Abbildung 3.7). S^2 -Ordnungsparameter, die aus MD-Simulationen bestimmt wurden, sind konsistent mit den S^2 -Ordnungsparametern, die aus NMR-Messungen für die CH-Bindungsvektoren in den Zuckerresten und den Nukleobasen bestimmt wurden.

Zukünftige Studien werden zeigen, ob MD-Simulationen die NMR-Ergebnisse zur Dynamik des Phosphodiesterückgrats reproduzieren können. Solche Untersuchungen wären insbesondere nützlich, um die dynamischen Eigenschaften von RNA-Molekülen besser zu verstehen, im Besonderen für das Gelenk, das durch die Rotation um die Torsionswinkel ζ , α definiert wird.

4 Analyse kreuzkorrelierter Relaxationsraten

4.1 Das quantitative Γ -HCNCH-Experiment: Bestimmung des glykosidischen Torsionswinkels χ in RNA-Oligonukleotiden über die Analyse CH-dipolarer kreuzkorrelierter Relaxationsraten

4.1.1 Einleitung

Die Verfügbarkeit isotopenmarkierter RNA-Oligonukleotide [219-222] stimulierte die Entwicklung einer Vielzahl unterschiedlicher heteronuklearer NMR-Experimente, wodurch die *de novo* Strukturbestimmung mittelgroßer RNAs über Lösungs-NMR-Spektroskopie möglich wurde [14-16, 192, 223]. Im Gegensatz zur Strukturbestimmung von Proteinen, bei der NOEs die wichtigste Quelle struktureller Information darstellen, werden bei der Strukturbestimmung von RNA zusätzlich Informationen über Torsionswinkel benötigt. Dies liegt unter anderem daran, dass die Protonendichte in RNA viel geringer ist als in Proteinen. Winkelinformationen können entweder über die Analyse homo- sowie heteronuklearer ^3J -Kopplungen oder über die Auswertung kreuzkorrelierter Relaxationsraten gewonnen werden. Unter den in RNA auftretenden Torsionswinkeln definiert der Winkel χ die relative Orientierung der Nukleobase bezüglich des Riboserests. Dieser Winkel verbindet also die Nukleobase mit dem Phosphodiester-Ribose-Rückgrat der RNA. Nukleobasen in RNA-Molekülen können entweder in syn-Konformation ($\chi \approx 40^\circ$ - 80°) oder in anti-Konformation ($\chi \approx 180^\circ$ - 240°) vorliegen. Eine Analyse von RNA-Strukturen der pdb-Datenbank liefert eine Standardabweichung der χ -Winkel in der anti-Konformation von 25° für Purine und von 15° für Pyrimidine (Abbildung 4.3), was zeigt, dass die Variationen dieses Winkels zwar nicht übermäßig groß, jedoch auch nicht vernachlässigbar klein sind und folglich eine experimentelle Bestimmung der χ -Winkel die Richtigkeit bzw. Genauigkeit von RNA-Strukturen deutlich verbessern wird.

Mittels NMR-Spektroskopie kann der χ -Winkel über die Analyse der $^3J(C2/4,H1')$ - und $^3J(C6/8,H1')$ -Kopplungskonstanten [224-226] über die entsprechenden Karplus-Parametrisierungen ermittelt werden. Die Genauigkeit der Winkelbestimmung ist jedoch abhängig von der Qualität dieser Karplus-Parametrisierungen. Die Richtigkeit dieser Parametrisierungen für RNA-Moleküle wurde allerdings noch nicht genauer untersucht [227]. Kreuzkorrelierte Relaxationsraten wurden bereits dazu benutzt, strukturelle Informationen in Proteinen [24, 25, 228-232] und in Oligosacchariden [233] zu erhalten. In Oligonukleotiden wurden bereits die Pseudorotationsphase der Ribose [234-236], die Winkel des Zucker-Phosphat-Rückgrats [26, 27] und die χ -Winkel [227, 237] mittels kreuzkorrelierter Relaxationsraten bestimmt. Auf der anderen Seite kann, wenn die strukturellen Parameter bekannt sind, aus der Analyse der kreuzkorrelierten Relaxationsraten Information über Dynamiken des untersuchten Biomakromoleküls abgeleitet werden [238-242].

Es existiert bereits eine Methode, den glykosidischen Bindungswinkel χ in RNAs über die Messung der kreuzkorrelierten Relaxationsrate zwischen der ^{15}N -CSA und dem C-H Dipol-Dipol-Vektor, also durch Messung der Raten $\Gamma_{N1,C1'H1'}^{CSA,DD}$ (Purine) bzw. $\Gamma_{N9,C1'H1'}^{CSA,DD}$ (Pyrimidine) zu bestimmen [227]. Die Methode erfordert genaue Informationen über Größe und Orientierung des Stickstoff-(N1/N9)-CSA-Tensors. Dieser Tensor wurde über Festkörper-NMR-Messungen an Desoxymononukleotiden bestimmt [243]. Die Analyse von kreuzkorrelierten Relaxationsraten, die die CSA als Relaxationsmechanismus beinhalten, ist jedoch mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Zum Beispiel ist es möglich, dass die ^{15}N -CSA des N1/9-Kerns von der Zuckerpseudorotationsphase des angrenzenden Riboserests oder dem χ -Winkel selbst abhängig ist. Diese konformationellen Abhängigkeiten sind jedoch bis heute nicht genauer untersucht worden. Demnach lässt sich deren Auswirkung auf die Auswertung kreuzkorrelierter Relaxationsraten des Typs $\Gamma^{CSA,DD}$ nur schwer abschätzen. Allerdings weisen quantenmechanische Berechnungen darauf hin, dass die ^{15}N -CSA von N1/9 tatsächlich abhängig vom χ -Winkel und der Ribosekonformation des dazugehörigen Zuckers ist [237, 244].

Im Folgenden wird nun eine neue Methode vorgestellt, den χ -Winkel zu bestimmen, die unabhängig von der ^{15}N -CSA des N1/9-Kerns ist. Sie basiert auf der Analyse dipolarer kreuzkorrelierter Relaxation des Typs $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ für Pyrimidine bzw. $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ für Purine. Um diese Relaxationsraten messen zu können, wurde ein neues NMR-Experiment, das quantitative Γ -HCNCH, entwickelt. Die neue Methode wurde an einer cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA getestet. Die erhaltenen χ -Winkel wurden mit den χ -Winkeln aus der Analyse der $\Gamma_{N1,C1'H1'}^{CSA,DD}$ (Purine)- bzw. $\Gamma_{N9,C1'H1'}^{CSA,DD}$ (Pyrimidine)- Raten, der Kristallstruktur sowie den χ -Winkeln, extrahiert aus einer MD-Trajektorie, bestimmt. Zusätzlich dazu konnte die Anwendbarkeit der neuen Methode für größere RNAs, in diesem Fall die 30mer-SLD-RNA aus der Coxsackievirus-B3-Kleeblatt RNA [245], demonstriert werden. Für die generelle Anwendbarkeit der neuen Methode wurden $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}(\chi)$ - bzw. $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}(\chi)$ - Parametrisierungen hergeleitet, um die χ -Winkelbestimmung zu erleichtern.

4.1.2 Material und Methoden

4.1.2.1 NMR-Spektroskopie

Die Messungen wurden an einer einheitlich ^{13}C , ^{15}N -markierten cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA-Probe durchgeführt. Sequenz und Sekundärstruktur sind in Abbildung 4.1A dargestellt. Die benötigte Resonanzzuordnung wurde von Fürtig et al. [126] übernommen. Die RNA wurde bei Silantes (München, Deutschland) gekauft. Die NMR-Probe hatte folgende Zusammensetzung: 0.7 mM RNA, 20 mM $\text{K}_x\text{H}_y\text{PO}_4$, pH 6.4, 0.4 mM EDTA und 10% D_2O . Zusätzliche Messungen wurden an einer Adenosin,Uridin- ^{13}C , ^{15}N -markierten 30mer-RNA (SLD der CVB3 genomischen RNA) durchgeführt. Die Sequenz und die Sekundärstruktur dieser RNA sind in Abbildung 4.1B [245] dargestellt. Die NMR-Probe hatte folgende Zusammensetzung: 1.2 mM RNA, 40 mM $\text{K}_x\text{H}_y\text{PO}_4$, pH 6.2, 0.2 mM EDTA und 10% D_2O .

Die NMR-Messungen wurden an einem Bruker 700-MHz-Spektrometer, ausgestattet mit einem 5 mM $^1\text{H}\{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$ z-Gradienten Kryoprobekopf durchgeführt. Die

Messungen wurden bei 298 K für die 14mer-RNA und 310 K für die 30mer-RNA durchgeführt. Die aufgenommenen Daten wurden mit dem Programm TOPSPIN 1.3 (Bruker Biospin) prozessiert und analysiert. Die Signalintensitäten wurden entsprechend Gleichung 4-18 bzw. Gleichung 4-19 für die quantitative Auswertung der $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten verwendet. Der angegebene Fehler ist gleich dem RMSD der mehrfach bestimmten $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten, aufgenommen mit unterschiedlichen Mischzeiten, unterschiedlicher Frequenzmarkierung in t_1 (N1/9 bzw. C1') und unterschiedlichen Pulssequenzen, die das Signal entweder auf den H1' (Abbildung 4.4)-Kernen oder auf den H6/8-Kernen detektieren (Abbildung 4.5).

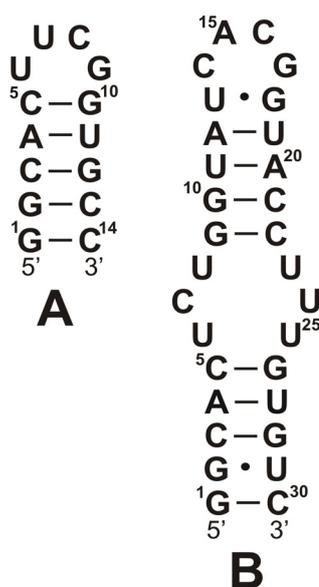


Abbildung 4.1 (A) Sekundärstruktur der cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA. **(B)** Sekundärstruktur der uCACGg-SLD-30mer-RNA.

4.1.2.2 MD-Simulation

Eine 5 ns Molekulardynamik (MD)-Simulation der 14mer-RNA wurde von Elke Durcharadt mit dem Programm CHARMM durchgeführt. Dabei wurde das Kraftfeld CHARMM27 für Nukleinsäuren [246, 247] verwendet. Die Kristallstruktur (pdb-ID 1F7Y) des cUUCGg-*tetraloops*, verlängert über eine Standard-A-Form-

RNA-Doppelhelix der entsprechenden Sequenz, diente als Startstruktur für die Simulation [227].

Die Simulationen wurden mit periodischen Grenzbedingungen in einem rhombischen Dodecahedron-Ausschnitt aus einem Würfel von 50 Å Seitenlänge, gefüllt mit voräquilibriertem TPI3P-Wasser [248], durchgeführt. Das System wurde mit Natrium-Gegenionen neutralisiert, die manuell durch zufälliges Ersetzen von Wassermolekülen platziert wurden. Nicht-Bindungsinteraktionen wurden mit einem 12 Å *cutoff* auf null gesetzt. Die Paarlste dieser Nicht-Bindungsinteraktionen wurde mit Hilfe eines 14 Å *cutoff* generiert und aktualisiert, falls sich ein Atom mehr als 1 Å seit der letzten Aktualisierung der Liste bewegt hat. Die Berechnung der Trajektorie fand unter konstantem Druck nach der Langevin piston Methode statt. Die mittlere Temperatur wurde alle 4 ps daraufhin überprüft, ob sie sich in einem (± 5 K)-Intervall der angegebenen Temperatur von 298 K befand. Konformationen des Systems wurden alle 0.2 ps für Analysezwecke gespeichert. Die χ -Winkleextraktion wurde mittels CHARMM-Eingabescripten durchgeführt. Die ersten 500 ps der Simulation wurden für die weitergehende Analyse nicht verwendet.

4.1.3 Theorie

Für ein RNA-Makromolekül, das isotroper Rotationsdiffusion unterliegt, sind die kreuzkorrelierten $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Relaxationsraten gegeben durch

Gleichung 4-1

$$\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD} = \frac{1}{5} \frac{\gamma_H^2 \gamma_C^2}{r_{C6H6}^3 r_{C1'H1'}^3} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \hbar^2 (S_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD})^2 (3 \cos^2 \theta_{C6H6,C1'H1'} - 1) \tau_c$$

Gleichung 4-2

$$\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD} = \frac{1}{5} \frac{\gamma_H^2 \gamma_C^2}{r_{C8H8}^3 r_{C1'H1'}^3} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \hbar^2 (S_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD})^2 (3 \cos^2 \theta_{C8H8,C1'H1'} - 1) \tau_c$$

Dabei sind γ_H und γ_C die gyromagnetischen Konstanten der Wasserstoff- und Kohlenstoffkerne, r_{C6H6} , r_{C8H8} und $r_{C1'H1'}$ die Längen der $\overline{C6H6}$ -, $\overline{C8H8}$ - und

$\overline{C1'H1'}$ -Bindungsvektoren (Abbildung 4.2A), die mit 1.104 Å ($\overline{C6H6}$, $\overline{C8H8}$) und 1.090 Å ($\overline{C1'H1'}$) angenommen wurden. μ_0 die magnetische Feldkonstante des Vakuums, τ_c die isotrope globale Rotationskorrelationszeit des Moleküls, \hbar die Planck-Konstante geteilt durch 2π , $(S_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD})^2$ und $(S_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD})^2$ die kreuzkorrelierten Ordnungsparameter der internen Bewegung und $\theta_{C6H6,C1'H1'}$ sowie $\theta_{C8H8,C1'H1'}$ die Projektionswinkel zwischen den Bindungsvektoren $\overline{C6H6}$ und $\overline{C1'H1'}$ für Pyrimidine bzw. $\overline{C8H8}$ und $\overline{C1'H1'}$ für Purine. Der Projektionswinkel $\theta_{C6H6,C1'H1'}$ ($\theta_{C8H8,C1'H1'}$) ist eine Funktion des glykosidischen Torsionswinkels χ . Daraus folgt, dass eine Funktion $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}(\chi)$ bzw. $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}(\chi)$ existiert, die durch Anwendung linearer Algebra hergeleitet werden kann. Diese geometrische Beziehung ist abhängig von drei Bindungswinkeln (α , β , γ), die als konstant angenommen werden können. Die jeweiligen Winkel α , β und γ sowie die sich daraus ergebenden ε -Winkel für das jeweilige Nukleotid sind in Tabelle 4-1 wiedergegeben.

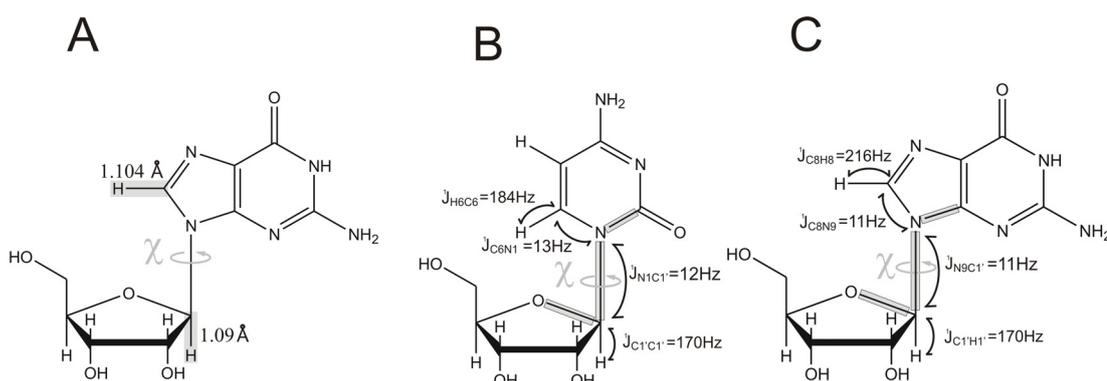


Abbildung 4.2 (A) Bindungsvektoren, deren Projektionswinkel maßgeblich für die Größe der $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Relaxationsraten in Guanosin sind, sind grau unterlegt. In (B) und (C) sind die Größen der experimentell bestimmten skalaren 1J -Kopplungen [249], die für den Magnetisierungstransfer von H6(8) zu H1' im Falle von Pyrimidinen bzw. Purinen für das quantitative Γ -HCNCH-Experiment benötigt werden, dargestellt. Die Bindungen, die grau unterlegt sind, definieren den χ -Winkel.

Tabelle 4-1 Bindungswinkel α , β , γ , die bei der Herleitung der $\theta_{1,6}(\varphi)$ - und $\theta_{1,8}(\varphi)$ -Winkelbeziehungen verwendet wurden.

| | $\alpha = \sphericalangle H1'C1'N1$ | $\beta = \sphericalangle C1'N1C6$ | $\gamma = \sphericalangle N1C6H6$ | $\varepsilon = \alpha + \beta + \gamma$ |
|-----------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---|
| Pyrimidin | | | | |
| Purin | $\alpha = \sphericalangle H1'C1'N9$ | $\beta = \sphericalangle C1'N9C8$ | $\gamma = \sphericalangle N9C8H8$ | $\varepsilon = \alpha + \beta + \gamma$ |
| Uridin | 110.02 | 121.08 | 119.32 | 350.42 |
| Cytidin | 110.02 | 121.08 | 119.73 | 350.83 |
| Adenosin | 110.02 | 129.76 | 121.16 | 360.94 |
| Guanosin | 110.02 | 129.87 | 121.57 | 361.46 |

Das Endergebnis der auf diese Weise hergeleiteten Beziehung zwischen dem Projektionswinkel $\theta_{C1'H1',C6H6}$ ($\theta_{1,6}$) bzw. $\theta_{C1'H1',C8H8}$ ($\theta_{1,8}$) und dem Torsionswinkel χ lautet:

Gleichung 4-3

$$\cos \theta_{1,6(8)} = D \cos(\alpha) + [\cos(\varepsilon) - D \cos(\alpha)] \cos(\chi - 59.01^\circ)$$

Gleichung 4-4

$$D = \cos(\alpha) \cos(\varepsilon) + \sin(\alpha) \sin(\varepsilon)$$

Die $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}(\chi)$ - bzw. $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}(\chi)$ -Beziehungen können in Parametrisierungen ähnlich einer Karplus-Gleichung für J-Kopplungen umgeformt werden. Setzt man den Ausdruck für $\cos \theta_{1,6(8)}$ (Gleichung 4-3) mit Hilfe der trigonometrischen Beziehung

Gleichung 4-5

$$\cos(2*(\chi - 59.01^\circ)) = 2*(\cos(\chi - 59.01^\circ))^2$$

in Gleichung 4-1 bzw. Gleichung 4-2 ein, so erhält man Gleichung 4-6 bzw. Gleichung 4-7.

Gleichung 4-6

$$\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD} = 4.1370\tau_c (S_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD})^2 10^9 (A \cos(\chi - 59.01) + B \cos(2\chi - 118.01) + C)$$

Gleichung 4-7

$$\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD} = 4.1370\tau_c (S_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD})^2 10^9 (A \cos(\chi - 59.01) + B \cos(2\chi - 118.01) + C)$$

Diese sich daraus ergebenden Parametrisierungen sind lediglich abhängig von χ , den kreuzkorrelierten Ordnungsparametern $(S_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD})^2$ und $(S_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD})^2$ sowie der globalen Rotationskorrelationszeit τ_c . Die Parameter A, B und C sind in Tabelle 4-2 für Purine und Pyrimidine angegeben. Die sich daraus ergebenden $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}(\chi)$ - bzw. $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}(\chi)$ -Kurven sind für die cUUCGg-tetraloop-14mer-RNA unter Annahme einer isotropen globalen Rotationskorrelationszeit τ_c von 2.31 ns in Abbildung 4.3 dargestellt [169]. Da die Parametrisierungen für C- und U-Nukleobasen sowie A und G annähernd identisch sind, wurden die vier Parametrisierungskurven der vier verschiedenen Nukleotide zu zwei Parametrisierungskurven für Purine und Pyrimidine zusammengefasst. Die Parametrisierungskurven der vier Nukleobasen sind ebenfalls in Tabelle 4-2 angegeben.

Tabelle 4-2 Parameter für die Berechnung der $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}(\chi)$ - und $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}(\chi)$ -Funktionen entsprechend Gleichung 4-6 und Gleichung 4-7

| | A | B | C |
|------------------|----------|----------|----------|
| Adenosin | 0.575 | 1.195 | 0.230 |
| Guanosin | 0.589 | 1.187 | 0.224 |
| Cytidin | 0.802 | 1.011 | 0.090 |
| Uridin | 0.799 | 1.018 | 0.096 |
| Purin | 0.583 | 1.191 | 0.226 |
| Pyrimidin | 0.801 | 1.015 | 0.093 |

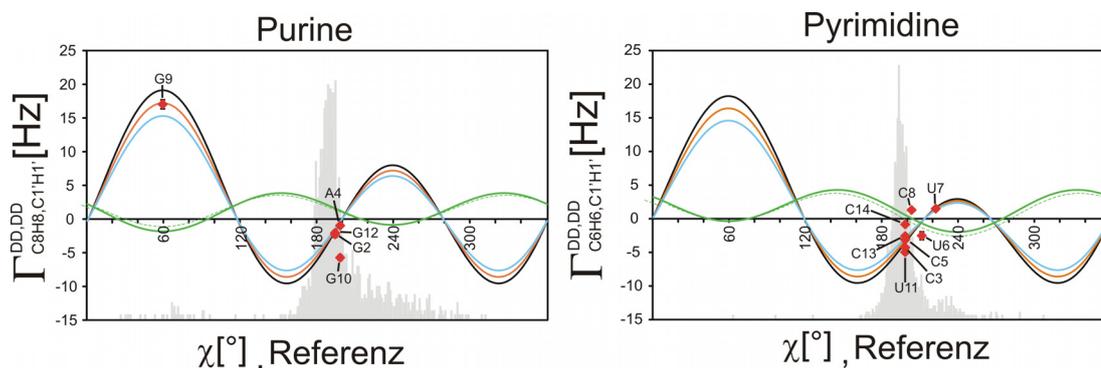


Abbildung 4.3 $\Gamma_{C_{8H_8},C_{1'H_1'}}^{DD,DD}(\chi)$ für Purine und $\Gamma_{C_{6H_6},C_{1'H_1'}}^{DD,DD}(\chi)$ für Pyrimidine. Die Kurven sind jeweils für $(S_{C_{8H_8},C_{1'H_1'}}^{DD,DD})^2$ - und $(S_{C_{6H_6},C_{1'H_1'}}^{DD,DD})^2$ -Werte von 0.8 (hellblau), 0.9 (orange) und 1.0 (schwarz) dargestellt. τ_c wurde für die cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA bei einer Temperatur von 298 K auf 2.31 ns gesetzt [169]. Zusätzlich sind die experimentell bestimmten $\Gamma_{C_{8H_8},C_{1'H_1'}}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C_{6H_6},C_{1'H_1'}}^{DD,DD}$ -Raten der cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA gegen die Referenz χ -Winkel (rote Quadrate) aufgetragen [227]. $\Gamma_{N_9,C_{1'H_1'}}^{CSA,DD}$ für Purine und $\Gamma_{N_1,C_{1'H_1'}}^{CSA,DD}$ für Pyrimidine sind als grüne durchgezogene (Guanin, Cytosin) bzw. gestrichelte (Adenin, Uracil) Linien dargestellt. Die grauen Säulen stellen die χ -Winkelverteilung in der RNA-Fraktion der großen ribosomalen Untereinheit (pdb-ID 1FFK) [250] dar.

Für die kreuzkorrelierten Ordnungsparameter $(S_{C_{6H_6},C_{1'H_1'}}^{DD,DD})^2$ und $(S_{C_{8H_8},C_{1'H_1'}}^{DD,DD})^2$ wurden als Näherung Werte verwendet, die aus den autokorrelierten $(S_{C_{1'H_1'},C_{1'H_1'}}^{DD,DD})^2$ -, $(S_{C_{6H_6},C_{6H_6}}^{DD,DD})^2$ - und $(S_{C_{8H_8},C_{8H_8}}^{DD,DD})^2$ -Ordnungsparametern abgeleitet wurden (Tabelle 4-3). Die autokorrelierten Ordnungsparameter wurden bereits in einer früheren Studie über die Relaxationsanalyse der ^{13}C -Kerne bestimmt [169]. Wie von Vugmeyster et al. gezeigt werden konnte [251], ist dieser Ansatz immer dann möglich, wenn man annimmt, dass die schnellen internen Bewegungen der beiden Bindungsvektoren $\overline{C_{1'H_1'}}$ und $\overline{C_{6H_6}}$ bzw. $\overline{C_{1'H_1'}}$ und $\overline{C_{8H_8}}$ unkorreliert zueinander erfolgen.

4.1.3.1 Einfluss anisotroper Rotationsdiffusion des RNA-Moleküls

Für die cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA ist die Annahme isotroper Rotationsdiffusion gerechtfertigt, da die Anisotropie des Rotationsdiffusionstensors mit $D_{\text{aniso}}=1.35$ klein ist [169]. Bei Molekülen mit eher länglicher Form wie im Falle

der SLD-30mer-RNA kann der Effekt anisotroper Rotationsdiffusion hingegen nicht vernachlässigt werden. Deshalb wurden die $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten unter Berücksichtigung von Größe und Orientierung des axialsymmetrischen Rotationsdiffusionstensors analysiert (siehe Abschnitt 4.1.4.2). An dieser Stelle sollen nun die mathematischen Beziehungen für den Fall der anisotropen axialsymmetrischen Diffusion beschrieben werden.

Für einen axialsymmetrischen Rotationsdiffusionstensor ist die Spektrale Dichte gegeben durch [252, 253]

Gleichung 4-8

$$j_{VW}^q = \frac{1}{20} [(3 \cos^2 \theta_V - 1)(3 \cos^2 \theta_W - 1) * J_{VW}^{q,0} + 12 \cos \theta_V \cos \theta_W \sin \theta_V \sin \theta_W \cos(\varphi_V - \varphi_W) * J_{VW}^{q,1} + 3 \sin^2 \theta_V \sin^2 \theta_W \cos(2\varphi_V - 2\varphi_W) * J_{VW}^{q,2}]$$

In Gleichung 4-8 ist j_{VW}^q die spektrale Dichte und $J_{VW}^{q,m}$ ($-2 \leq m \leq 2$) die reduzierte Spektrale Dichte. Die Winkel θ_V , θ_W , φ_V und φ_W geben die Orientierung der beiden Bindungsvektoren V und W bezüglich des Rotationsdiffusionstensors in Polarkoordinaten an. $J_{VW}^{q,m}$ ($-2 \leq m \leq 2$) kann über Gleichung 4-9 folgendermaßen ausgedrückt werden

Gleichung 4-9

$$J_{VW}^{q,m} = \frac{2\tau_{c,m}}{(1 + (\omega_q \tau_{c,m})^2)}$$

In Gleichung 4-9 stellt $\tau_{c,m}$ die globale Rotationskorrelationszeit und ω_q die Frequenz dar. Die Rotationskorrelationszeit τ_c kann entsprechend Gleichung 4-10 formuliert werden

Gleichung 4-10

$$\frac{1}{\tau_c} = 6D_{\text{vertikal}} + m^2(D_{\text{parallel}} - D_{\text{vertikal}})$$

In Gleichung 4-10 stellen D_{vertikal} und D_{parallel} die beiden Achsen eines axialsymmetrischen Rotationsdiffusionstensors dar. Die Anisotropie D_{aniso} dieses Tensors ist definiert als

Gleichung 4-11

$$D_{\text{aniso}} = \frac{D_{\text{parallel}}}{D_{\text{vertikal}}}$$

Daraus folgt, dass D_{vertikal} ausgedrückt werden kann als

Gleichung 4-12

$$D_{\text{vertikal}} = \frac{1}{2\tau_c(2 + D_{\text{aniso}})}$$

Für einen axialsymmetrischen Diffusionstensor kann $\varphi_W = 0$ angenommen werden. Dadurch vereinfacht sich die Funktion der Spektralen Dichte (Vergleich zu Gleichung 4-8) zu

Gleichung 4-13

$$j_{VW}^q = \frac{1}{20}[(3 \cos^2 \theta_V - 1)(3 \cos^2 \theta_W - 1) * J_{VW}^{q,0} + 12 \cos \theta_V \cos \theta_W \sin \theta_V \sin \theta_W \cos(\varphi_V) * J_{VW}^{q,1} + 3 \sin^2 \theta_V \sin^2 \theta_W \cos(2\varphi_V) * J_{VW}^{q,2}]$$

Um die Abhängigkeit der Spektralen Dichte-Funktion vom Projektionswinkel $\theta_{1,6(8)}$ zwischen den beiden Bindungsvektoren $\overline{C6H6(C8H8)}$ und $\overline{C1'H1'}$ zu erhalten, muss die folgende Beziehung verwendet werden, um φ_V in Gleichung 4-13 zu eliminieren.

Gleichung 4-14

$$\varphi_V = \arccos \left[\frac{(\cos \theta_{1,6(8)} - \cos \theta_V \cos \theta_W)}{\sin \theta_V \sin \theta_W} \right]$$

Einsetzen von Gleichung 4-14 in Gleichung 4-13 ergibt:

Gleichung 4-15

$$\begin{aligned} j_{VW}^q &= \frac{1}{20} [(3 \cos^2 \theta_V - 1)(3 \cos^2 \theta_W - 1) * J_{VW}^{q,0} \\ &+ 12 \cos \theta_V \cos \theta_W \sin \theta_V \sin \theta_W \cos \left(\arccos \left[\frac{(\cos \theta_{1,6(8)} - \cos \theta_V \cos \theta_W)}{\sin \theta_V \sin \theta_W} \right] \right) * J_{VW}^{q,1} \\ &+ 3 \sin^2 \theta_V \sin^2 \theta_W \cos \left(2 \arccos \left[\frac{(\cos \theta_{1,6(8)} - \cos \theta_V \cos \theta_W)}{\sin \theta_V \sin \theta_W} \right] \right) * J_{VW}^{q,2}] \end{aligned}$$

Letztlich können die $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten für den Fall der axialsymmetrischen anisotropen Rotationsdiffusion durch Einsetzen von j_{VW}^0 , das über Gleichung 4-15 berechnet werden kann, in Gleichung 4-16 bestimmt werden.

Gleichung 4-16

$$\Gamma_{C6(8)H6(8),C1'H1'}^{DD,DD} = \frac{\gamma_H^2 \gamma_C^2}{r_{C6(8)H6(8)}^3 r_{C1'H1'}^3} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \hbar^2 (S_{C6(8)H6(8),C1'H1'}^{DD,DD})^2 * j_{VW}^0$$

Die verwendete Nomenklatur für θ_V , θ_W , $\theta_{1,6}$ und $\theta_{1,8}$ ist in Abbildung 4.11A verdeutlicht.

4.1.3.2 Pulssequenz

Das quantitative Γ -HCNCH-Experiment (Abbildung 4.4) ist mit dem HCN- und dem HCNCH-Experiment verwandt [117, 118, 254, 255]. Es ist so konzipiert, dass die Magnetisierung von den H6(H8)-Kernen zu den H1'-Kernen transferiert wird, wo letztlich die Detektion stattfindet. Das Schema ist insofern mit dem

quantitativen Γ -HCCH-Experiment verwandt, dass die Magnetisierung nicht auf dem Startkern detektiert wird [235, 256]. Die Kohärenz zum Zeitpunkt **a** wird über drei aufeinanderfolgende INEPT-Schritte erzeugt. Dabei wird die Kohärenz von H6(H8) zu C1' transferiert. Während der Mischzeit T_M entwickelt sich die Kohärenz $8H6(8)_z C6(8)_y C1'_y N1(9)_z$ zu Zeitpunkt **a** in die Kohärenz $8H1'_z C6(8)_x C1'_x N1(9)_z$ zu Zeitpunkt **b**. Frequenzmarkierung mit der chemischen Verschiebung der C1'-Kerne erfolgt in einer *constant time* Art und Weise während des zweiten Refokussierungs-INEPT-Schrittes des Magnetisierungstrfers zu H1' nach der Mischzeit T_M . Im Falle spektraler Überlappung bestimmter Signale kann zusätzlich oder alternativ zur C1'-chemischen Verschiebung die N1(9)-chemische Verschiebung entwickelt werden. Dies geschieht in einer *constant time* Art und Weise während des ersten Refokussierungs-INEPT-Schrittes nach der Mischzeit T_M . Alternativ ist auch ein weiterer Magnetisierungstrferweg denkbar, der vom H1' startet und auf dem H6(H8) endet. Die Pulssequenz mit entgegengesetztem Kohärenztransfer ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Die Analyse der kreuzkorrelierten Relaxationsraten basiert auf der Analyse von Daten, die mit beiden Pulssequenzen bei unterschiedlichen Mischzeiten T_M erhalten wurden. Der angegebene Fehler entspricht dem RMSD, der aus sechs unabhängigen Messungen mit beiden Pulssequenzen und verschiedenen Mischzeiten T_M errechnet wurde (Abbildung 4.6). Die verschiedenen INEPT-Zeitabschnitte für den Magnetisierungstrfer wurden unter Berücksichtigung der jeweils maßgebenden Kopplungskonstanten (Abbildung 4.2) optimiert.

Es wurden jeweils zwei separate Experimente, ein Kreuz- und ein Referenzexperiment, durchgeführt. Im Kreuzexperiment wird die Kohärenz, die zum Zeitpunkt **b** selektiert wird, für Pyrimidine $\sinh\left(\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD} T_M\right)$ und für Purine $\sinh\left(\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD} T_M\right)$ moduliert. Im Referenzexperiment wird die Kohärenz, die zum Zeitpunkt **b** selektiert wird, für Pyrimidine $\cosh\left(\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD} T_M\right) * \sin(\pi J_{C6H6} \Delta')$ und für Purine $\cosh\left(\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD} T_M\right) * \sin(\pi J_{C8H8} \Delta')$ moduliert.

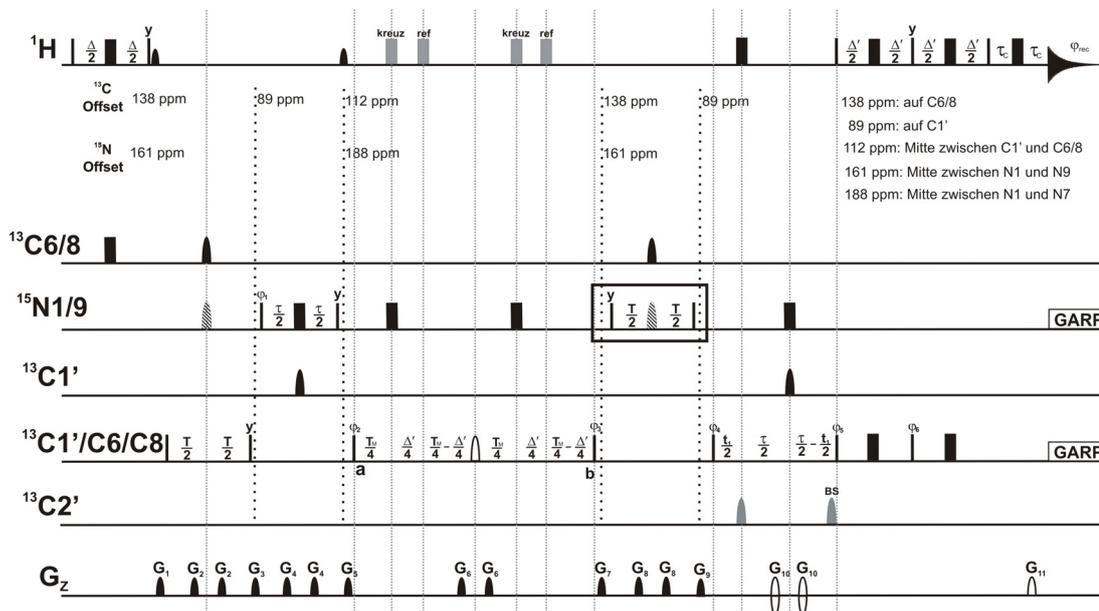


Abbildung 4.4 Pulssequenz des quantitativen Γ -HCNCH-Experiments. Schmale und breite gefüllte Rechtecke entsprechen 90° - und 180° -Rechteckpulsen. Selektive Pulse und Gradienten sind als Semiellipsen dargestellt. Die Standardpulsphase ist x . Die Pulssequenz wurde an Bruker Spektrometern mit der für Bruker typischen Phasendefinition optimiert [257]. Das Referenz- und das Kreuzexperiment sind in einem Pulssequenzschema zusammengefasst. Die grauen breiten Rechtecke entsprechen 180° -Pulsen, die auf dem Protonenkanal entweder im Kreuz- oder im Referenzexperiment, wie angegeben, angewendet werden. Zwei Wasser-Flipback-Pulse werden auf dem Protonenkanal jeweils nach den INEPT-Schritten vor der Mischzeit T_M angewendet (kleine schwarze Semiellipsen). Zwei selektive „off-Resonanz“-Pulse, die auf $C2'$ während der *constant time* ^{13}C -chemischen Verschiebungsentwicklung angewendet werden, sind in grau dargestellt. Feste Zeitspannen werden wie folgt gesetzt: $\Delta'=2.94\text{ ms}$ ($1/(2 \cdot ^1J_{\text{H}^{(8)}\text{C}^{(8)})}$), $\Delta=2.5\text{ ms}$ ($1/(2 \cdot ^1J_{\text{H}^{(6)}\text{C}^{(6)})}$), $T=32\text{ ms}$ ($1/(2 \cdot ^1J_{\text{C}^{(8)}\text{N}^{(9)})}$), $\tau=36\text{ ms}$ ($1/(2 \cdot ^1J_{\text{N}^{(9)}\text{C}^{(1)'}}$). T_M ist die variable Doppel- und Nullquanten-Relaxationsperiode. Die Protonenträgerfrequenz wird auf die Wasserresonanz (4.7 ppm) gesetzt. Die Kohlenstoff- und Stickstoffträgerfrequenzen ändern sich während des Experiments. Dies wird durch die senkrechten gestrichelten Linien angedeutet. Die Werte der jeweiligen ^{13}C und ^{15}N Offsets zu jedem Zeitpunkt, sind ebenfalls angegeben. Bei 700 MHz werden anregungsselektive Pulse wie folgt gesetzt: 180° -Q3-Gauß-Kaskade [258] 2 ms (schwarze Semiellipse), 180° -Q3-Gauß-Kaskade 1 ms (graue Semiellipse), 180° -Q3-Gauß-Kaskade 0.5 ms (gestrichelte Semiellipse), 180° -ReBurp [259] 2.53 ms mit Maxima auf $C1'$ und $C6/8$ (offene Semiellipse), 90° -Rechteckpuls 1 ms (kleine schwarze Semiellipse, Wasser-Flipback-Puls). Um heteronukleare skalare Kopplungen während der Datenaufnahme zu unterdrücken, wird asynchrone GARP-Entkopplung [110] verwendet. Die gepulsten Gradienten haben eine *smoothed Chirp* Amplitude (Bruker Topspin 2.0, 2006). Sie werden entlang der z -Achse angewendet und haben die folgenden Stärken: G_1 :-40%, G_2 :25%, G_3 :50%, G_4 :20%, G_5 :-40%, G_6 :20%, G_7 :65%, G_8 :20%, G_9 :50%, G_{10} :40%, G_{11} :20.1%. 100% der Gradientenstärke entsprechen 55Gauss/cm. Phasenzklus: $\phi_1 = x, -x$; $\phi_2 = 8(x), 8(-x)$; $\phi_3 = 16(y), 16(-$

y); $\varphi_4 = 4(y), 4(-y)$; $\varphi_5 = 2(x), 2(-x)$; $\varphi_6 = 2(-y), 2(y)$; $\varphi_{\text{rec}} = x, 2(-x), x, -x, 2(x), -x$. G_{10} und φ_6 werden entsprechend Echo/Antiecho *sensitivity enhancement* [260] Modulation in der ω_1 -Dimension variiert. Zu Zeitpunkt **a** wird die Kohärenz $H6(8)_z C6(8)_y C1'_y N1(9)_z$ erzeugt. Während T_M wird diese in die Kohärenz $H1'_z C6(8)_x C1'_x N1(9)_z$ zu Zeitpunkt **b** überführt. Falls zusätzliche chemische Verschiebungsdispersion benötigt wird, kann eine *constant time* $N1(9)$ -Entwicklungsperiode der chemischen Verschiebung während des ersten Refokussierungs-INEPT eingeführt werden (mit schwarzer Box angedeutet). In diesem Fall wird φ_4 nach States-TPPI [261] inkrementiert, um Quadraturdetektion in der $N1(9)$ -Dimension zu erreichen.

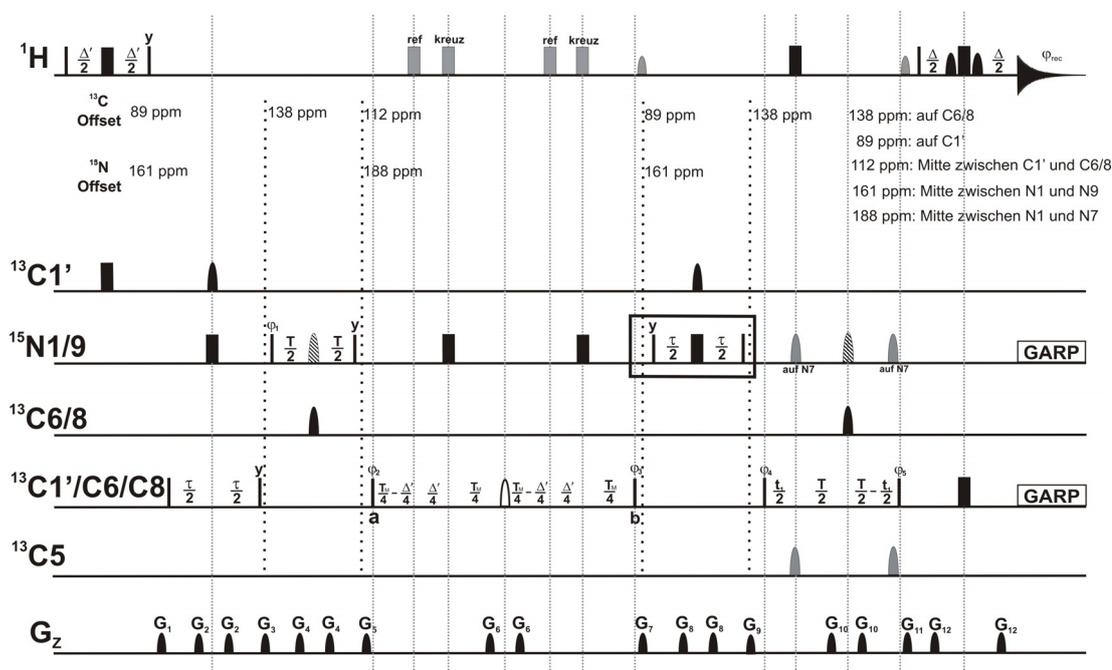


Abbildung 4.5 Pulssequenz des quantitativen Γ -HCNCH-Experiments. Schmale und breite gefüllte Rechtecke entsprechen 90° - und 180° -Rechteckpulsen. Selektive Pulse und Gradienten sind als Semiellipsen dargestellt. Die Standardpulsphase ist x . Die Pulssequenz wurde an Bruker Spektrometern mit der für Bruker typischen Phasendefinition optimiert [257]. Das Referenz- und das Kreuzexperiment sind in einem Pulssequenzschema zusammengefasst. Die grauen breiten Rechtecke entsprechen 180° -Pulsen, die auf dem Protonenkanal entweder im Kreuz- oder im Referenzexperiment, wie angegeben, angewendet werden. Zwei Wasser-Flipback-Pulse werden auf dem Protonenkanal jeweils vor dem ersten und letzten Refokussierungs-INEPT-Schritt nach der Mischzeit T_M angewendet (kleine graue Semiellipsen). Zwei selektive „off-Resonanz“-Pulse auf $C5$ und zwei selektive „off-Resonanz“-Pulse auf $N7$ werden während der *constant time* ^{13}C -chemischen Verschiebungsentwicklung auf dem ^{13}C - und dem ^{15}N -Kanal angewendet. Sie sind als graue Semi-Ellipsen dargestellt. Feste Zeitspannen werden wie folgt gesetzt: $\Delta' = 2.94 \text{ ms}$ ($1/(2 \cdot J_{\text{H}1'\text{C}1'})$), $\Delta = 2.5 \text{ ms}$ ($1/(2 \cdot J_{\text{H}6(8)\text{C}6(8)})$), $T = 32 \text{ ms}$ ($1/(2 \cdot J_{\text{C}6(8)\text{N}1(9)})$), $\tau = 36 \text{ ms}$ ($1/(2 \cdot J_{\text{N}1(9)\text{C}1'})$). T_M ist die variable

Doppel- und Nullquanten-Relaxationsperiode. Die Protonenträgerfrequenz wird auf die Wasserresonanz (4.7 ppm) gesetzt. Die Kohlenstoff- und Stickstoffträgerfrequenzen ändern sich während des Experiments. Dies wird durch die senkrechten gestrichelten Linien angedeutet. Die Werte der jeweiligen ^{13}C und ^{15}N *Offsets* zu jedem Zeitpunkt, sind jeweils rechts neben diesen Linien vermerkt. Bei 700 MHz werden anregungsselektive Pulse wie folgt gesetzt: 180° -Q3-Gauß-Kaskade [258] 2 ms (schwarze Semiellipse), 180° -Q3-Gauß-Kaskade 1 ms (graue Semiellipse), 180° -Q3-Gauß-Kaskade 0.5 ms (gestrichelte Semiellipse), 180° -ReBurp [259] 2.53 ms mit Maxima auf C1' und C6/8 (offene Semiellipse), 90° -Rechteckpuls 1 ms (kleine graue Semiellipse, Wasser-*Flipback*-Puls), 90° -Rechteckpuls 0.7 ms (kleine schwarze Semiellipse, selektiver *Watergate*-Puls). Um heteronukleare skalare Kopplungen während der Datenaufnahme zu unterdrücken, wird asynchrone GARP-Entkopplung [110] verwendet. Die gepulsten Gradienten haben eine *smoothed Chirp* Amplitude (Bruker Topspin 2.0, 2006). Sie werden entlang der z-Achse angewendet und haben die folgenden Stärken: G_1 :-40%, G_2 :25%, G_3 :50%, G_4 :20%, G_5 :-40%, G_6 :20%, G_7 :65%, G_8 :20%, G_9 :50%, G_{10} :40%, G_{11} :20%, G_{12} :80%. G_1 - G_{11} haben eine Länge von 1 ms, G_{12} ist 0.5 ms lang. 100% der Gradientenstärke entsprechen 55Gauss/cm. Phasenzklus: $\varphi_1 = x,-x$; $\varphi_2 = 8(x),8(-x)$; $\varphi_3 = 16(y),16(-y)$; $\varphi_4 = 4(y),4(-y)$; $\varphi_5 = 2(x),2(-x)$; $\varphi_6 = 2(-y),2(y)$; $\varphi_{\text{rec}} = x,2(-x),x,-x,2(x),-x$. Zusätzlich dazu wird φ_4 nach States-TPPI [261] inkrementiert, um Quadraturdetektion in der ω_1 -Dimension zu erreichen. Zu Zeitpunkt **a** wird die Kohärenz $H1'_zC6(8)_yC1'_yN1(9)_z$ erzeugt. Während T_M wird diese in die Kohärenz $H6(8)_zC6(8)_xC1'_xN1(9)_z$ zu Zeitpunkt **b** überführt. Falls zusätzliche chemische Verschiebungsdispersion benötigt wird, kann eine $N1(9)$ *constant time* Entwicklungsperiode der chemischen Verschiebung während des ersten Refokussierungs-INEPT eingeführt werden (mit schwarzer Box angedeutet). In diesem Fall wird φ_3 nach States-TPPI [261] inkrementiert, um Quadraturdetektion in der $N1(9)$ -Dimension zu erreichen.

Der gemessene Kreuzkorrelationseffekt vergrößert sich mit länger werdender Mischzeit T_M . Das Signal der entsprechenden Kohärenz wird jedoch gleichzeitig mit steigendem T_M durch autokorrelierte Relaxationseffekte abgeschwächt. Demzufolge existiert ein Bereich optimaler Sensitivität für das Kreuzexperiment. Dieser liegt für die 14mer-RNA zwischen 20-30 ms und für die 30mer-RNA zwischen 10-15 ms.

In Falle von Pyrimidinen kann die Entwicklung der Doppel- und Nullquantenkohärenz $8H6_zC6_yC1'_yN1_z$ während T_M beschrieben werden durch

Gleichung 4-17

$$8H6_zC6_yC1'_yN1_z \rightarrow$$

$$\begin{aligned}
& 8H6_z C6_y C1'_y N1_z [\cosh(\Gamma_{C6H6, C1'H1'}^{DD, DD} T_M) \cos(\pi J_{C6H6} \Delta') \cos(\pi J_{C1'H1'} \Delta') + \\
& \sinh(\Gamma_{C6H6, C1'H1'}^{DD, DD} T_M) \sin(\pi J_{C6H6} \Delta') \sin(\pi J_{C1'H1'} \Delta')] + \\
& 8H1'_z C6_x C1'_x N1_z [\sinh(\Gamma_{C6H6, C1'H1'}^{DD, DD} T_M) \cos(\pi J_{C6H6} \Delta') \cos(\pi J_{C1'H1'} \Delta') + \\
& \cosh(\Gamma_{C6H6, C1'H1'}^{DD, DD} T_M) \sin(\pi J_{C6H6} \Delta') \sin(\pi J_{C1'H1'} \Delta')]
\end{aligned}$$

Für Purine ist die Nomenklatur der involvierten Kerne unterschiedlich (H8→H6, C8→C6, N9→N1). Während T_M wird die Kohärenz $8H6(8)_z C6(8)_y C1'_y N1(9)_z$ in die Kohärenz $8H1'_z C6(8)_x C1'_x N1(9)_z$, die am Ende der Mischzeit selektiert wird, umgewandelt. Diese Kohärenzumwandlung findet im Referenzexperiment über skalare Kopplung und im Kreuzexperiment über kreuzkorrelierte Relaxation statt.

Im Referenzexperiment mit $\Delta' = 1/(2 * J_{C1'H1'})$ ist die Intensität des Signals I^{ref} proportional zu $\cosh(\Gamma_{C6H6, C1'H1'}^{DD, DD} T_M) \sin(\pi J_{C6H6} \Delta')$. Im Kreuzexperiment wird die skalare Kopplung aufgrund von $\Delta' = 0$ vollständig refokussiert. Daraus ergibt sich, dass die Signalintensität I^{cross} mit $\sinh(\Gamma_{C6H6, C1'H1'}^{DD, DD} T_M)$ moduliert ist. Folglich ergibt die Division der beiden Intensitäten einen Ausdruck für die kreuzkorrelierte Relaxationsrate entsprechend:

Gleichung 4-18

$$\Gamma_{C6H6, C1'H1'}^{DD, DD} = T_M^{-1} \tanh^{-1} \left(\frac{ns^{ref} I^{cross} \sin(\pi J_{C6H6} \Delta')}{ns^{cross} I^{ref}} \right)$$

Gleichung 4-19

$$\Gamma_{C8H8, C1'H1'}^{DD, DD} = T_M^{-1} \tanh^{-1} \left(\frac{ns^{ref} I^{cross} \sin(\pi J_{C8H8} \Delta')}{ns^{cross} I^{ref}} \right)$$

In Gleichung 4-18 bzw. Gleichung 4-19 ist T_M die Länge der Doppel- und Nullquanten-Mischzeit, ns^{ref} und ns^{cross} sind die Anzahl der aufgenommenen Einzelerperimente pro Inkrement im Referenz- bzw. Kreuzexperiment. I^{cross} und I^{ref} sind die Intensitäten der Signale aus dem Spektrum des Kreuz- bzw. Referenzexperiments. Die Terme $\sin(\pi J_{C6H6} \Delta')$ und $\sin(\pi J_{C8H8} \Delta')$ mit $\Delta' = 2.94$ ms

berücksichtigen die Unterschiede in der entsprechenden skalaren Kopplung zwischen Purinen (216 Hz) und Pyrimidinen (184 Hz). Eine Variation der J_{C8H8} -Kopplung der Purine um ± 5 Hz würde zu einem relativen Fehler der $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Rate von lediglich 1.3% führen. Bei Purinen in der syn-Konformation berechnet sich der absolute Fehler zu 0.26 Hz bei einem τ_c von 2.31 ns. Für Purine in der anti-Konformation ist der Fehler viel zu klein, um einen Effekt zu haben, da die absolute Rate in diesen Fällen sehr klein ausfällt. Eine Variation von ± 5 Hz für die J_{C6H6} - und die $J_{C1'H1'}$ -Kopplungen würde ebenfalls nur zu sehr geringen Fehlern in der Ratenbestimmung führen. Aus diesem Grund kann eine eventuelle Variation der entsprechenden skalaren 1J -Kopplungen bei der Auswertung vernachlässigt werden.

Es bleibt zu diskutieren inwieweit und in welchem Ausmaß andere kreuzkorrelierte Relaxationsmechanismen als die zu untersuchenden $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ ($\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$)-Raten zur Relaxation während der Mischzeit T_M beitragen. Die meisten anderen kreuzkorrelierten Relaxationsraten werden durch eine geschickte Anordnung der 180° -Pulse auf den verschiedenen Kanälen unterdrückt. Die Relaxationsraten, die nicht unterdrückt werden, relaxieren zu Produktoperatoren mit anderer Ordnung oder anderen Phasen. Diese Operatoren werden weder im Kreuzexperiment noch im Referenzexperiment aufgenommen und durch eine Kombination aus gepulsten Gradienten und Phasenzyklen unterdrückt.

Die Entwicklung der kreuzkorrelierten Relaxationsraten $\Gamma_{C6H6,C1'}^{DD,CSA}$, $\Gamma_{C8H8,C1'}^{DD,CSA}$, $\Gamma_{C1'H1',C6}^{DD,CSA}$ und $\Gamma_{C1'H1',C8}^{DD,CSA}$ wird durch die π -Pulse auf dem Protonenkanal im Kreuzexperiment unterdrückt. Allerdings entwickeln sich diese Raten im Referenzexperiment für die Zeit der skalaren Kopplungsentwicklung (2.94 ms). Natürlich entwickeln sich die zu messenden Raten $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ während der gesamten Mischzeit, während die Raten $\Gamma_{C6H6,C1'}^{DD,CSA}$, $\Gamma_{C8H8,C1'}^{DD,CSA}$, $\Gamma_{C1'H1',C6}^{DD,CSA}$ und $\Gamma_{C1'H1',C8}^{DD,CSA}$ sich nur für 2.94 ms, unabhängig von der Länge der Mischzeit T_M , entwickeln. Deshalb reduzieren sich die Raten „anscheinend“ mit länger werdenden Mischzeiten. Die Signalintensitäten des Referenzexperiments gehen in die Ratenberechnung (Gleichung 4-20, Gleichung 4-21) als cosh-modulierte Terme ein.

Die simulierten $\Gamma_{C1'H1',C6}^{DD,CSA}(\chi)$ - und $\Gamma_{C1'H1',C8}^{DD,CSA}(\chi)$ -Kurven wurden zur Berechnung der Fehler in der syn- und der anti-Konformation verwendet. Die maximalen Werte für die syn-Konformation sind $\Gamma_{C1'H1',C6}^{DD,CSA} = 13.4$ Hz und $\Gamma_{C1'H1',C8}^{DD,CSA} = 11.0$ Hz. Für die anti-Konformation ergeben sich wesentlich geringere Werte, die außerdem stark von χ abhängig sind. Für die $\Gamma_{C6H6,C1'}^{DD,CSA}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'}^{DD,CSA}$ -Raten wurde zur Fehlerabschätzung der Maximalwert berechnet, da die Orientierung des C1'-CSA-Tensors im Molekülkoordinatensystem nicht bekannt ist. $\Gamma_{C6H6,C1'}^{DD,CSA}$ und $\Gamma_{C8H8,C1'}^{DD,CSA}$ können Maximalwerte von 3.0 Hz annehmen. Aufgrund der geringen Größe der C1'-CSA, ist der Fehler, der durch die $\Gamma_{C6H6,C1'}^{DD,CSA}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'}^{DD,CSA}$ -Raten verursacht wird, vernachlässigbar.

Wenn man die $\Gamma_{C1'H1',C6}^{DD,CSA}$ - und $\Gamma_{C1'H1',C8}^{DD,CSA}$ -Raten mit einbezieht, wird Gleichung 4-18 und Gleichung 4-19 zu

Gleichung 4-20

$$\frac{\sinh\left(\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD} * T_M\right)}{\cosh\left(\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD} * T_M + \Gamma_{C1'H1',C6}^{DD,CSA} * 2.94ms\right)} = \left(\frac{ns^{ref} I^{cross} \sin(\pi J_{C6H6}\Delta')}{ns^{cross} I^{ref}}\right)$$

Gleichung 4-21

$$\frac{\sinh\left(\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD} * T_M\right)}{\cosh\left(\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD} * T_M + \Gamma_{C1'H1',C8}^{DD,CSA} * 2.94ms\right)} = \left(\frac{ns^{ref} I^{cross} \sin(\pi J_{C8H8}\Delta')}{ns^{cross} I^{ref}}\right)$$

Die Fehlerberechnung wurde auf Grundlage von Gleichung 4-20 und den simulierten $\Gamma_{C1'H1',C6}^{DD,CSA}$ -Raten bzw. Gleichung 4-21 und den simulierten $\Gamma_{C1'H1',C8}^{DD,CSA}$ -Raten durchgeführt. Generell gilt, dass solange das Argument der cosh-Funktion sehr klein ist (<0.1), der Fehler ebenfalls klein ist, da die Steigung der cosh-Funktion für kleine Argumente sehr klein ist.

Da die $\Gamma_{C1'H1',C6}^{DD,CSA}$ - und $\Gamma_{C1'H1',C8}^{DD,CSA}$ -Raten den cosh-modulierten Term des Referenzexperiments beeinflussen und sich nur für 2.94 ms entwickeln, hängt der

Fehler von der Mischzeit ab. Für eine Mischzeit von 30 ms berechnet sich der maximale Fehler, der durch die $\Gamma_{C1'H1',C6}^{DD,CSA}$ - und $\Gamma_{C1'H1',C8}^{DD,CSA}$ -Raten verursacht wird, zu 2.2%. Dies entspricht 0.4 Hz für den G9-Rest der 14mer-RNA, der bezüglich des Winkels χ die syn-Konformation annimmt. Für Nukleotide, die die anti-Konformation annehmen, ist der Fehler, der durch die $\Gamma_{C1'H1',C6}^{DD,CSA}$ - und $\Gamma_{C1'H1',C8}^{DD,CSA}$ -Raten verursacht wird, vernachlässigbar klein (<0.03 Hz für die 14mer-RNA).

4.1.4 Resultate und Diskussion

4.1.4.1 cUUCGg-tetraloop-14mer-RNA

Das quantitative Γ -HCNCH-Experiment für die Bestimmung des glykosidischen Bindungswinkels χ wurde an einer cUUCGg-tetraloop-14mer-RNA-Probe durchgeführt (Abbildung 4.1A). Für dieses RNA-Molekül sind die chemischen Verschiebungen fast aller Kerne bekannt [126]. Es besteht aus einem A-Form-Helixstamm, der sich aus fünf kanonischen Basenpaaren zusammensetzt und einer strukturierten *loop*-Region, in der ein Nukleotid (G9) die syn-Konformation annimmt [193, 196]. Das Molekül ist auch noch bei hohen Konzentrationen löslich und liegt in einer monomeren Form vor. Zusätzlich dazu wurden bereits zuvor die $\Gamma_{N1,C1'H1'}^{CSA,DD}$ - und $\Gamma_{N9,C1'H1'}^{CSA,DD}$ -Raten gemessen, um den χ -Winkel für diese RNA zu bestimmen. Diese Resultate können demnach direkt mit den neu ermittelten Daten aus dem quantitativen Γ -HCNCH-Experiment verglichen werden. Es existieren eine Kristallstruktur des cUUCGg-tetraloops (pdb-ID 1F7Y) [196] und ein NMR-Strukturensemble (pdb-ID 1HLX) [193]. Die χ -Winkel aus dem Γ -HCNCH-Experiment wurden mit den χ -Winkeln aus der Kristallstruktur verglichen. Das NMR-Strukturensemble ist für einen Vergleich ungeeignet, da die Streuung der χ -Winkel zwischen den einzelnen Strukturen des Ensembles zu groß ist. Zusätzlich dazu dienten auch die χ -Winkel, die aus $^3J(C,H)$ -Kopplungskonstanten abgeleitet wurden, als Vergleich.

Abbildung 4.3 zeigt die $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}(\chi)$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}(\chi)$ -Funktionen. Die Kurven zeigen, dass eine eindeutige Unterscheidung zwischen der syn- und der anti-

Konformation anhand der Größe der jeweiligen Raten für alle vier Nukleotidtypen (A, U, C, G) möglich ist. Die Steigung der $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}(\chi)$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}(\chi)$ -Funktionen ist für Nukleotide in der anti-Konformation groß. Außerdem weisen die Funktionen in diesem Bereich einen Vorzeichenwechsel auf. Da die Genauigkeit der Winkelbestimmung von der Steigung der Parametrisierungsfunktion bestimmt wird, ist die χ -Winkelbestimmung für Nukleotide in der anti-Konformation besonders genau. Abbildung 4.3 zeigt außerdem die $\Gamma_{N1,C1'H1'}^{CSA,DD}(\chi)$ - und $\Gamma_{N9,C1'H1'}^{CSA,DD}(\chi)$ -Funktionen. Diese Relaxationsraten sind viel kleiner, als die hier verwendeten dipolaren kreuzkorrelierten Relaxationsraten $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ und zeigen ein anderes absolutes Vorzeichen in den Regionen, die der χ -Winkel normalerweise (anti-Konformation) annimmt.

Die Spektren der Kreuz- und Referenzexperimente des quantitativen Γ -HCNCH sind in Abbildung 4.7 dargestellt. $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten wurden entsprechend Gleichung 4-18 bzw. Gleichung 4-19 über die Signalintensitäten der Kreuz- und Referenzspektren bestimmt. Die $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten wurden mit der Pulssequenz, die in Abbildung 4.4 dargestellt ist, mit Mischzeiten von $T_M = 20$ ms und $T_M = 30$ ms aufgenommen. Um überlappende Signale aufzulösen, wurden die Messungen zusätzlich mit einer chemischen Verschiebungs-Entwicklungsperiode für die N1/N9-Kerne anstelle der C1'-Kerne durchgeführt. Außerdem wurden die $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten mit der alternativen Pulssequenz, die in Abbildung 4.5 dargestellt ist, für Mischzeiten von $T_M = 20$ ms und $T_M = 30$ ms gemessen. Bei dieser Pulssequenz wird die Magnetisierung in umgekehrter Richtung von den H1'-Kernen zu den H6(H8)-Kernen transferiert. Die extrahierten Raten sind in Tabelle 4-3 wiedergegeben. Der Fehler, der in Tabelle 4-3 angegeben ist, entspricht dem RMSD der sechs unterschiedlichen Messungen. Die Ergebnisse aller Messungen sind in Abbildung 4.12 zusammengefasst. Die Tatsache, dass auf drei verschiedene Arten und mit zwei unterschiedlichen Mischzeiten die gleichen $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten gemessen werden konnten (kleiner

RMSD), weist auf eine hohe Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der ermittelten Daten hin.

Die Fehler der Raten, die man aus den verschiedenen Experimenten erhält, liegen zwischen 0.1 Hz und 0.6 Hz (Tabelle 4-3). Dies ist relativ genau, wenn man bedenkt, dass der Bereich der Absolutwerte der möglichen Raten für die 14mer-RNA von -10 Hz bis +19 Hz reicht. Die Korrelation der $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten mit den χ -Winkeln aus der Kristallstruktur (pdb-ID 1F7Y) [196] ist ebenfalls in Abbildung 4.3 dargestellt. Der Vergleich zeigt, dass die experimentell bestimmten Relaxationsraten gut mit den vorhergesagten Relaxationsraten übereinstimmen.

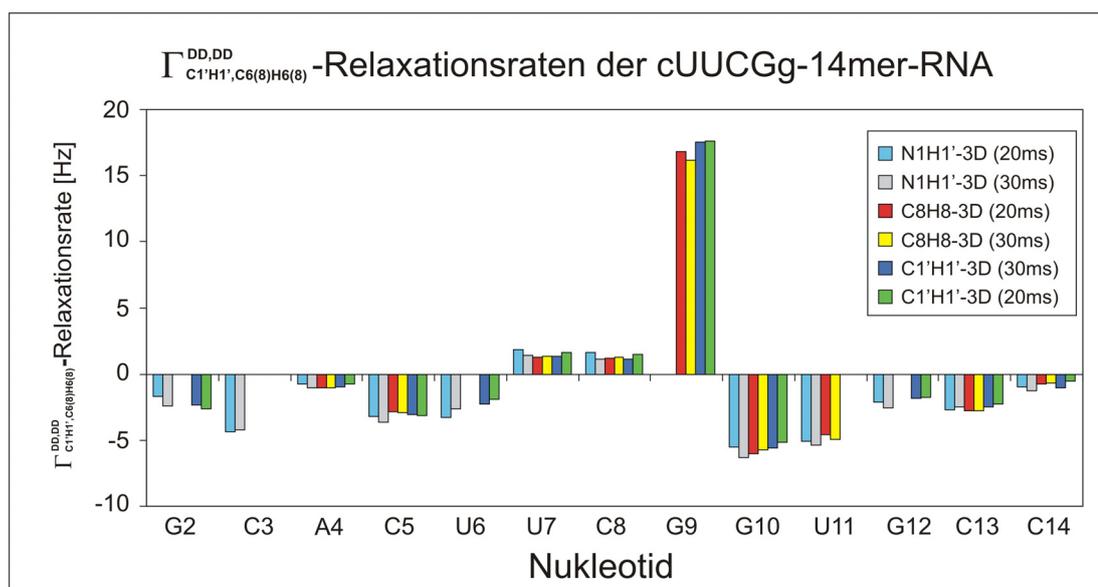


Abbildung 4.6 $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ [Hz]- und $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ [Hz]-Raten gemessen an der cUUCGg-tetraloop-14mer-RNA bei einer Temperatur von 298 K. Hellblau: Detektion auf H1', N1(9)-H1'-Evolution der chemischen Verschiebung, $T_m = 20$ ms. Grau: Detektion auf H1', N1(9)-H1'-Evolution der chemischen Verschiebung, $T_m = 30$ ms. Rot: Detektion auf H6(8), C6(8)-H6(8)-Evolution der chemischen Verschiebung, $T_m = 20$ ms. gelb: Detektion auf H6(8), C6(8)-H6(8)-Evolution der chemischen Verschiebung, $T_m = 30$ ms. dunkelblau: Detektion auf H1', C1'-H1'-Evolution der chemischen Verschiebung, $T_m = 30$ ms. grün: Detektion auf H1', C1'-H1'-Evolution der chemischen Verschiebung, $T_m = 20$ ms.

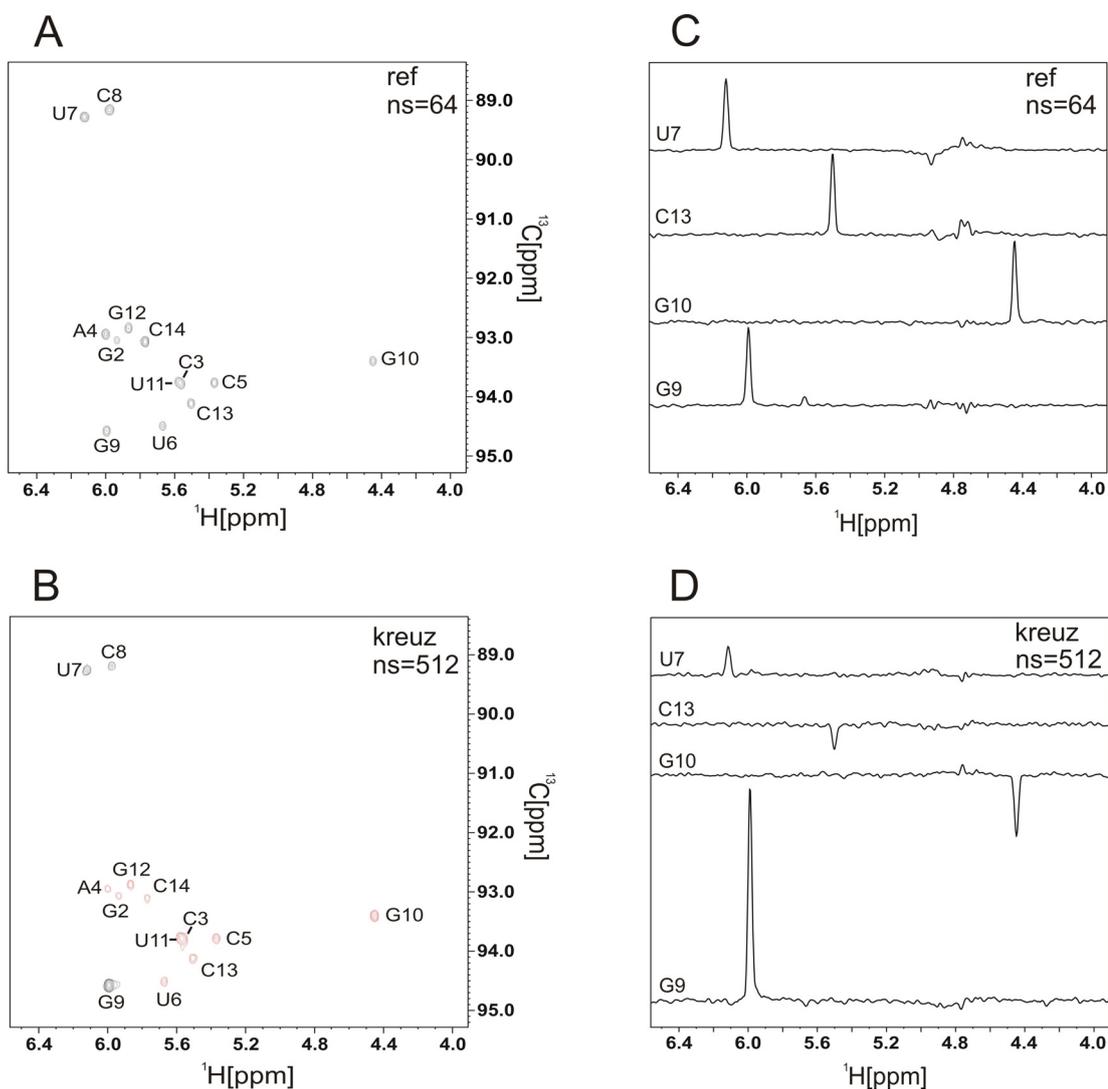


Abbildung 4.7 Spektren des quantitativen Γ -HCNCH-Experiments gemessen an einer cUUCGg-tetraloop-14mer-RNA-Probe. Das Referenzexperiment ist in **(A)**, das Kreuzexperiment in **(B)** dargestellt. Negative Signale sind in rot dargestellt. **(C, D)** Exemplarisch ausgesuchte 1D-Schnitte aus dem Referenz- (A) und dem Kreuzexperiment (B). Die Spektren wurden an einem 700-MHz-Spektrometer aufgenommen. Die Referenz- und Kreuzexperimente wurden mit jeweils 64 Inkrementen in der $C1'$ -Dimension aufgenommen. Das Referenzexperiment wurde mit 64 Einzelexperimenten pro Inkrement und das Kreuzexperiment mit 512 Einzelexperimenten pro Inkrement aufgenommen. T_M wurde auf 30 ms gesetzt. Die Experimentdauer betrug 2 h für das Referenz- und 16 h für das Kreuzexperiment.

Tabelle 4-3 Über das Γ -HCNCH bestimmte $\Gamma_{C_6H_6,C_1'H_1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C_8H_8,C_1'H_1'}^{DD,DD}$ -Raten sowie die dazugehörigen χ -Winkel im Vergleich zu der Referenzstruktur (Kristallstruktur), der MD-Simulation und den χ -Winkeln, die aus der Analyse der $\Gamma_{N_1,C_1'H_1'}^{CSA,DD}$ - und $\Gamma_{N_9,C_1'H_1'}^{CSA,DD}$ -Raten bzw. der $^3J(C,H)$ -Kopplungen extrahiert wurden.

| Nukleotid | $\Gamma_{C_6H_6,C_1'H_1'}^{DD,DD}$ $\Gamma_{C_8H_8,C_1'H_1'}^{DD,DD}$ [Hz] | $(S_{C_6H_6,C_1'H_1'}^{DD,DD})^2$ $(S_{C_8H_8,C_1'H_1'}^{DD,DD})^2$ | χ [°] $(\Gamma_{C_6H_6,C_1'H_1'}^{DD,DD})$ $(\Gamma_{C_8H_8,C_1'H_1'}^{DD,DD})$ | χ [°] (MD) | χ [°] $^3J(C,H)$ | χ [°] $(\Gamma_{N_1,C_1'H_1'}^{CSA,DD})$ $(\Gamma_{N_9,C_1'H_1'}^{CSA,DD})$ | χ [°] (Kristall) |
|-----------|--|--|--|--------------------|--------------------------|--|--------------------------|
| G1 | | | | | | | 194.8± 4.4 |
| G2 | -2.3 ± 0.4 | 0.959 | 192.4 ± 1.4 | 197.5 ± 7.8 | 192 ± 2 | 205 ± 1 | 194.8 ± 4.4 |
| C3 | -4.3 ± 0.1 | 0.926 | 193.7 ± 0.4 | 202.4 ± 7.4 | | 203 ± 1 | 198.4 ± 3.1 |
| A4 | -0.9 ± 0.1 | 0.968 | 196.3 ± 0.4 | 198.9 ± 7.7 | 198.5 ± 1.5 | 207 ± 1 | 198.2 ± 3.5 |
| C5 | -3.1 ± 0.3 | 0.920 | 198.8 ± 1.3 | 196.7 ± 7.3 | 191 ± 8 | 201 ± 1 | 197.85 |
| U6 | -2.5 ± 0.6 | 0.935 | 201.2 ± 2.5 | 204.4 ± 7.5 | 196.5 ± 4.5 | 221 | 211.03 |
| U7 | 1.5 ± 0.2 | 0.777 | 223.6 ± 2.1 | 237.2 ± 17.6 | 217.5 ± 9.5 | 209 ± 4 | 222.23 |
| C8 | 1.3 ± 0.2 | 0.880 | 221.6 ± 1.5 | 204.6 ± 10.2 | 210.5 ± 6.5 | 218 ± 2 | 202.64 |
| G9 | 17.0 ± 0.6 | 0.932 | 48.6 ± 5.2 | 27.3 ± 7.1 | 44 ± 4 | 57 ± 19 | 56.66 |
| (G9) | | | 69 ± 5.2 | | | | |
| G10 | -5.7 ± 0.4 | 0.943 | 180.0 ± 1.6 | 191.2 ± 7.7 | 215.5 ± 13.5 | 201 ± 2 | 198.24 |
| U11 | -5.0 ± 0.3 | 0.952 | 190.9 ± 1.4 | 199.1 ± 7.8 | | 195 | 198.2 ± 3.0 |
| G12 | -2.1 ± 0.4 | 0.952 | 193.0 ± 1.1 | 188.1 ± 7.9 | 192 ± 4 | 207 ± 1 | 194.8 ± 4.4 |
| C13 | -2.6 ± 0.2 | 0.938 | 201.4 ± 0.9 | 200.3 ± 7.2 | 189.5 ± 3.5 | 202 ± 1 | 198.4 ± 3.1 |
| C14 | -0.9 ± 0.3 | 0.867 | 208.8 ± 1.3 | 208.9 ± 11.7 | 198 ± 5 | 211 ± 1 | 198.4 ± 4.4 |

Die Referenzwinkel der Nukleotide C5-G10 wurden aus der Kristallstruktur extrahiert (pdb-ID 1F7Y) [196], die weiteren Referenzwinkel stellen Mittelwerte für A-Form-RNA dar, die bereits vorher bestimmt wurden [227]. Die $\Gamma_{C_6H_6,C_1'H_1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C_8H_8,C_1'H_1'}^{DD,DD}$ -Raten wurden mehrere Male unter Verwendung beider Pulssequenzen (Abbildung 4.4, Abbildung 4.5) sowie verschiedener Mischzeiten T_M (20, 30 ms) bestimmt. Die kreuzkorrelierten Ordnungsparameter $(^{cross}S_{C_6H_6,C_1'H_1'}^{DD,DD})^2$ und $(^{cross}S_{C_8H_8,C_1'H_1'}^{DD,DD})^2$ wurden unter Verwendung der autokorrelierten Ordnungsparameter [168] und der Annahme unkorrelierter schneller Bewegung der involvierten Bindungsvektoren zueinander entsprechend der Produkte $(^{auto}S_{C_6H_6,C_6H_6}^{DD,DD}) * (^{auto}S_{C_1'H_1',C_1'H_1'}^{DD,DD})$ bzw. $(^{auto}S_{C_8H_8,C_8H_8}^{DD,DD}) * (^{auto}S_{C_1'H_1',C_1'H_1'}^{DD,DD})$ berechnet [251]. $(^{cross}S_{C_6H_6,C_1'H_1'}^{DD,DD})^2$ und $(^{cross}S_{C_8H_8,C_1'H_1'}^{DD,DD})^2$ wurden zur Berechnung der χ -Winkel herangezogen. Für die meisten Raten existieren mehrere Möglichkeiten für χ , von denen jedoch nur jeweils eine Möglichkeit in der Nähe der Referenzwinkel liegt. Es wurde deshalb jeweils der χ -Winkel angegeben, der den jeweiligen χ -Winkelreferenzen am nächsten kommt [196, 227]. Für das Nukleotid G9 liegen zwei Lösungen in etwa gleich nahe an den Referenzwerten, so dass in diesem Fall beide Werte als mögliche Lösung angegeben wurden.

Die experimentell bestimmten Relaxationsraten wurden über die theoretisch hergeleiteten $\Gamma_{C_6H_6,C_1'H_1'}^{DD,DD}(\chi)$ - und $\Gamma_{C_8H_8,C_1'H_1'}^{DD,DD}(\chi)$ -Beziehungen (Gleichung 4-6, Gleichung 4-7, Tabelle 4-2) in χ -Winkel übersetzt. Die Korrelation der χ -Winkel aus der Kristallstruktur [196] und den $\Gamma_{C_6H_6,C_1'H_1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C_8H_8,C_1'H_1'}^{DD,DD}$ -Raten (Tabelle 4-3, Abbildung 4.8A) ergibt einen RMSD von 9.2° für alle Nukleotide. Der Vergleich der χ -Winkel aus der Analyse der Relaxationsraten aus dem Γ -HCNCH mit den χ -

Winkeln aus dem Γ -HCN [227] ergibt einen RMSD von 10.1° (Tabelle 4-3, Abbildung 4.8B). Es zeigt sich, dass die χ -Winkel, die aus den $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten bestimmt wurden, systematisch kleiner sind als die χ -Winkel, die über die Analyse der $\Gamma_{N1,C1'H1'}^{CSA,DD}$ - und $\Gamma_{N9,C1'H1'}^{CSA,DD}$ -Raten ermittelt wurden. Betrachtet man hingegen nur die Cytidine, so befinden sich die beiden Methoden mit einem RMSD von lediglich 4.7° in sehr guter Übereinstimmung zueinander. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass der CSA-Tensor für Cytidine [243] die Situation basengepaarter Nukleotide in Lösung genauer beschreibt als die CSA-Tensoren der übrigen Nukleotide [227, 262]. Der Vergleich der χ -Winkel aus den $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten mit den χ -Winkeln aus der Analyse der $^3J(C,H)$ -Kopplungen liefert einen RMSD von 12.8° . Für G10 ergeben sich deutlich unterschiedliche χ -Winkel (Tabelle 4-3). Wenn man G10 aus der RMSD-Berechnung herausnimmt, ergibt sich ein RMSD von 7.3° . Die Korrelation zwischen den Winkeln der MD-Simulation und den χ -Winkeln aus der Analyse der $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten ergibt einen RMSD von 9.9° .

Die Resultate der neuen Methode befinden sich in guter Übereinstimmung mit den χ -Winkeln aus der Referenzstruktur [196], der Analyse der $\Gamma_{N1,C1'H1'}^{CSA,DD}$ - und $\Gamma_{N9,C1'H1'}^{CSA,DD}$ -Raten [227], der Analyse der $^3J(C,H)$ -Kopplungen und den χ -Winkeln aus der MD-Trajektorie. Die hier ermittelten χ -Winkel dienten außerdem als Eingabedaten für die Bestimmung der Lösungsstruktur der cUUCGg-tetraloop-14mer-RNA. Die finale hochaufgelöste Lösungsstruktur dieser RNA (pdb-ID 2koc) [195] kann deshalb zwar nicht zur Kreuzvalidierung der hier ermittelten Daten verwendet werden, es bleibt jedoch festzuhalten, dass die NMR-Struktur (pdb-ID 2koc) konsistent mit den hier ermittelten χ -Winkeln ist. Folglich sind die hier ermittelten χ -Winkel mit den anderen Strukturparametern, die als Eingabedaten für die Strukturrechnung dienten, konsistent.

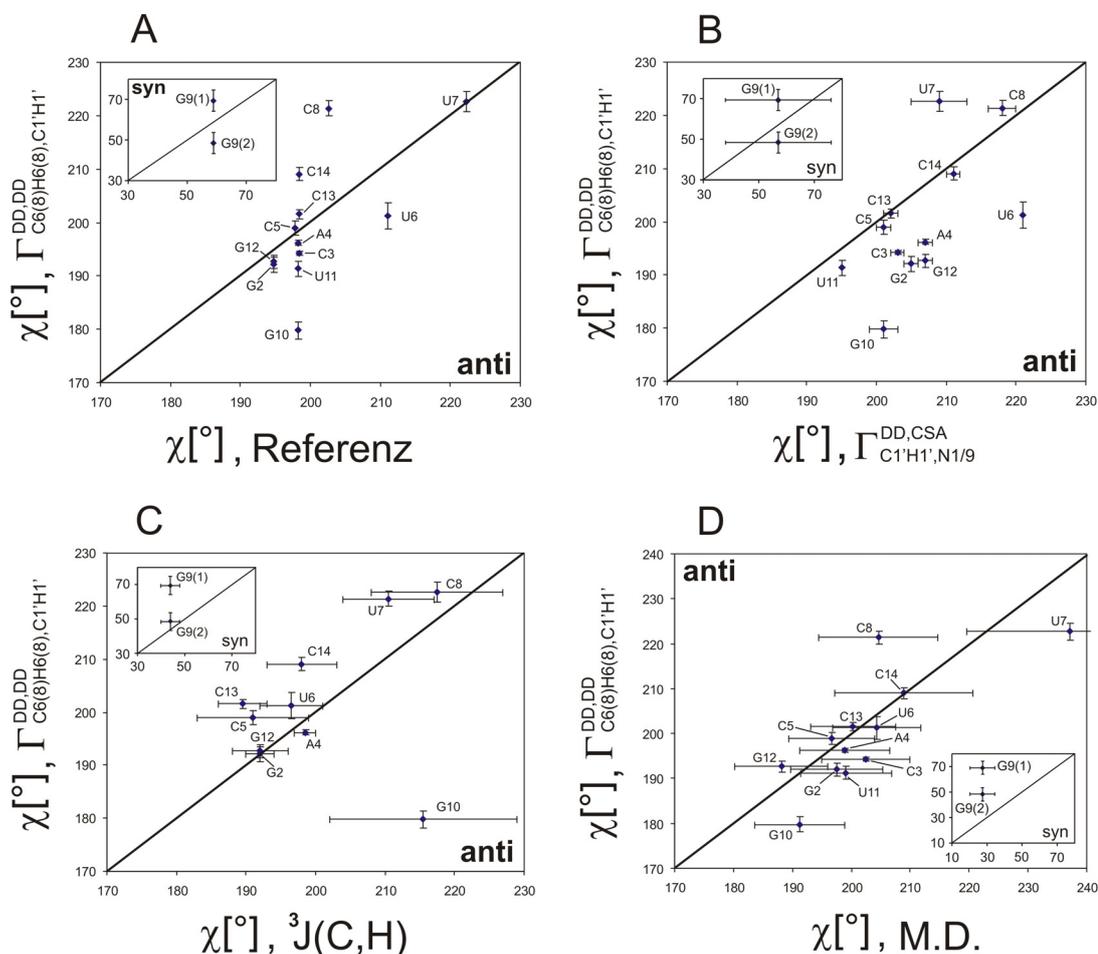


Abbildung 4.8 χ -Winkel extrahiert aus den $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten im Vergleich zu den χ -Winkeln (A) aus der Referenz-Kristallstruktur [227] (B) extrahiert aus den $\Gamma_{N9,C1'H1'}^{CSA,DD}$ - und $\Gamma_{N1,C1'H1'}^{CSA,DD}$ -Raten [227] (C) extrahiert aus $^3J(C,H)$ -Kopplungen [227] (D) aus der Molekulardynamik-Trajektorie. Es existiert lediglich eine Möglichkeit für den χ -Winkel, die nahe an den Referenzwerten für Nukleotide in der anti-Konformation liegt [196, 227]. In Gegensatz dazu existieren zwei mögliche Werte für den χ -Winkel des Nukleotids G9, das sich in der syn-Konformation befindet.

Die neue Methode zur χ -Winkelbestimmung hat zudem folgende Vorteile über die bereits vorhandene χ -Winkelbestimmung mittels $\Gamma_{N1,C1'H1'}^{CSA,DD}$ ($\Gamma_{N9,C1'H1'}^{CSA,DD}$)-HCN. Die Sensitivität des Experiments ist größer, da die zu messenden $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten wesentlich größer sind als die $\Gamma_{N1,C1'H1'}^{CSA,DD}$ - und $\Gamma_{N9,C1'H1'}^{CSA,DD}$ -Raten (Abbildung 4.3). Außerdem können Nukleotide, die die syn-Konformation einnehmen, eindeutig identifiziert werden. Der Hauptvorteil des neuen Experiments

ist darin zu sehen, dass es CSA-unabhängig ist und daher mögliche Einflüsse anderer Parameter wie z.B. die Konformation des χ -Winkels selbst auf den N1(9)-CSA-Tensor keine Rolle bei der χ -Winkelbestimmung spielen. Die Methode ist einfach zu implementieren, da sie unabhängig von der B_0 -Feldstärke ist. Zusätzlich dazu ist die neue Methode auch auf DNA-Moleküle anwendbar.

4.1.4.2 SLD-30mer-RNA

Um die Anwendbarkeit des quantitativen Γ -HCNCH-Experiments für größere RNAs zu demonstrieren, wurde es an einer SLD-30mer-RNA-Probe (Abbildung 4.1B) angewendet. Es existiert eine hochaufgelöste Lösungsstruktur dieser RNA, die mittels NMR-Spektroskopie bestimmt wurde (pdb-ID 1RFR) [245] und die Resonanzzuordnung der C1'- und H1'-Kerne ist bekannt. Die neue Methode wurde an einer Adenosin,Uridin- ^{13}C , ^{15}N -markierten Probe der SLD-30mer-RNA getestet. Die Spektren des quantitativen Γ -HCNCH Kreuz- und Referenzexperiments sind in Abbildung 4.9 dargestellt.

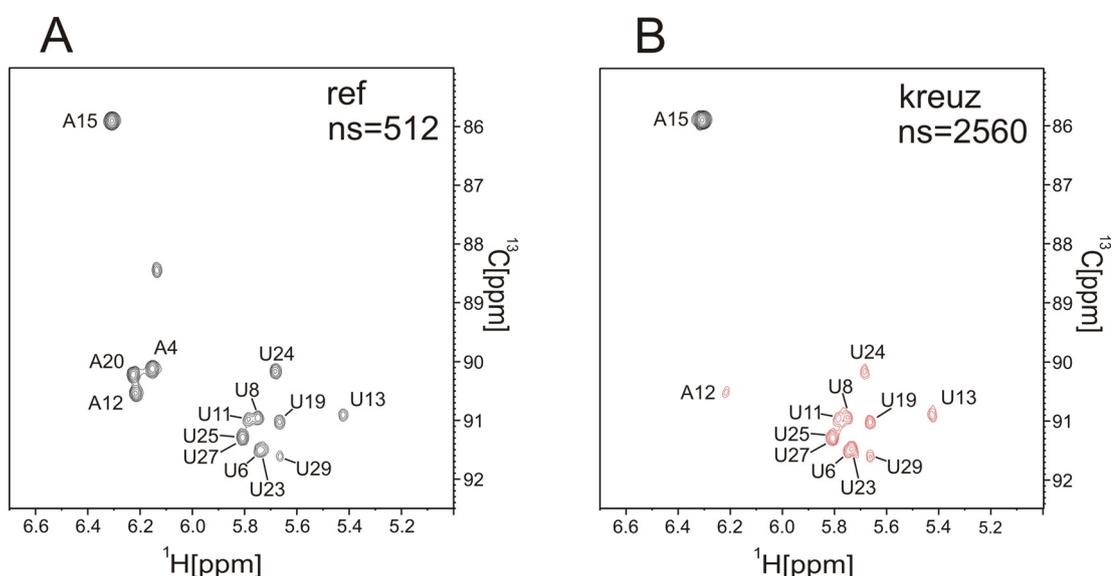


Abbildung 4.9 Spektren des Γ -HCNCH-Experiments gemessen an einer SLD-30mer-RNA-Probe. Das Referenzexperiment ist in (A), das Kreuzexperiment in (B) dargestellt. Negative Signale sind in rot dargestellt. Die Spektren wurden an einem 700-MHz-Spektrometer aufgenommen. Die Referenz- und Kreuzspektren wurden mit 44 Inkrementen in der C1'-Dimension durchgeführt. Das Referenzexperiment wurde mit 512 Einzelexperimenten pro Inkrement und das Kreuzexperiment mit

2560 Einzelexperimenten pro Inkrement durchgeführt. T_M wurde auf 15 ms gesetzt. Die Dauer der Experimente betrug zusammengenommen 69 h.

Die $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten wurden aus den Signalintensitäten entsprechend Gleichung 4-18 und Gleichung 4-19 berechnet. In Abbildung 4.11 werden die gemessenen $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten mit aus den Mittelwerten der χ -Winkel des NMR-Ensembles (pdb-ID 1RFR) berechneten Raten verglichen. Die schwarze, blaue und orangene Kurve stellt die simulierten $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}(\chi)$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}(\chi)$ -Funktionen unter Annahme von $\tau_c=4.76$ ns [168] (Gleichung 4-6 bzw. Gleichung 4-7, Tabelle 4-2) dar.

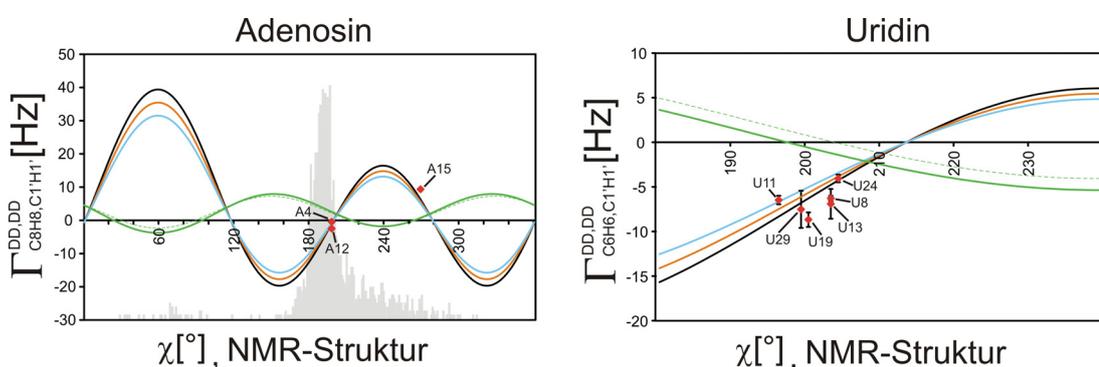


Abbildung 4.10 $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}(\chi)$ für Adenosine und $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}(\chi)$ für Uridine unter der Annahme isotroper Rotationsdiffusion. Die Kurven sind jeweils für $(S_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD})^2$ - und $(S_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD})^2$ -Werte von 0.8 (hellblau), 0.9 (orange) und 1.0 (schwarz) dargestellt. Für die SLD-30mer-RNA bei 310 K wurde τ_c auf 4.76 ns [168] gesetzt. Zusätzlich sind die experimentell bestimmten $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten der SLD-30mer-RNA gegen die Referenz χ -Winkel (rote Quadrate) der NMR-Struktur [245] aufgetragen. $\Gamma_{N9,C1'H1'}^{CSA,DD}$ für Purine und $\Gamma_{N1,C1'H1'}^{CSA,DD}$ für Pyrimidine sind als grüne durchgezogene (Guanin, Cytosin) bzw. gestrichelte (Adenin, Uracil) Linien dargestellt. Die grauen Säulen stellen die χ -Winkelverteilung in der RNA-Fraktion der großen ribosomalen Untereinheit (pdb-ID 1FFK) [250] dar.

Da die 30mer-RNA eine längliche Struktur besitzt, wurde der Einfluss anisotroper Rotationsdiffusion auf die χ -Winkelbestimmung untersucht. Für diesen Zweck wurden Größe und Orientierung des Rotationsdiffusionstensors über das Programm HYDRONMR7 [201] bestimmt. Als Grundlage hierfür diente die NMR-Struktur (pdb-ID 1RFR). Anschließend wurden aus der NMR-Struktur die relativen Orientierungen der Bindungsvektoren $\overline{C6H6}(\overline{C8H8})$ und $\overline{C1'H1'}$ zum axialsymmetrischen Rotationsdiffusionstensor bestimmt. Abbildung 4.11 zeigt die Abhängigkeit der $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten von der Orientierung der Bindungsvektoren relativ zum Rotationsdiffusionstensor für den Fall axialsymmetrischer Rotationsdiffusion [252, 253]. Abbildung 4.11A veranschaulicht die verwendete Nomenklatur. Eine ausführliche mathematische Beschreibung findet sich in Abschnitt 4.1.3.1. Abbildung 4.11B, C und D zeigen den Effekt der Anisotropie auf die $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten bei einem gegebenen Projektionswinkel $\theta_{C6H6,C1'H1'}$ ($\theta_{C8H8,C1'H1'}$) zwischen den Bindungsvektoren $\overline{C6H6}(\overline{C8H8})$ und $\overline{C1'H1'}$. Die aus der NMR-Struktur extrahierten Winkel für θ_V und θ_W (Abbildung 4.11A) zeigen, dass die meisten θ_W -Winkel zwischen 70° und 90° liegen (blaue Quadrate in Abbildung 4.11B, C, D). Da der Rotationsdiffusionstensor annähernd parallel zur Helixachse der RNA ausgerichtet ist, ist klar, weshalb fast alle $\overline{C6H6}(\overline{C8H8})$ -Bindungsvektoren annähernd senkrecht zum Diffusionstensor ausgerichtet sind. Ein χ -Winkel von ca. 200° führt zu einem θ_V -Winkel zwischen 130° und 160° für die meisten Nukleotide. Eine Ausnahme stellt Nukleotid A15 dar (Abbildung 4.11C), das innerhalb des uCACGg-*tetraloops* der SLD-RNA lokalisiert ist. Abbildung 4.11 zeigt, dass der Effekt der Anisotropie auf die $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten für einige Kombinationen von θ_V und θ_W recht groß sein kann. Für die beobachteten θ_V - und θ_W -Winkelkombinationen in der SLD-30mer-RNA ist dies jedoch nicht der Fall.

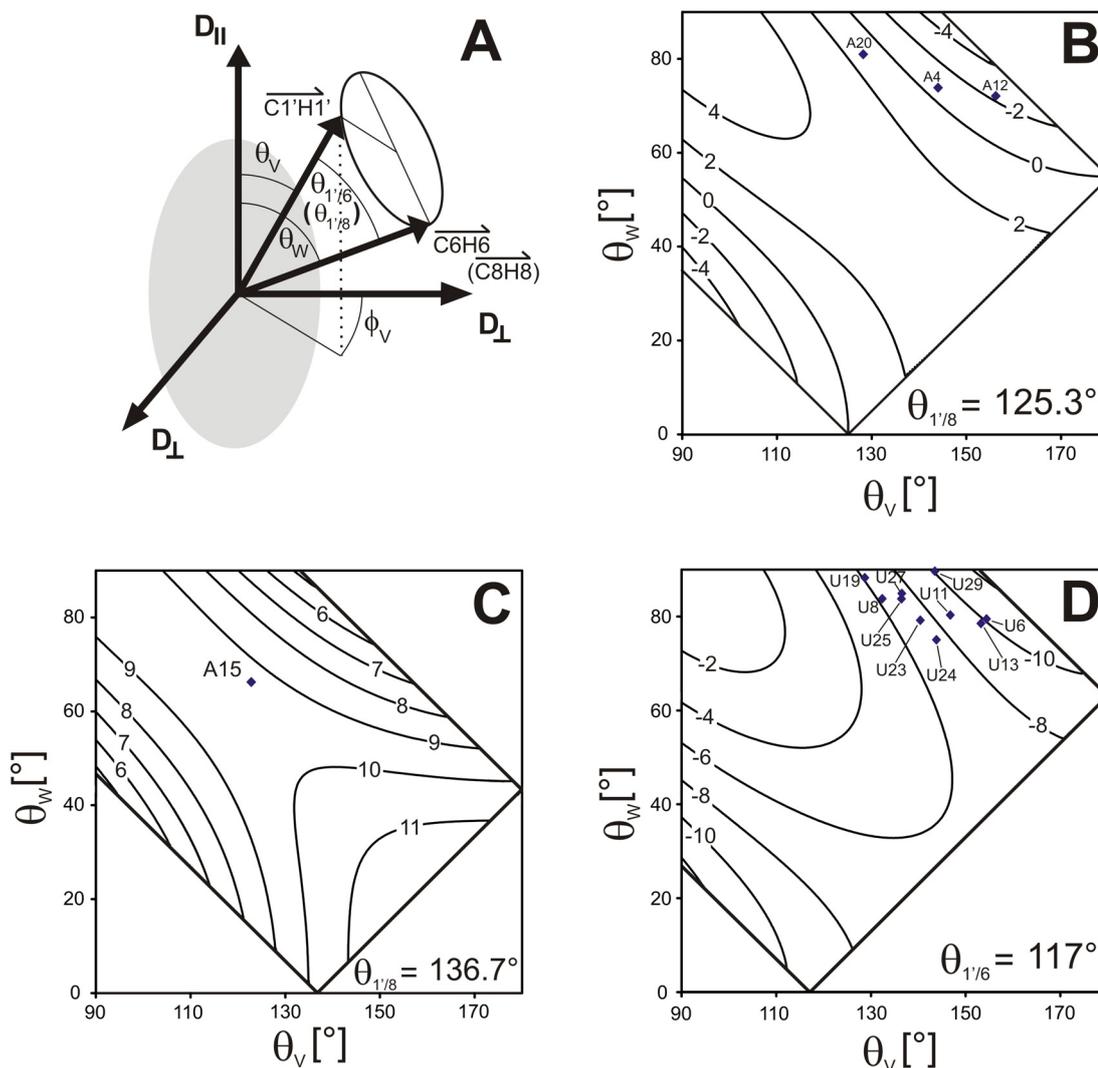


Abbildung 4.11 Abhängigkeit der $\Gamma_{C8H8, C1'H1'}^{DD, DD}$ - und $\Gamma_{C6H6, C1'H1'}^{DD, DD}$ -Raten von der relativen Orientierung des axialsymmetrischen Rotationsdiffusionstensors mit einer Anisotropie von $D_{\text{aniso}}=2.05$ unter der Annahme einer globalen Rotationskorrelationszeit τ_c von 4.76 ns für die SLD-30mer-RNA. **(A)** Schematische Darstellung des Rotationsdiffusionstensors mit Polarkoordinaten nomenklatur in Relation zu den für das Γ -HCNCH relevanten Bindungsvektoren $\overline{C6H6}$ ($\overline{C8H8}$) und $\overline{C1'H1'}$. **(B)** Abhängigkeit der $\Gamma_{C8H8, C1'H1'}^{DD, DD}$ -Raten von den Polarwinkeln θ_V und θ_W für einen Projektionswinkel $\theta_{1/8} = 125.3^\circ$, welcher den Mittelwert von A20($\theta_{1/8} = 125.3^\circ$), A4($\theta_{1/8} = 125.5^\circ$) und A12($\theta_{1/8} = 124.9^\circ$) darstellt. **(C)** Abhängigkeit der $\Gamma_{C8H8, C1'H1'}^{DD, DD}$ -Raten von den Polarwinkeln θ_V und θ_W für einen Projektionswinkel $\theta_{1/8} = 136.7^\circ$ (A15). **(D)** Abhängigkeit der $\Gamma_{C6H6, C1'H1'}^{DD, DD}$ -Raten von den Polarwinkeln θ_V und θ_W für einen Projektionswinkel $\theta_{1/6} = 117.0^\circ$ (Mittelwert für alle Uridine). In **(B, C und D)** sind die Mittelwerte für θ_V und θ_W für die Adenosine und Uridine aus dem NMR-Strukturensemble der SLD-30mer-RNA dargestellt (blaue Quadrate). Für die simulierten 2D-Kurven in **(B und D)** wurden die Mittelwerte für $\theta_{1/6}$ und $\theta_{1/8}$ gewählt, um die Ergebnisse in einer kompakten und

anschaulichen Form darzustellen. Im Prinzip besitzt jedes Nukleotid seine eigene 2D-Kurve, die von $\theta_{1/6}$ (Pyrimidine) bzw. $\theta_{1/8}$ (Purine) abhängig ist.

Die experimentell bestimmten Relaxationsraten der SLD-30mer-RNA sind in Tabelle 4-4 wiedergegeben. Sie wurden über die theoretisch hergeleiteten $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}(\chi)$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}(\chi)$ -Beziehungen (Gleichung 4-6, Gleichung 4-7, Tabelle 4-2) in χ -Winkel übersetzt. Die sich ergebenden χ -Winkelwerte unter Annahme von isotroper bzw. anisotroper Rotationsdiffusion befinden sich ebenfalls in Tabelle 4-4.

Tabelle 4-4 Über das Γ -HCNCH bestimmte $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten sowie die dazugehörigen χ -Winkel im Vergleich zur Referenzstruktur (NMR-Struktur, pdb-ID 1RFR) [245].

| Nukleotid | $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ | $(S_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD})^2$ | χ [°] | χ [°] | χ [°] |
|-----------|--|-------------------------------|---|---|----------------|
| | $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ [Hz] | $(S_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD})^2$ | $(\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD})$ $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ (anisotrop) | $(\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD})$ $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ (isotrop) | (NMR Struktur) |
| A4 | -0.4 ± 0.2 | 0.955 | 199.4 ± 0.3 | 198.4 ± 0.3 | 197.6 ± 6.3 |
| U8 | -6.3 ± 0.3 | 0.917 | 197.1 ± 0.7 | 198.6 ± 0.6 | 202.8 ± 1.4 |
| U11 | -6.5 ± 0.5 | 0.930 | 202.9 ± 1.1 | 198.4 ± 1.0 | 196.3 ± 1.3 |
| A12 | -2.5 ± 0.9 | 0.933 | 198.6 ± 1.5 | 195.2 ± 1.4 | 198.5 ± 0.6 |
| U13 | -6.9 ± 1.7 | 0.939 | 204.0 ± 3.9 | 197.7 ± 3.5 | 203.4 ± 0.9 |
| A15 | 9.3 ± 0.5 | 0.662 | 259.7 ± 1.6 | 253.5 ± 2.0 | 269.3 ± 18 |
| U19 | 9.3 ± 0.8 | 0.948 | 191.2 ± 2.1 | 194.2 ± 1.7 | 201.5 ± 2 |
| U24 | -4.1 ± 0.4 | 0.894 | 204.5 ± 1.0 | 203.2 ± 1.0 | 204.4 ± 1.1 |
| U29 | -7.5 ± 2.1 | 0.934 | 204.2 ± 5.6 | 196.3 ± 4.4 | 198.9 ± 0.8 |

$(^{cross}S_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD})^2$ und $(^{cross}S_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD})^2$ wurden aus den autokorrelierten Ordnungsparametern $(^{auto}S_{C6H6,C6H6}^{DD,DD})^2$ und $(^{auto}S_{C1'H1',C1'H1'}^{DD,DD})^2$ [168] entsprechend den Gleichungen $(^{cross}S_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD})^2 = (^{auto}S_{C6H6,C6H6}^{DD,DD}) * (^{auto}S_{C1'H1',C1'H1'}^{DD,DD})$ bzw. $(^{cross}S_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD})^2 = (^{auto}S_{C6H6,C6H6}^{DD,DD}) * (^{auto}S_{C1'H1',C1'H1'}^{DD,DD})$ abgeleitet und für die χ -Winkelberechnung verwendet. Die χ -Winkel wurden unter Annahme isotroper Rotationsdiffusion bzw. axialsymmetrisch anisotroper Rotationsdiffusion bestimmt. Grundlage zur Berechnung des anisotropen Rotationsdiffusionstensors war die NMR-Struktur (pdb-ID 1RFR). Die $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten wurden mehrere Male unter Verwendung verschiedener Mischzeiten T_M (20, 30 ms) bestimmt.

Abbildung 4.12 zeigt den Effekt der anisotropen Rotationsdiffusion auf die ermittelten χ -Winkel. Die Abbildung zeigt, dass die anisotrope Rotationsdiffusion

auf die Nukleotide U29 (8°) und A15 (6°) den größten Effekt hat, der Unterschied zwischen isotroper und anisotroper Analyse jedoch immer $<9^\circ$ ist. Tatsächlich ist der RMSD für alle Nukleotide bei isotroper Auswertung 6.9° . Folglich erhält man sogar für Moleküle mit großer Rotationsdiffusionsanisotropie ($D_{\text{aniso}} \approx 2$) brauchbare Ergebnisse, wenn man für die χ -Winkelbestimmung isotrope Rotationsdiffusion annimmt.

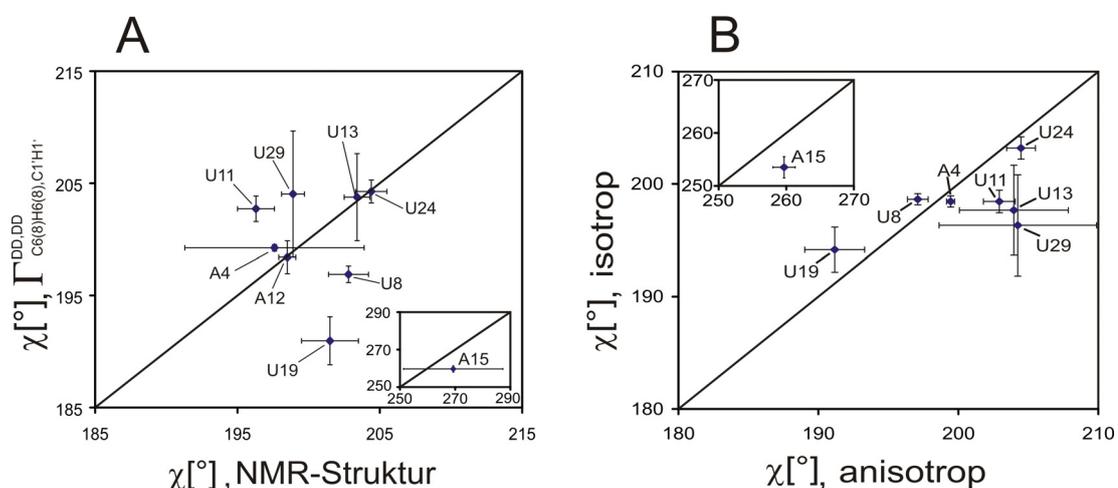


Abbildung 4.12 (A) χ -Winkel extrahiert aus den $\Gamma_{C8H8, C1'H1}^{DD, DD}$ - und $\Gamma_{C6H6, C1'H1}^{DD, DD}$ -Raten im Vergleich zu den χ -Winkeln der NMR-Struktur [245]. **(B)** Vergleich der χ -Winkel der SLD-30mer-RNA extrahiert aus den $\Gamma_{C8H8, C1'H1}^{DD, DD}$ - und $\Gamma_{C6H6, C1'H1}^{DD, DD}$ -Raten unter Annahme von isotroper bzw. axialsymmetrischer anisotroper Rotationsdiffusion mit einer Anisotropie D_{aniso} von 2.05.

Für die Bestimmung einer hochaufgelösten Struktur muss die exakte Orientierung des Rotationsanisotropietensors bekannt sein. Allerdings ist die Vorhersage eines axialsymmetrischen Rotationsdiffusionstensors schon mit einer niedrig aufgelösten Struktur relativ präzise. Deshalb ist ein iterativer Ansatz denkbar, in dem die Daten eines Moleküls mit länglicher Struktur erst isotrop analysiert werden und die resultierende Struktur benutzt wird, um einen Rotationsdiffusionstensor zu bestimmen. Anschließend kann dieser Tensor dazu verwendet werden, die Effekte anisotroper Rotationsdiffusion bei der Strukturrechnung zu berücksichtigen. Diese

iterative Prozedur zur Verbesserung der Struktur kann so oft wiederholt werden, bis die Struktur konvergiert ist.

Abbildung 4.12A bietet einen Vergleich der χ -Winkel aus der NMR-Struktur mit den χ -Winkeln aus der Analyse der $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Raten unter der Annahme eines axialsymmetrischen Rotationsdiffusionstensors mit einer Anisotropie $D_{\text{aniso}}=2.05$. Die χ -Winkel aus der Relaxationsratenanalyse stimmen mit den χ -Winkeln der Referenzstruktur mit einem RMSD von 5.8° bemerkenswert gut überein. Dies beweist, dass die neue Methode zur χ -Winkelbestimmung auch für größere RNAs mit anisotroper Rotationsdiffusion anwendbar ist. Die genauen Werte sind in Tabelle 4-4 angegeben.

Tatsächlich ist der RMSD der isotropen Auswertung mit 6.9° nur geringfügig schlechter als der RMSD der anisotropen Auswertung mit 5.8° . Es könnte sein, dass die Genauigkeit der NMR-Struktur der limitierende Faktor für den RMSD-Wert der anisotropen Auswertung ist. Allerdings ist ein RMSD-Wert von 5.8° erstaunlich gering. Folglich stimmen Referenzstruktur und Datenauswertung besonders gut überein, was zum einen für die Genauigkeit der neuen Methode, aber auch für die Richtigkeit der NMR-Struktur spricht.

Letztlich sollte die Verwendung von experimentell bestimmten χ -Winkeldaten die Genauigkeit der Strukturbestimmung von RNA-Molekülen mittels NMR deutlich verbessern, da z.B. eine Analyse der großen ribosomalen Untereinheit (pdb-ID 1FFK) zeigt, dass die χ -Winkel über einen Bereich von 50° bei Purinen und 30° bei Pyrimidinen verteilt sind (siehe Abschnitt 4.1.1). Deshalb ist eine Festsetzung der χ -Winkel auf A-Form-Konformation nicht zulässig und der χ -Winkel muss experimentell bestimmt werden. Da NOEs in der Regel nicht ausreichen, um den χ -Winkel mit der gewünschten Genauigkeit zu bestimmen, sind zusätzliche Messdaten notwendig. Die Analyse der kreuzkorrelierten $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Relaxationsraten bietet eine solche Möglichkeit zur genauen und verlässlichen Bestimmung der χ -Winkel in RNA-Molekülen.

4.1.5 Fazit

Es wurde eine neue Methode zur Bestimmung des glykosidischen Torsionswinkels χ in RNA-Oligonukleotiden entwickelt, die auf der Analyse CH,CH-dipolarer kreuzkorrelierter $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ -Relaxationsraten basiert. Die Funktionsfähigkeit der Methode wurde an der cUUCGg-*tetra*loop-14mer-RNA und der SLD-30mer-RNA demonstriert. Die neue Methode erlaubt eine eindeutige Unterscheidung von syn- und anti-Konformation und ist speziell für Nukleotide in der anti-Konformation äußerst präzise. Die hergeleiteten $\Gamma^{DD,DD}(\chi)$ -Parametrisierungen sind direkt abhängig von der Nukleotidgeometrie und unabhängig von der B_0 -Feldstärke. Deshalb ist der Effekt auch bei geringerer B_0 -Feldstärke messbar. Da der gemessene CH,CH-dipolare Effekt der Kreuzkorrelation mit größer werdender Rotationskorrelationszeit τ_c ebenfalls größer wird, eignet sich die neue Methode, wie an der SLD-30mer-RNA demonstriert, auch zur χ -Winkelbestimmung größerer RNA-Oligonukleotide.

4.2 Das quantitative 3D- Γ -HCCCH-Experiment: Bestimmung von Pseudorotationsphase P sowie Amplitude ν^{\max} in ^{13}C -markierten RNA-Oligonukleotiden über die Analyse CH-dipolarer kreuzkorrelierter Relaxationsraten

4.2.1 Einleitung

Zur vollständigen Strukturbestimmung eines RNA-Moleküls mit Hilfe der NMR-Spektroskopie ist unter anderem die Bestimmung der Konformation der Ribosereste erforderlich. Voraussetzung hierfür ist die Resonanzzuordnung der ^1H - und ^{13}C -Kerne der Spinsysteme der Ribosereste. Durch die Herstellung ^{13}C -markierter RNA ist die Zuordnung der Ribosereste mittelgroßer RNAs mit den heutigen NMR-spektroskopischen Methoden durchführbar. Es gibt eine Vielzahl von NMR-Experimenten, die der Zuordnung der Ribosespinsysteme dienen. In Abschnitt 2.2.1.2 dieser Arbeit ist eine mögliche Zuordnungsstrategie im Detail beschrieben.

Ist die ^1H , ^{13}C -Resonanzzuordnung der Ribosesysteme einer RNA vorhanden, kann mit der Konformationsbestimmung der Ribosereste begonnen werden. NOE-basierte Ansätze haben hierbei zwei generelle Probleme. Zum Einen ist die Protonendichte in RNA niedriger, so dass trotz vollständiger Resonanzzuordnung relativ wenige Abstandsinformationen pro Riboserest gesammelt werden können. Zum Anderen ist die Dispersion der Zuckerresonanzen, besonders in kanonischen Bereichen der RNA, sehr gering, so dass die eindeutige Zuordnung der NOEs, welche eine Voraussetzung für den Erhalt von Abstandsinformationen ist, oft nicht möglich ist.

Die möglichen Konformationen der Ribose können mit Hilfe des Pseudorotationszyklus beschrieben werden (Abbildung 4.13a). Hierbei wird die Pseudorotationsphase P sowie die maximale Amplitude ν^{\max} mit den fünf Torsionswinkeln der Ribose ν_0 ($\text{C4}'\text{-O4}'\text{-C1}'\text{-C2}'$), ν_1 ($\text{O4}'\text{-C1}'\text{-C2}'\text{-C3}'$), ν_2 ($\text{C1}'\text{-C2}'\text{-C3}'\text{-C4}'$), ν_3 ($\text{C2}'\text{-C3}'\text{-O4}'\text{-C1}'$) und ν_4 ($\text{C3}'\text{-C4}'\text{-O4}'\text{-C1}'$) (siehe Abbildung 4.14B) entsprechend Gleichung 4-22 und Gleichung 4-23 verknüpft.

Gleichung 4-22

$$\tan P = \frac{(\nu_4 + \nu_1) - (\nu_3 + \nu_0)}{2\nu_2 (\sin 36^\circ + \sin 72^\circ)}$$

Gleichung 4-23

$$\nu^{\max} = \frac{\nu_2}{\cos P}$$

Auf diese Weise kann den jeweiligen Zuckerkonformationen (z.B. C3'-endo) eine Pseudorotationsphase zugeordnet werden (Abbildung 4.13A). Die in RNA am häufigsten vorkommenden Konformationen der Ribose sind die kanonische C3'-endo Konformation (A-Form-Helix; $P=0-36^\circ$) sowie die C2'-endo Konformation (B-Form Helix; $P=144-180^\circ$). Diese beiden Ribosekonformationen sind in Abbildung 4.13B graphisch veranschaulicht.

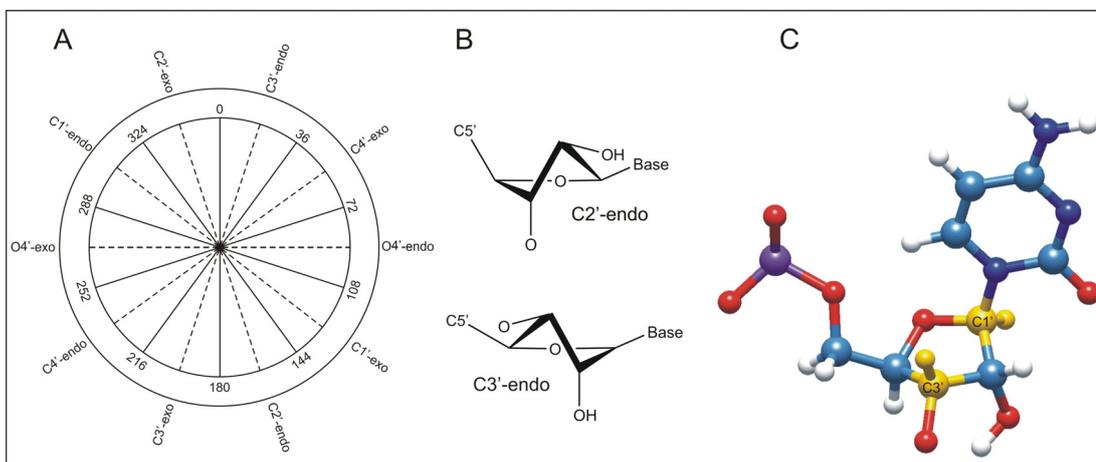


Abbildung 4.13 (A) Darstellung, die den Pseudorotationszyklus der Ribose mit den jeweiligen Konformationen in Beziehung setzt. (B) Am häufigsten auftretende Konformationen der Ribosereste in RNA-Molekülen, C2'-endo Konformation (oben) und C3'-endo Konformation (unten). In A-Form-helikaler RNA nimmt der Zucker in der Regel die C3'-endo Konformation ein. (C) 3D-Struktur eines Cytidin-Nukleotids mit der Ribose in C3'-endo Konformation. Die $\overline{C1'H1'}$ - und $\overline{C3'H3'}$ -Bindungsvektoren, deren relative Orientierung maßgebend für die Größe der $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ -Rate ist, sind in gelb dargestellt.

4.2.2 Material und Methoden

Die Messungen wurden an einer voll ^{13}C , ^{15}N -markierten cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA-Probe durchgeführt. Sequenz und Sekundärstruktur sind in Abbildung 4.1A dargestellt. Die benötigte Resonanzzuordnung wurden von Fürtig et al. [126] übernommen. Die RNA wurde bei Silantes (München, Deutschland) gekauft. Die NMR-Probe hatte folgende Zusammensetzung: 0.7 mM RNA, 20 mM $\text{K}_x\text{H}_y\text{PO}_4$, 50 mM KCl pH 6.4, 0.4 mM EDTA und 99.99% D_2O . Die NMR-Messungen wurden an einem Bruker 700-MHz-Spektrometer, ausgestattet mit einem 5 mM $^1\text{H}\{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$ -z-Gradienten Kryoprobekopf, bei einer Temperatur von 298 K durchgeführt. Die aufgenommenen Daten wurden mit dem Programm TOPSPIN 2.1 (Bruker Biospin) prozessiert und analysiert. Die Signalintensitäten wurden entsprechend Gleichung 4-33 für die quantitative Auswertung der $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ -Raten verwendet.

4.2.3 Theorie

4.2.3.1 Bestimmung der Ribosekonformation in RNA-Oligonukleotiden über bereits existierende Methoden

4.2.3.1.1 Analyse skalarer ^3J -Kopplungen

Informationen über Torsionswinkel und damit die Pseudorotationsphase können über die Analyse von skalaren homo- bzw. heteronuklearen Kopplungen des Typs $^3\text{J}(\text{H},\text{H})$ und $^3\text{J}(\text{H},\text{C})$ gewonnen werden. Eine Übersicht der NMR-Experimente, mit denen diese Kopplungen bestimmt werden können, sowie die dazugehörigen Karplus-Parametrisierungen finden sich in [18]. Mit Hilfe der $^3\text{J}(\text{H}1',\text{H}2')$ -, $^3\text{J}(\text{H}2',\text{H}3')$ - und $^3\text{J}(\text{H}3',\text{H}4')$ -Parametrisierungen [263] kann durch Bestimmung der dazugehörigen homonuklearen Kopplungen die Pseudorotationsphase P des Zuckers bestimmt werden. Die Bestimmung dieser Kopplungen erfolgt in der Regel über E.COSY-basierte NMR-Experimente wie z.B. das HCCH-E.COSY-Experiment [224, 264] oder das *Forward-Directed*-HCC-TOCSY-CCH-E.COSY-Experiment [265-267].

4.2.3.1.2 Analyse dipolarer kreuzkorrelierter Relaxationsraten des

$$\text{Typs } \Gamma_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD}, \Gamma_{C2'H2',C3'H3'}^{DD,DD} \text{ und } \Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD}$$

Alternativ zu der Analyse von ^3J -Kopplungen können auch kreuzkorrelierte Relaxationsraten dazu verwendet werden, die Pseudorotationsphase sowie die Amplitude v^{\max} zu bestimmen. Es existieren zwei Methoden zur Bestimmung der kreuzkorrelierten Relaxationsraten $\Gamma_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD}$, $\Gamma_{C2'H2',C3'H3'}^{DD,DD}$ und $\Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD}$, das 2D- Γ -HCCH-Experiment [268] und das *forward directed quantitative* 3D- Γ -HCCH-TOCSY-Experiment [236]. Diese kreuzkorrelierten Relaxationsraten sind unter Annahme isotroper Rotationsdiffusion über folgende Beziehung mit dem Projektionswinkel der involvierten Relaxationsraten verknüpft (exemplarisch gezeigt für die $\Gamma_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD}$ -Rate; analoge Formeln gelten für die $\Gamma_{C2'H2',C3'H3'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD}$ -Rate).

Gleichung 4-24

$$\Gamma_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD} = \frac{1}{5} \frac{\gamma_H^2 \gamma_C^2}{r_{C1'H1'}^3 r_{C2'H2'}^3} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \hbar^2 (S_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD})^2 (3 \cos^2 \theta_{C1'H1',C2'H2'} - 1) \tau_c$$

Dabei sind γ_H und γ_C die gyromagnetischen Konstanten der Wasserstoff- und Kohlenstoffkerne, $r_{C1'H1'}$ und $r_{C2'H2'}$ die Längen der $\overline{C1'H1'}$ -, $\overline{C2'H2'}$ -Bindungsvektoren, die auf 1.090 Å gesetzt wurden. μ_0 ist die magnetische Feldkonstante des Vakuums, τ_c die isotrope globale Rotationskorrelationszeit des Moleküls, \hbar die Planck-Konstante geteilt durch 2π , $(S_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD})^2$ der kreuzkorrelierte Ordnungsparameter der internen Bewegung und $\theta_{C1'H1',C2'H2'}$ der Projektionswinkel zwischen den Bindungsvektoren $\overline{C1'H1'}$ und $\overline{C2'H2'}$. Der Projektionswinkel $\theta_{C1'H1',C2'H2'}$ ist eine Funktion der Pseudorotationsphase P sowie der maximalen Amplitude v^{\max} . Die Beziehungen wurden für $\theta_{C1'H1',C2'H2'}$, $\theta_{C2'H2',C3'H3'}$ und $\theta_{C3'H3',C4'H4'}$ über die Analyse von Nukleinsäurekristallstrukturen abgeleitet [263]. Sie lauten

Gleichung 4-25

$$\theta_{C1'H1',C2'H2'} = 123.3^\circ + 1.102v^{\max} \cos(P - 144^\circ)$$

$$\theta_{C2'H2',C3'H3'} = 0.2^\circ + 1.090v^{\max} \cos P$$

$$\theta_{C3'H3',C4'H4'} = -124.9^\circ + 1.095v^{\max} \cos(P + 144^\circ)$$

Können mehrere Relaxationsraten für einen Riboserest bestimmt werden, so kann das Verhältnis dieser Relaxationsraten zueinander bestimmt werden. Zum Beispiel liefert der Quotient aus $\Gamma_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD}$ und $\Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD}$

Gleichung 4-26

$$\frac{\Gamma_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD}}{\Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD}} = \frac{r_{C3'H3'}^3 r_{C4'H4'}^3 (S_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD})^2 (3 \cos^2 \theta_{C1'H1',C2'H2'} - 1)}{r_{C1'H1'}^3 r_{C2'H2'}^3 (S_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD})^2 (3 \cos^2 \theta_{C3'H3',C4'H4'} - 1)}$$

Nimmt man an, dass alle \overline{CH} -Bindungsvektoren in der Ribose die gleiche Länge besitzen und die unterschiedlichen gekreuzkorrelierten Ordnungsparameter in etwa den gleichen Wert annehmen, so vereinfacht sich die Gleichung zu

Gleichung 4-27

$$\frac{\Gamma_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD}}{\Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD}} = \frac{(3 \cos^2 \theta_{C1'H1',C2'H2'} - 1)}{(3 \cos^2 \theta_{C3'H3',C4'H4'} - 1)}$$

Division der gekreuzkorrelierten Relaxationsraten liefert demnach eine Funktion, die unabhängig von der globalen Rotationskorrelationszeit τ_c ist und den Effekt der internen Bewegung zumindest näherungsweise eliminiert. Einsetzen der Gleichung 4-25 in Gleichung 4-27 liefert die Abhängigkeit des $\Gamma_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD} / \Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD}$ -Verhältnisses von v^{\max} und P (Gleichung 4-28).

Gleichung 4-28

$$\frac{\Gamma_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD}}{\Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD}} = \frac{(3 \cos^2(123.3^\circ + 1.102v^{\max} \cos(P - 144^\circ)) - 1)}{(3 \cos^2(0.2^\circ + 1.090v^{\max} \cos P) - 1)}$$

4.2.3.2 Entwicklung neuer Methoden zur Bestimmung der Ribosekonformation in RNA-Oligonukleotiden. Analyse dipolarer kreuzkorrelierter Relaxationsraten des Typs $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$,

$$\Gamma_{C2'H2',C4'H4'}^{DD,DD} \text{ und } \Gamma_{C1'H1',C4'H4'}^{DD,DD}$$

Das $\Gamma_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD} / \Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD}$ -Verhältnis ist abhängig von v^{\max} und P . Um beide Parameter der Ribosekonformation genau beschreiben zu können, ist demnach zusätzliche Information notwendig. Die $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}(v^{\max}, P)$ -, $\Gamma_{C1'H1',C4'H4'}^{DD,DD}(v^{\max}, P)$ - und $\Gamma_{C2'H2',C4'H4'}^{DD,DD}(v^{\max}, P)$ -Relaxationsraten liefern solche zusätzliche Information. Es existieren jedoch bisher keine empirischen oder analytischen Funktionen, die die $\theta_{C1'H1',C3'H3'}(v^{\max}, P)$ -, $\theta_{C2'H2',C4'H4'}(v^{\max}, P)$ - und $\theta_{C1'H1',C4'H4'}(v^{\max}, P)$ -Abhängigkeiten beschreiben. In dieser Arbeit wurden diese Beziehungen erstmals theoretisch mit Hilfe mathematischer Beziehungen der linearen Algebra hergeleitet. Für die Herleitung der $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}(v^{\max}, P)$ -Beziehung wird das Skalarprodukt zwischen dem $\overline{C1'H1'}$ - und dem $\overline{C3'H3'}$ -Bindungsvektor gebildet (siehe Abbildung 4.14A). Die Orientierung der beiden Bindungsvektoren zueinander ist abhängig von den Bindungswinkeln α , γ und δ (Definition siehe Tabelle 4-6) sowie den Torsionswinkeln v_1 , und v_2 (Definition, siehe Abbildung 4.14A, B und Tabelle 4-5). Die sich ergebende $\theta_{C1'H1',C3'H3'}(v^{\max}, P)$ -Abhängigkeit ist in Gleichung 4-29 wiedergegeben. Die analog dazu hergeleiteten $\theta_{C1'H1',C4'H4'}(v^{\max}, P)$ - und $\theta_{C2'H2',C4'H4'}(v^{\max}, P)$ -Abhängigkeiten sind in Gleichung 4-30 und Gleichung 4-31 wiedergegeben. Die für diese Gleichungen verwendeten Winkel- und Parameterdefinitionen finden sich in Tabelle 4-5 und Tabelle 4-6 wieder.

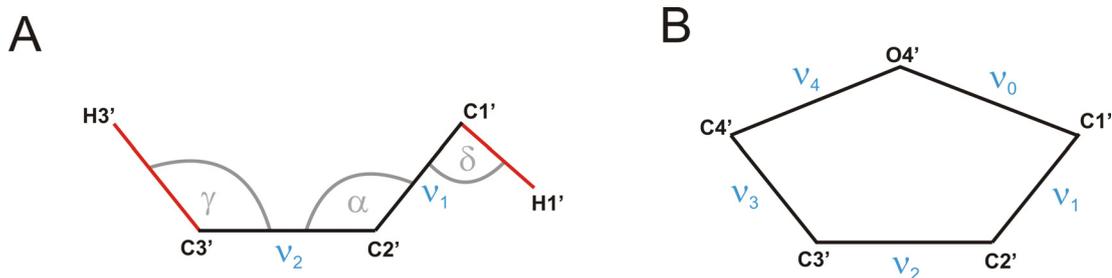


Abbildung 4.14 (A) Schematische Darstellung der relevanten Bindungswinkel (α , γ , δ) und Torsionswinkel (ν_1 , ν_2), die für die Herleitung der $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}(\nu^{\max}, P)$ -Beziehung benötigt werden. Die für die $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ -Rate maßgebenden Bindungsvektoren $\overline{C1'H1'}$ und $\overline{C3'H3'}$ sind in rot dargestellt. **(B)** Darstellung aller Torsionswinkel ($\nu_0, \nu_1, \nu_2, \nu_3, \nu_4$), die die Pseudorotationsphase der Ribose definieren.

Tabelle 4-5 Winkeldefinitionen und Parameterdefinitionen, die in Gleichung 4-29, Gleichung 4-30 und Gleichung 4-31 verwendet wurden.

| | |
|---------------|---|
| β | $= 180^\circ - \delta$ |
| ε | $= \alpha + \gamma - 180^\circ$ |
| ν_0 | $\nu_0 = \nu^{\max} * \cos(P - 288^\circ)$ |
| ν_1 | $\nu_1 = \nu^{\max} * \cos(P - 144^\circ)$ |
| ν_2 | $\nu_2 = \nu^{\max} * \cos P$ |
| ν_3 | $\nu_3 = \nu^{\max} * \cos(P + 144^\circ)$ |
| ν_4 | $= \nu^{\max} * \cos(P + 288^\circ)$ |
| D | $= \cos \alpha * \cos \varepsilon + \sin \alpha * \sin \varepsilon$ |

Tabelle 4-6 Gleichungs-spezifische Winkeldefinitionen, die in Gleichung 4-29, Gleichung 4-30 und Gleichung 4-31 verwendet wurden.

| Winkel | Gleichung 4-29 | Gleichung 4-30 | Gleichung 4-31 |
|----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| α | $= C1'-C2'-C3'$ | $= C4'-O4'-C1'$ | $= C2'-C3'-C4'$ |
| γ | $= C2'-C3'-H3'$ | $= O4'-C1'-H1'$ | $= C3'-C4'-H4'$ |
| δ | $= C2'-C1'-H1'$ | $= O4'-C4'-H4'$ | $= C3'-C2'-H2'$ |

Gleichung 4-29

$$\begin{aligned} \cos \theta_{C1'H1',C3'H3'} &= \left[\mathbf{D}^* \cos \alpha + (\cos \varepsilon - \mathbf{D}^* \cos \alpha) \cos(\nu_2 - 119.35^\circ) \right] \cos \beta \\ &+ \left[\mathbf{D}^* \sin \alpha + (\sin \varepsilon - \mathbf{D}^* \sin \alpha) \cos(\nu_2 - 119.35^\circ) \right] \sin \beta \cos(\nu_1 - 116.67^\circ) \\ &- \sqrt{(\cos \varepsilon - \mathbf{D}^* \cos \alpha)^2 + (\sin \varepsilon - \mathbf{D}^* \sin \alpha)^2} \sin(\nu_2 - 119.35^\circ) \sin \beta \sin(\nu_1 - 116.67^\circ) \end{aligned}$$

Gleichung 4-30

$$\begin{aligned} \cos \theta_{C1'H1',C4'H4'} &= \left[\mathbf{D}^* \cos \alpha + (\cos \varepsilon - \mathbf{D}^* \cos \alpha) \cos(\nu_0 + 120.0^\circ) \right] \cos \beta \\ &+ \left[\mathbf{D}^* \sin \alpha + (\sin \varepsilon - \mathbf{D}^* \sin \alpha) \cos(\nu_0 + 120.0^\circ) \right] \sin \beta \cos(\nu_4 - 116.39^\circ) \\ &- \sqrt{(\cos \varepsilon - \mathbf{D}^* \cos \alpha)^2 + (\sin \varepsilon - \mathbf{D}^* \sin \alpha)^2} \sin(\nu_0 + 120.0^\circ) \sin \beta \sin(\nu_4 - 116.39^\circ) \end{aligned}$$

Gleichung 4-31

$$\begin{aligned} \cos \theta_{C2'H2',C4'H4'} &= \left[\mathbf{D}^* \cos \alpha + (\cos \varepsilon - \mathbf{D}^* \cos \alpha) \cos(\nu_3 + 120.86^\circ) \right] \cos \beta \\ &+ \left[\mathbf{D}^* \sin \alpha + (\sin \varepsilon - \mathbf{D}^* \sin \alpha) \cos(\nu_3 + 120.86^\circ) \right] \sin \beta \cos(\nu_2 + 120.0^\circ) \\ &- \sqrt{(\cos \varepsilon - \mathbf{D}^* \cos \alpha)^2 + (\sin \varepsilon - \mathbf{D}^* \sin \alpha)^2} \sin(\nu_3 + 120.86^\circ) \sin \beta \sin(\nu_2 + 120.0^\circ) \end{aligned}$$

Die $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ -Relaxationsrate lässt sich durch Einsetzen von Gleichung 4-29 in Gleichung 4-32 folgendermaßen berechnen.

Gleichung 4-32

$$\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD} = \frac{1}{5} \frac{\gamma_H^2 \gamma_C^2}{r_{C1'H1'}^3 r_{C3'H3'}^3} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \hbar^2 (\mathcal{S}_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD})^2 (3 \cos^2 \theta_{C1'H1',C3'H3'} - 1) \tau_c$$

Zu Gleichung 4-32 analoge Beschreibungen gelten für die Berechnung der $\Gamma_{C2'H2',C4'H4'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C1'H1',C4'H4'}^{DD,DD}$ -Rate. Die vollkommen analytische Beschreibung der Beziehung zwischen Projektionswinkel, Pseudorotationsphase und ν^{\max} hat den Vorteil, dass eine Verfeinerung der Kurven im Nachhinein problemlos möglich ist. Zum Beispiel werden die Bindungswinkel α , β und δ zum gegenwärtigen Zeitpunkt

als konstant und unabhängig von P und v^{\max} angenommen. Obwohl es im Moment für eventuelle Abhängigkeiten dieser Winkel keine Anhaltspunkte gibt, könnten solche Abhängigkeiten problemlos in die oben angegebenen Gleichungen integriert werden, sollten diese zu einem späteren Zeitpunkt nachgewiesen werden, was zu einer leichten Modifikation der Ratenabhängigkeiten führen würde. Die $\Gamma_{C2'H2',C4'H4'}^{DD,DD}(P, v^{\max})$ -, $\Gamma_{C1'H1',C4'H4'}^{DD,DD}(P, v^{\max})$ - und $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}(P, v^{\max})$ -Abhängigkeiten sind in Abbildung 4.15 für v^{\max} Werte von 30° , 35° , 40° und 45° dargestellt. Aus dieser Abbildung wird ersichtlich, dass sich die P -Abhängigkeiten der unterschiedlichen Raten deutlich voneinander unterscheiden. Außerdem ist die Abhängigkeit von v^{\max} besonders in den Bereichen der Minima für die $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}(P)$ - und $\Gamma_{C2'H2',C4'H4'}^{DD,DD}(P)$ -Kurven sowie im Bereich des Maximums der $\Gamma_{C1'H1',C4'H4'}^{DD,DD}(P)$ -Kurve besonders ausgeprägt. Bemerkenswerter Weise ist die

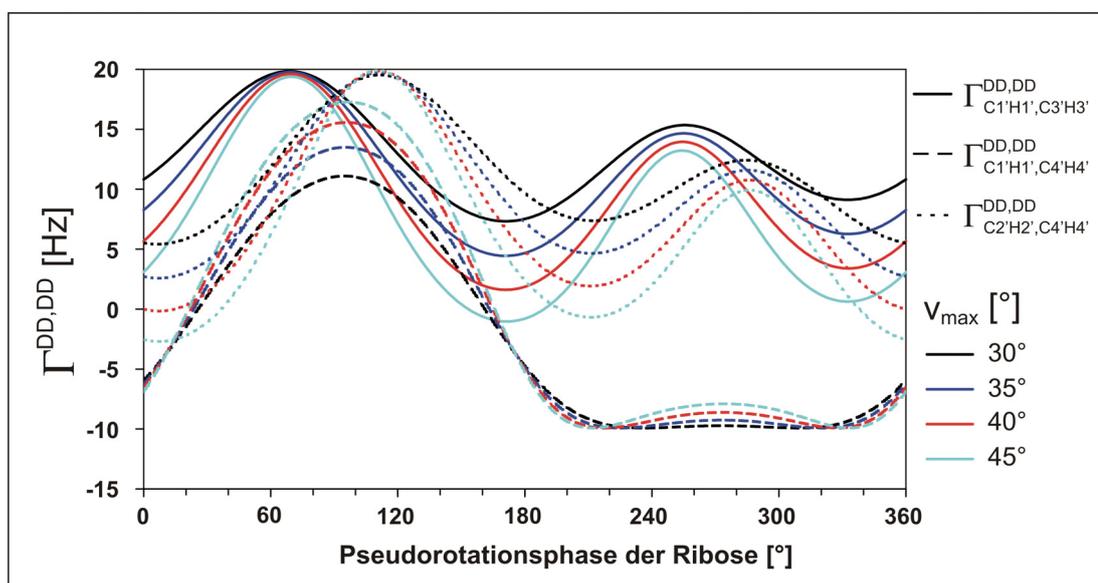


Abbildung 4.15 $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ (durchgezogene Linie), $\Gamma_{C1'H1',C4'H4'}^{DD,DD}$ (gestrichelte Linie) und $\Gamma_{C2'H2',C4'H4'}^{DD,DD}$ (gepunktete Linie) in Abhängigkeit der Pseudorotationsphase P der Ribose dargestellt für verschiedene v_{\max} -Werte von 30° (schwarz), 35° (blau), 40° (rot) und 45° (hellblau) für einen τ_c -Wert von 2.31 ns. Für die jeweiligen kreuzkorrelierten Ordnungsparameter wurde ein Wert von 1 angenommen.

$\Gamma_{C1'H1',C4'H4'}^{DD,DD}(P)$ -Rate im Bereich zwischen $P=200^\circ$ - 330° annähernd konstant und negativ, was sich als besonders nützlich erweist, um die Degeneration der anderen Ratenabhängigkeiten aufzulösen.

Abbildung 4.16A,B,C zeigt die P-Abhängigkeiten der $\Gamma_{C2'H2',C4'H4'}^{DD,DD} / \Gamma_{C1'H1',C4'H4'}^{DD,DD}$ -, $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD} / \Gamma_{C1'H1',C4'H4'}^{DD,DD}$ - und $\Gamma_{C2'H2',C4'H4'}^{DD,DD} / \Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ -Verhältnisse für v^{\max} -Werte von 30° , 35° , 40° und 45° . Die Kurven zeigen jeweils charakteristische Abhängigkeiten dieser Quotienten von der Pseudorotationsphase P. Die neu hinzukommenden $\Gamma_{C2'H2',C4'H4'}^{DD,DD}(P, v^{\max})$ -, $\Gamma_{C1'H1',C4'H4'}^{DD,DD}(P, v^{\max})$ - und $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}(P, v^{\max})$ -Ratenabhängigkeiten ergänzen somit die Informationen, die aus den $\Gamma_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD}(P, v^{\max})$ -, $\Gamma_{C2'H2',C3'H3'}^{DD,DD}(P, v^{\max})$ - und $\Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD}(P, v^{\max})$ -Abhängigkeiten gewonnen werden können und erlauben eine noch genauere Beschreibung von Struktur und Dynamik der Ribosereste von RNA-Molekülen.

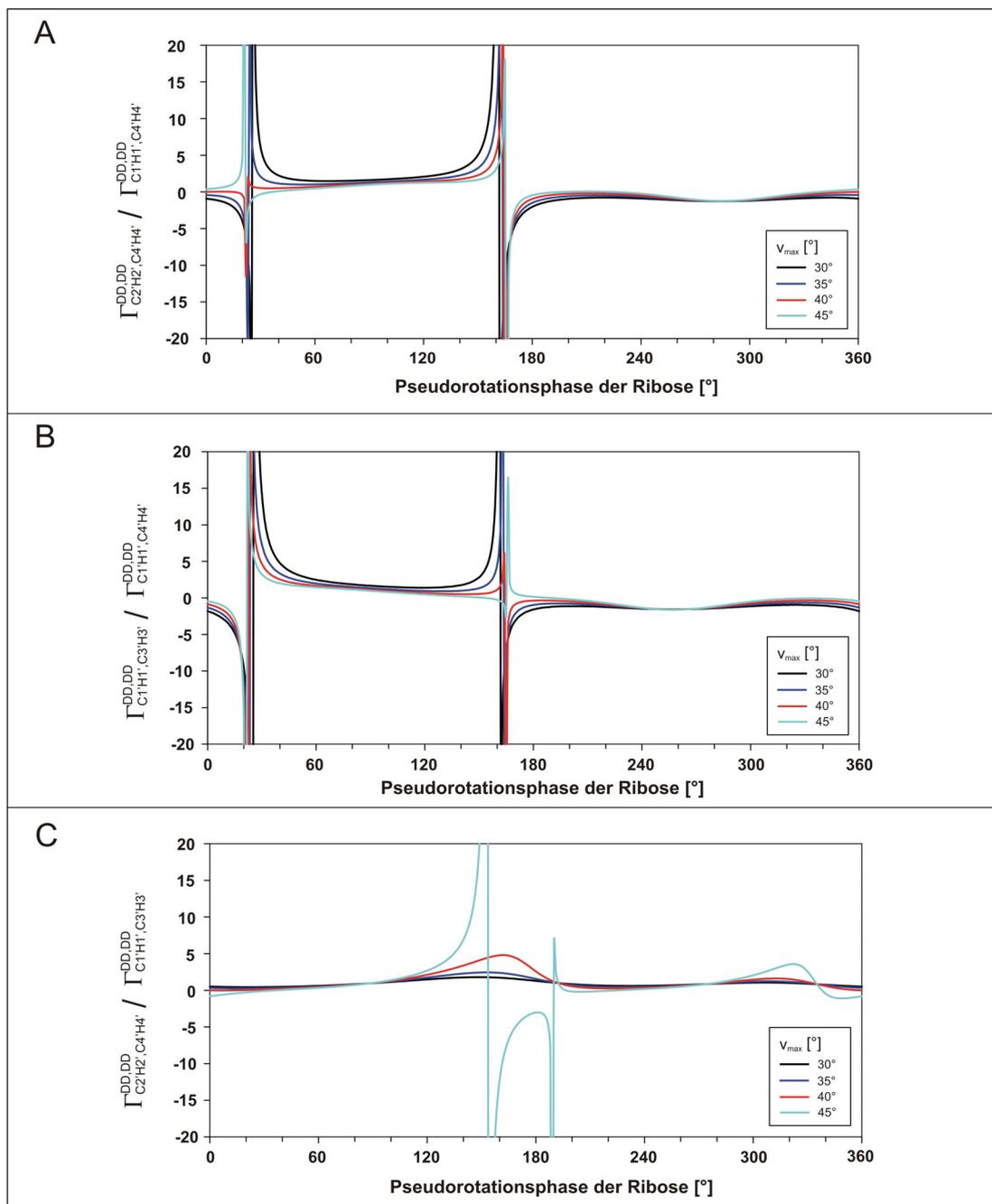


Abbildung 4.16 (A) $\Gamma_{C2'H2',C4'H4'}^{DD,DD} / \Gamma_{C1'H1',C4'H4'}^{DD,DD}$ -Verhältnis in Abhängigkeit von P (B) $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD} / \Gamma_{C1'H1',C4'H4'}^{DD,DD}$ -Verhältnis in Abhängigkeit von P (C) $\Gamma_{C2'H2',C4'H4'}^{DD,DD} / \Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ -Verhältnis in Abhängigkeit von P. Alle Relaxationsratenverhältnisse in (D), (E), (F) sind jeweils für verschiedene v_{\max} -Werte von 30° (schwarz), 35° (blau), 40° (rot) und 45° (hellblau) dargestellt.

4.2.3.3 Pulssequenz

Um die $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}(P, \nu^{\max})$ -Rate zu bestimmen, wurde eine neue Pulssequenz entwickelt, das 3D- Γ -HCCCH-Experiment. Die Pulssequenz ist in Abbildung 4.17 graphisch dargestellt. Sie beginnt mit der Gleichgewichtsmagnetisierung der H3'-Protonen, während die Detektion auf den H1'-Protonen stattfindet. Die Sequenz ist als 3D-Experiment ausgelegt wobei die drei Dimensionen aus den chemischen Verschiebungen der C2'-, C1'- und H1'-Kerne bestehen. Da die C1'- und H1'-Kerne generell eine höhere Dispersion der chemischen Verschiebung als die restlichen Kerne innerhalb der Ribose aufweisen, reduziert dieses Experiment den Signalüberlapp auf ein Minimum. Ein weiterer Vorteil des Experiments ist, dass für die Durchführung des Experiments auf die komplette Zuordnung der Ribosespinsysteme verzichtet werden kann. In den meisten Fällen ist sogar die Zuordnung der C1'-H1'-Signale im [$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$]-HSQC ausreichend.

Das Experiment zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus. Das liegt vor allem an der Tatsache, dass die $^1\text{J}(\text{C},\text{C})$ -Kopplungen innerhalb des Ribosespinsystems nahezu gleich sind, was für den Magnetisierungstransfer in folgender Weise ausgenutzt wurde. Während eines CC-COSY-Transferschrittes können gleichzeitig jeweils eine Kopplung entwickelt und eine andere Kopplung refokussiert werden. Auf diese Weise kann der Magnetisierungstransfer mit doppelter Geschwindigkeit im Vergleich zu einem herkömmlichen COSY erfolgen. Die Transfargeschwindigkeit entspricht dadurch der Transfargeschwindigkeit des CC-TOCSYs, allerdings ohne den Nachteil, dass nicht die gesamte Magnetisierung zum gewünschten Kern übertragen werden kann. Das 3D- Γ -HCCCH-Experiment transferiert die Magnetisierung, abgesehen von den Relaxationsverlusten, vollständig vom H3'-Proton auf das H1'-Proton eines Riboserestes. Zusammengefasst führt dies dazu, dass trotz der relativ langen Gesamtdauer des Experiments von 93.5 ms der Transfer der Magnetisierung effizient genug erfolgt, um eine ausreichende Sensitivität zu erzielen.

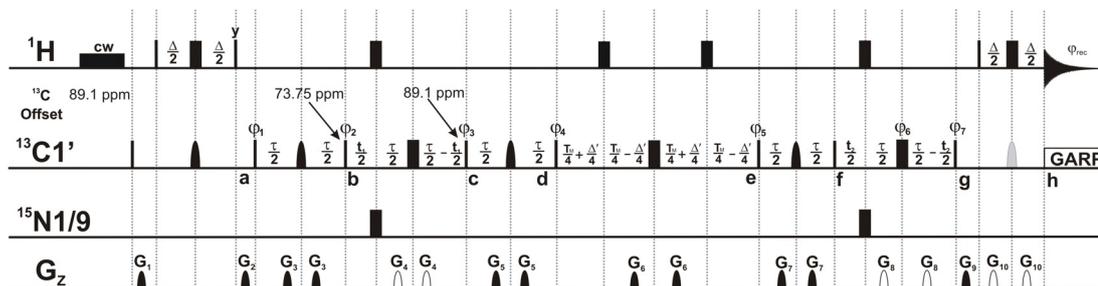


Abbildung 4.17 Pulssequenz des 3D- Γ -HCCCH. Schmale und breite gefüllte Rechtecke entsprechen 90° - und 180° -Pulsen, die mit einer RF-Feldstärke von 20.8 kHz (^1H), 18.5 kHz (^{13}C) und 6.94 kHz (^{15}N) angewendet werden. Gradienten (G_1 - G_{10}) sind als schwarze gefüllte bzw. ungefüllte Semiellipsen dargestellt. Die generelle Pulsphase ist x, falls nicht anders angegeben. Die Pulssequenz wurde an einem Bruker Spektrometer mit der für Bruker typischen Phasenomenklatur optimiert [257]. Das breite gefüllte Rechteck zu Beginn der Pulssequenz repräsentiert einen optionalen Sättigungspuls auf die Wasserresonanz. Die festen Zeitspannen werden wie folgt gesetzt: $\Delta = 3$ ms, $\tau = 12.5$ ms. Referenzexperiment: $\Delta' = 3.125$ ms. Kreuzexperiment: $\Delta' = 0$ ms. Die Protonenträgerfrequenz wird auf die Wasserfrequenz (4.7 ppm) und die Stickstoffträgerfrequenz auf 160 ppm gesetzt. Die Kohlenstoffträgerfrequenz wird zu Beginn des Experiments auf 89.1 ppm und während der Entwicklung der $\text{C}2'$ -chemischen Verschiebung (Zwischen Zeitpunkt **b** und **c**) vorübergehend auf 73.75 ppm gesetzt. Bei einer magnetischen Feldstärke von 700 MHz werden bandselektive Pulse folgendermaßen gesetzt. 180° -ReBurp 2.5 ms, Einstrahlfrequenz (Abstand von der Trägerfrequenz): -3000 Hz (schwarze Semiellipse); 180° -ReBurp 1.5 ms, Einstrahlfrequenz (Abstand von Trägerfrequenz): 1000 Hz (graue Semiellipse). Es wird asynchrone GARP-Entkopplung [110] auf dem ^{13}C -Kanal verwendet, um heteronukleare skalare Kopplungen während der Akquisition zu unterdrücken. Die Amplitude der gepulsten Gradienten G_1 - G_{10} ist sinusförmig. Die Gradienten G_4 , G_8 und G_{10} (ungefüllte Semiellipsen) haben eine Länge von 500 μs . Alle weiteren Gradienten haben eine Länge von 1 ms (schwarze gefüllte Semiellipsen). Bei allen gepulsten Gradienten handelt es sich um Gradienten in z-Richtung. Die verwendeten Gradienten haben folgende Stärken: G_1 : 10%, G_2 : 15%, G_3 : 20%, G_4 : 15%, G_5 : 30%, G_6 : 5%, G_7 : 20%, G_8 : 15%, G_9 : 25%, G_{10} : 20%. 100% Gradientenstärke entsprechen 55 Gauss/cm. Phasenzyklus: $\varphi_1 = 2(x), 2(-x)$; $\varphi_2 = 16(y), 16(-y)$; $\varphi_3 = y, -y$; $\varphi_4 = 4(x), 4(-x)$; $\varphi_5 = 8(y), 8(-y)$; $\varphi_6 = x$; $\varphi_7 = y, -y$; $\varphi_{\text{rec}} = x, 2(-x), x, -x, 2(x), -x, -x, 2(x), -x, x, 2(-x), x$. φ_1 und φ_2 werden entsprechend der States-TPPI-Methode [261] für die Quadraturdetektion in der $\text{C}2'(\omega_1)$ -Dimension und φ_6 und φ_7 ebenfalls entsprechend der States-TPPI-Methode [261] für die Quadraturdetektion in der $\text{C}1'(\omega_2)$ -Dimension inkrementiert.

Im folgenden Abschnitt wird der Magnetisierungstransfer des 3D- Γ -HCCCH-Experiments im Detail beschrieben (siehe Abbildung 4.17). Die Kohärenz $2H3'_zC3'_z$ zum Zeitpunkt **a** (Abbildung 4.17) in der 3D- Γ -HCCCH-Pulssequenz wird über einen INEPT-Schritt erzeugt, indem die $^1J(H3',C3')$ -Kopplung entwickelt wird. Zwischen Zeitpunkt **a** und **b** wird die $^1J(C2',C3')$ -Kopplung entwickelt, was zu der Kohärenz $4H3'_zC3'_zC2'_x$ zum Zeitpunkt **b** führt. Dazu wird ein 180° -ReBurp-Puls von 2.5 ms Länge eingesetzt, der selektiv die $C3'$ - und $C2'$ -Kerne trifft. Zwischen Zeitpunkt **b** und **c** werden gleichzeitig die $^1J(C2',C3')$ -Kopplung refokussiert und die $^1J(C1',C2')$ -Kopplung entwickelt. Zusätzlich dazu wird in einer *constant time* Art und Weise die $C2'$ -chemische Verschiebung entwickelt. Dies führt schließlich zu der Kohärenz $4H3'_zC2'_xC1'_z\cos(\omega t_1)$ zum Zeitpunkt **c**. Die orthogonale Komponente $4H3'_zC2'_yC1'_z\sin(\omega t_1)$, die durch die Entwicklung der chemischen Verschiebung entsteht, wird durch den Phasenzklus der Phase ϕ_3 eliminiert. Ein weiterer $C2'$ - $C3'$ -COSY-Schritt zwischen Zeitpunkt **c** und **d** führt schließlich zu der Kohärenz $8H3'_zC2'_yC3'_zC1'_z\cos(\omega t_1)$ zum Zeitpunkt **d**. Ein direkt darauf folgender 90° -Puls auf dem ^{13}C -Kanal mit dem Phasenzklus ϕ_4 liefert die Doppel- und Nullquantenkohärenz $8H3'_zC2'_zC3'_yC1'_y\cos(\omega t_1)$ zu Beginn der Mischzeit. Während der Mischzeit entwickelt sich diese Kohärenz folgendermaßen.

$$\begin{aligned}
&8H3'_zC2'_zC3'_yC1'_y\cos(\omega t_1) \rightarrow \\
&8H3'_zC2'_zC3'_yC1'_y\cos(\omega t_1)[\cosh(\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}, T_M)\cos(\pi J_{C1'H1'}\Delta')\cos(\pi J_{C3'H3'}\Delta') + \\
&\sinh(\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}, T_M)\sin(\pi J_{C1'H1'}\Delta')\sin(\pi J_{C3'H3'}\Delta')] + \\
&8H1'_zC2'_zC3'_xC1'_x\cos(\omega t_1)[\sinh(\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}, T_M)\cos(\pi J_{C1'H1'}\Delta')\cos(\pi J_{C3'H3'}\Delta') + \\
&\cosh(\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}, T_M)\sin(\pi J_{C1'H1'}\Delta')\sin(\pi J_{C3'H3'}\Delta')]
\end{aligned}$$

Der 90° -Puls auf dem ^{13}C -Kanal mit der Phase ϕ_5 zum Ende der Mischzeit selektiert den $8H1'_zC2'_zC3'_xC1'_x\cos(\omega t_1)$ -Operator und eliminiert den $8H3'_zC2'_zC3'_yC1'_y\cos(\omega t_1)$ -Operator. Für das Referenzexperiment wird die Zeitspanne Δ' auf 3.125 ms gesetzt. Dadurch wird der sinh-modulierte Term gleich null. Im Referenzexperiment wird so der folgende Operator selektiert

$$8H1'_zC2'_zC3'_xC1'_x\cos(\omega t_1)\cosh(\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}, T_M)\sin(\pi/2)\sin(\pi/2)$$

$$= 8H1'_z C2'_z C3'_x C1'_x \cos(\omega t_1) \cosh(\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD} T_M)$$

Im Kreuzexperiment wird Δ' auf 0 ms gesetzt. Dies führt zur Selektion des Operators

$$8H1'_z C2'_z C3'_x C1'_x \cos(\omega t_1) \sinh(\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD} T_M) \cos(0) \cos(0)$$

$$= 8H1'_z C2'_z C3'_x C1'_x \cos(\omega t_1) \sinh(\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD} T_M)$$

Die selektierten Operatoren zum Zeitpunkt **e** von Referenz- und Kreuzexperiment unterscheiden sich lediglich dadurch, dass der Operator \sinh (Kreuzexperiment)- bzw. \cosh (Referenzexperiment)-moduliert ist. Die restliche Beschreibung der Pulssequenz beschränkt sich auf den Operator des Referenzexperiments.

Der 90°-Puls, angewendet mit Phase φ_5 auf dem ^{13}C -Kanal zum Ende der Mischzeit, konvertiert die Kohärenz zu $8H1'_z C2'_x C1'_z C3'_z \cos(\omega t_1) \cosh(\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD} T_M)$. Ein darauffolgender INEPT-Schritt refokussiert selektiv die $^1\text{J}(\text{C}2', \text{C}3')$ -Kopplung. Der 90°-Puls im Anschluss daran führt zu der Kohärenz $4H1'_z C2'_z C1'_y \cos(\omega t_1) \cosh(\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD} T_M)$ zum Zeitpunkt **f**. Zwischen den Zeitpunkten **f** und **g** wird die $^1\text{J}(\text{C}1', \text{C}2')$ -Kopplung refokussiert. Zusätzlich dazu wird in einer *constant time* Art und Weise die $\text{C}1'$ -chemische Verschiebung entwickelt. Dies führt zu der Kohärenz $2H1'_z C1'_z \cos(\omega t_1) \cos(\omega t_2) \cosh(\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD} T_M)$. Die bei der Entwicklung der $\text{C}1'$ -chemischen Verschiebung entstehende orthogonale Komponente wird durch den Gradienten G_9 eliminiert. Schließlich wird die $^1\text{J}(\text{C}1', \text{H}1')$ -Kopplung refokussiert, was zu Inphase-Magnetisierung $H1'_x \cos(\omega t_1) \cos(\omega t_2) \cosh(\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD} T_M)$ zum Zeitpunkt **h** führt. Durch Anwendung der States-TPPI-Methode für die beiden indirekten Dimensionen der chemischen Verschiebung t_1 und t_2 und durch Quadraturdetektion in der direkten Dimension kann eine komplexe Transferamplitude generiert werden. Sie hat die Form

$$H1'_x \exp(i\omega_{C2'} t_1) \exp(i\omega_{C1'} t_2) \exp(i\omega_{H1'} t_3) \cosh(\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD} T_M)$$

Die entsprechende Transferamplitude des Kreuzexperiments hat die Form

$$H1'_{\text{x}} \exp(i\omega_{C2'}t_1) \exp(i\omega_{C1'}t_2) \exp(i\omega_{H1'}t_3) \sinh(\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD} T_M).$$

Division der Intensitäten der jeweiligen Signale des Kreuz- und des Referenzexperiments und Auflösen der Gleichung nach $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ liefert folgende Formel (Gleichung 4-33) für die Extraktion der kreuzkorrelierten $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ -Relaxationsrate.

Gleichung 4-33

$$\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD} = T_M^{-1} \tanh^{-1} \left(\frac{ns^{ref} I^{cross}}{ns^{cross} I^{ref}} \right)$$

4.2.4 Ergebnisse und Diskussion

Um die Funktionsfähigkeit des neuen Experiments zu überprüfen, wurde das 3D- Γ -HCCCH-Experiment an einer ^{13}C , ^{15}N -doppelt-markierten cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA-Probe durchgeführt. Die Spektren sind in Abbildung 4.18 dargestellt. Das Experiment wurde als 2D-[H1',C1'] (Abbildung 4.18C, D) sowie als 3D-[H1',C1',C2'] (Abbildung 4.18A, B) durchgeführt (Akquisitionsparameter, siehe Anhang Tabelle 7-12). Ein Vergleich von 2D- und 3D-Experiment verdeutlicht den Gewinn an Auflösung, der durch die zusätzliche Evolution der C2'-chemischen Verschiebung erzielt wird. Des Weiteren ist deutlich zu erkennen, dass sowohl Kreuz- als auch Referenzexperimente mit ausreichender Sensitivität aufgenommen werden konnten, so dass eine Extraktion der $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ -Raten aus den Signalintensitäten möglich ist.

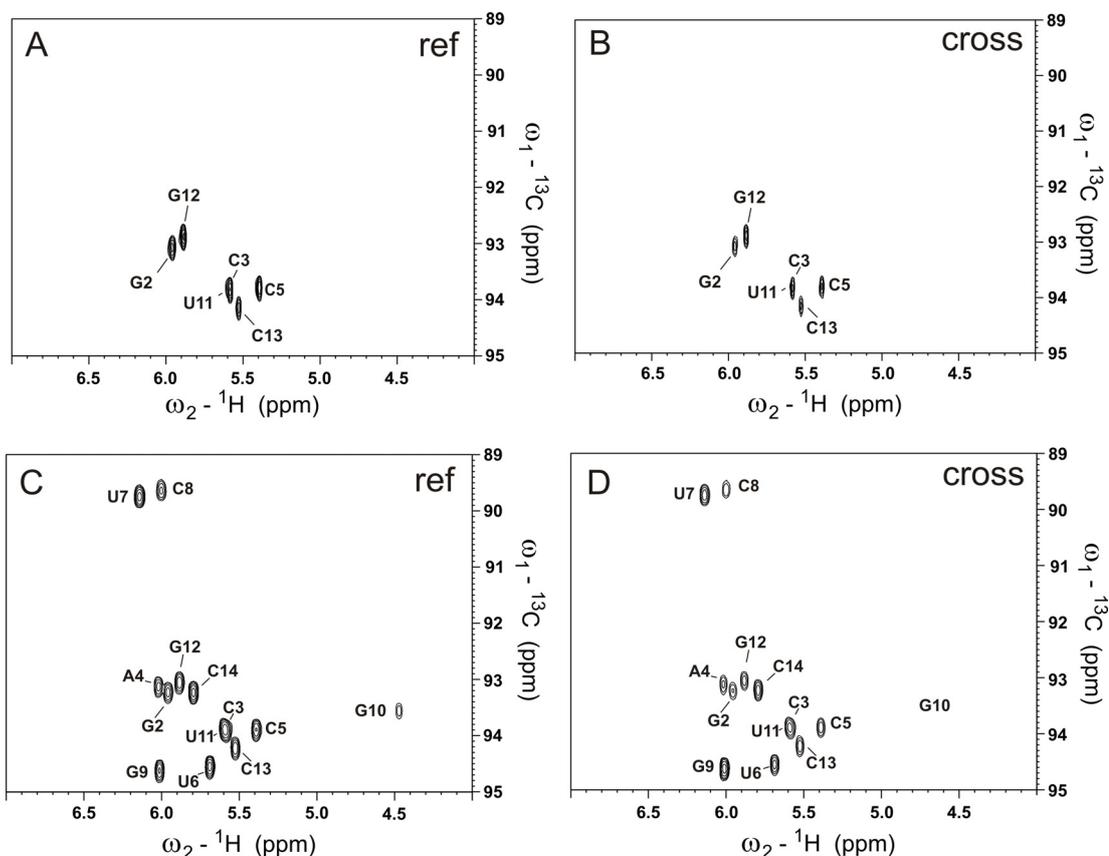


Abbildung 4.18 Spektrum des quantitativen Γ -HCCCH-Experiments der cUUCGg-tetraloop-14mer-RNA. Die Spektren wurden an einem 700-MHz-Spektrometer bei einer Temperatur von 298 K aufgenommen. Die Akquisitionsparameter der aufgenommenen Γ -HCCCH-Experimente befinden sich im Anhang in Tabelle 7-12 (A) $[C1'-H1']$ -Schnitt 34 aus dem 3D- Γ -HCCCH-Referenzexperiment (B) $[C1'-H1']$ -Schnitt 34 aus dem 3D- Γ -HCCCH-Kreuzexperiment (C) 2D- $[C1'-H1']$ - Γ -HCCCH-Referenzexperiment (D) 2D- $[C1'-H1']$ - Γ -HCCCH-Kreuzexperiment

Die Ergebnisse der $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ -Ratenextraktion entsprechend Gleichung 4-33 sind in Tabelle 4-7 wiedergegeben. Abbildung 4.19A zeigt den Vergleich von gemessener $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ -Rate für die einzelnen Nukleotide der 14mer-RNA im Vergleich zu den theoretisch vorhergesagten $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}(V^{\max}, P)$ -Kurven. Der Vergleich zu den aus $\Gamma_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD} / \Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD}$ -Verhältnissen bestimmten P-Werten ist in blau, der Vergleich zu den P-Werten der 14mer-NMR-Struktur in rot dargestellt. Abbildung 4.19B zeigt eine Vergrößerung des Ausschnitts von Abbildung 4.19A für P-Werte

zwischen 0-50°. Die aus dem 3D- Γ -HCCCH-Experiment extrahierten $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ -Raten stimmen bis auf wenige Ausnahmen gut mit den theoretisch vorhergesagten Werten überein. Für G9 scheint die $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ -Rate einen höheren P-Wert anzuzeigen, als es das $\Gamma_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD} / \Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD}$ -Verhältnis und die NMR-Struktur ergeben. Ansonsten liegen die gemessenen $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ -Raten entweder im erwarteten Bereich oder leicht unterhalb der theoretisch berechneten Kurve. Eine mögliche Ursache für diese Abweichungen ist, dass die theoretisch berechneten Werte in Abbildung 4.19A, B für einen $(S_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD})^2$ -Wert von 1 berechnet wurden und die tatsächlichen kreuzkorrelierten Ordnungsparameter deutlich darunter liegen. Eine weitere mögliche Fehlerquelle liegt darin, dass für die theoretische Berechnung der $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ -Raten isotrope Rotationsdiffusion angenommen wurde. Vorhergehende Studien an der 14mer-RNA [168, 169] weisen jedoch auf einen leicht anisotropen Diffusionstensor mit einer Anisotropie D_{aniso} zwischen 1.35 [169] und 1.47 [168] hin.

Tabelle 4-7 $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ -Raten bestimmt über das 3D- Γ -HCCCH-Experiment an einer cUUCGg-tetraloop-14mer-RNA-Probe bei einer Temperatur von 298 K.

| Nukleotid | $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ [Hz] |
|-----------|---------------------------------------|
| G1 | |
| G2 | 5.94 |
| C3 | |
| A4 | 6.82 |
| C5 | 6.48 |
| U6 | 7.55 |
| U7 | 8.85 |
| C8 | 6.10 |
| G9 | 17.82 |
| G10 | |
| U11 | 7.54 |
| G12 | 6.45 |
| C13 | 7.12 |
| C14 | 9.06 |

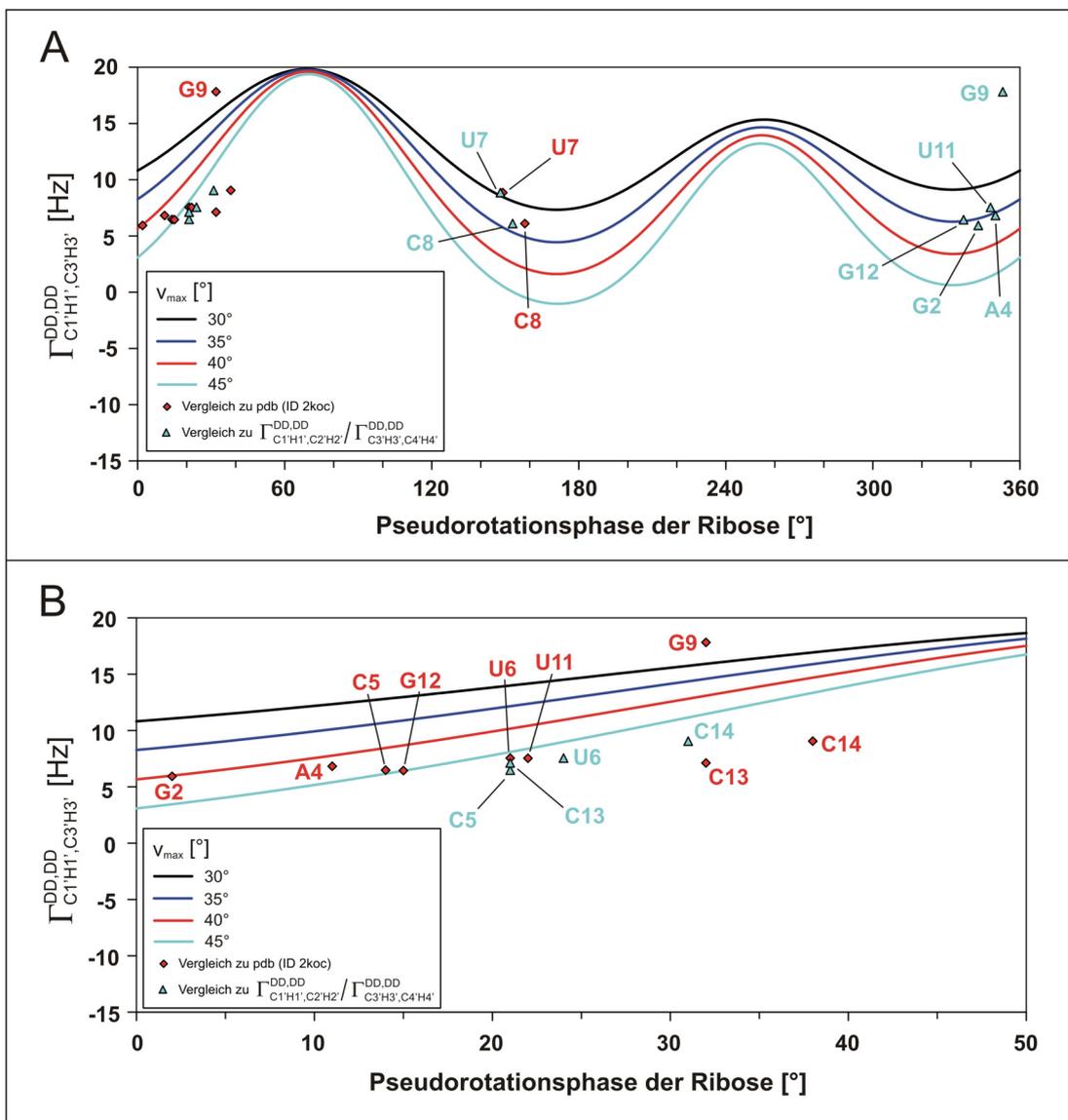


Abbildung 4.19 (A) $\Gamma_{C1'H1',C3'H3}^{DD,DD}(P)$ dargestellt für verschiedene v_{max} -Werte von 30°(schwarz), 35° (blau), 40° (rot) und 45° (hellblau). Die Rotationskorrelationszeit wurde auf $\tau_c = 2.31$ ns gesetzt. Zusätzlich dazu sind die experimentellen $\Gamma_{C1'H1',C3'H3}^{DD,DD}$ -Werte der cUUCGg-tetraloop-14mer-RNA gegen die Referenzwinkel (rote Romben) der NMR-Struktur [195] (pdb-ID 2koc) sowie gegen die Referenzwinkel, die aus der Analyse der $\Gamma_{C1'H1',C2'H2}^{DD,DD} / \Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD}$ -Verhältnisse stammen (hellblaue Dreiecke), aufgetragen. **(B)** Ausschnitt aus Abbildung (B) für P-Werte zwischen 0°-50°. Für die in (A) und (B) dargestellten Kurven wurde für die kreuzkorrelierten Ordnungsparameter jeweils der Wert 1 angenommen.

4.2.5 Fazit

Mit dem Γ -HCCCH-Experiment ist es gelungen, eine neue NMR-Pulssequenz zu entwickeln, durch die es möglich wird die kreuzkorrelierten $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ -Raten in ^{13}C -markierten RNA-Molekülen zu bestimmen. Zusätzlich dazu wurden die analytischen $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}(P, \nu^{\max})$ -, $\Gamma_{C2'H2',C4'H4'}^{DD,DD}(P, \nu^{\max})$ - und $\Gamma_{C1'H1',C4'H4'}^{DD,DD}(P, \nu^{\max})$ -Abhängigkeiten mathematisch hergeleitet. Mit Hilfe der $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}(P, \nu^{\max})$ -Beziehung ließ sich eine Analyse der an der cUUCGg-tetraloop-14mer-RNA bestimmten $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ -Raten durchführen, die unter Anwendung des neu entwickelten Γ -HCCCH-Experiments ermittelt werden konnten. Die Analyse der $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ -Raten ergab, dass die neue Methode zu Ergebnissen führt, die abgesehen von einigen erklärbaren geringfügigen Abweichungen im Einklang mit den Ribosekonformationen der 14mer-Struktur sowie der aus $\Gamma_{C1'H1',C2'H2'}^{DD,DD} / \Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD}$ -Verhältnissen bestimmten P-Werten steht. Die neue Methode liefert folglich zusätzliche Informationen, um die Konformationen (P, ν^{\max}) und Dynamiken ($(S_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD})^2$) der Riboseeinheiten in RNA-Molekülen genauer beschreiben zu können.

5 3D-HNHC: Ein Tripelresonanzexperiment für die Korrelation der H2-, N1(N3)- und C2-Resonanzen in Adenin-Nukleobasen ¹³C-, ¹⁵N-markierter RNA-Oligonukleotide

5.1 Einleitung

Die Verfügbarkeit isotope markierter RNA-Oligonukleotide [219-222] macht aus der NMR-Spektroskopie ein wertvolles Werkzeug zur Bestimmung von Struktur und Dynamik von RNA-Molekülen bis zu einer Größe von 100 Nukleotiden [14-16, 192, 223]. Heteronukleare NMR-Experimente ermöglichen die Resonanzzuordnung der NMR-aktiven ¹H-, ¹³C-, ¹⁵N- und ³¹P-Kerne. Die Zuordnung dieser Resonanzen ist die Voraussetzung für weitergehende Studien der Struktur und Dynamik von RNAs. Generell benutzen die meisten RNA-Zuordnungsexperimente große heteronukleare skalare Kopplungen, um über die chemischen Bindungen eine Korrelation der entsprechenden Kerne herzustellen. Allerdings sind in einigen Fällen diese skalaren Kopplungen zu klein und die transversale Relaxation besonders in den Nukleobasen ist zu schnell, so dass NOE-basierte Zuordnungsstrategien das Repertoire an nützlichen NMR-Zuordnungsexperimenten ergänzen.

Normalerweise beginnt die Resonanzzuordnung von RNAs mit einer NOE-basierten Korrelation der Iminoresonanzen. Diese Resonanzen bieten den Vorteil einer charakteristischerweise hohen Dispersion der chemischen Verschiebung in der ¹H-Dimension. Hinzu kommt, dass die Anzahl der Signale vergleichsweise klein ist, da nur die Iminogruppen, die sich in einer Wasserstoffbrücke befinden, ein NMR-Signal zeigen. Ausgehend von den Iminosignalen wird die Zuordnung auf die nicht austauschenden aromatischen Protonen und von dort aus weiter auf die H1'-Resonanzen der Ribosereste übertragen [14-16].

Die Zuordnung der Adenin- und Cytosin-Nukleobasen, die keine Iminogruppen besitzen, ist schwieriger. Hierfür muss eine Korrelation über das Basenpaar,

ausgehend von den Iminoresonanzen der Guanin- und Uracil-Nukleobasen, erfolgen. Die Zuordnung der H2-Protonen in Adenin-Nukleobasen ^{13}C -, ^{15}N -markierter RNA erfolgt in der Regel über den starken NOE zwischen dem Uracil-H3- und dem Adenin-H2-Kern in einem AU-Basenpaar. Die Zuordnung des Adenin-N1-Kerns erhält man über das HNN-COSY-Experiment, in dem das H3-N3-Signal des Uracils mit der N1-Resonanz des Adenins korreliert wird [30]. Durch diese beiden Zuordnungsexperimente ist es schließlich möglich, das H2-N1-Resonanzpaar in der Adeninbase im ^2J - $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -HSQC eindeutig zuzuordnen. Die Konnektivität des Adenins innerhalb der Nukleobase wird am besten über das TROSY-*relayed*-HCCH-COSY-Experiment hergestellt [121]. Dieses Experiment erlaubt es, über die Korrelation zu den C4-, C5- und C6-Resonanzen die H2-C2-Signale den H8-C8-Signalen derselben Nukleobase zuzuordnen. Alternativ hierzu kann im Falle kleiner RNAs oder DNAs, bei denen spektrale Überlappung in der ^1H -Dimension nur selten auftritt, die Zuordnung auch über ein $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{13}\text{C}]$ -HMBC-Experiment [269] erfolgen.

Es ist erforderlich, die H2-N1-Resonanzen des ^2J - $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -HSQC-Experiments mit den C2-Resonanzen zu korrelieren. Diese Korrelation kann über ein $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{13}\text{C}]$ -HSQC erfolgen, solange die Signale in der ^1H -Dimension nicht überlappen. Um eine eventuell auftretende spektrale Überlappung aufzulösen, ist es notwendig, die H2-N1-Signale des ^2J - $[\text{}^1\text{H}, \text{}^{15}\text{N}]$ -HSQC-Experiments mit den C2-Resonanzen zu korrelieren. Eine solche Korrelation kann nicht über das HCN-Experiment [117] erfolgen, da die $^1\text{J}(\text{C2}, \text{N1}(3))$ -Kopplung kleiner als 1 Hz ist (siehe Abbildung 5.1) [249]. Deshalb wurde eine neue Pulssequenz entwickelt, die die H2-, C2- und N1(3)-Kerne in der Adeninbase über die großen $^2\text{J}(\text{H2}, \text{N1}(3))$ - und $^1\text{J}(\text{H2}, \text{C2})$ -Kopplungen miteinander korreliert (siehe Abbildung 5.1).

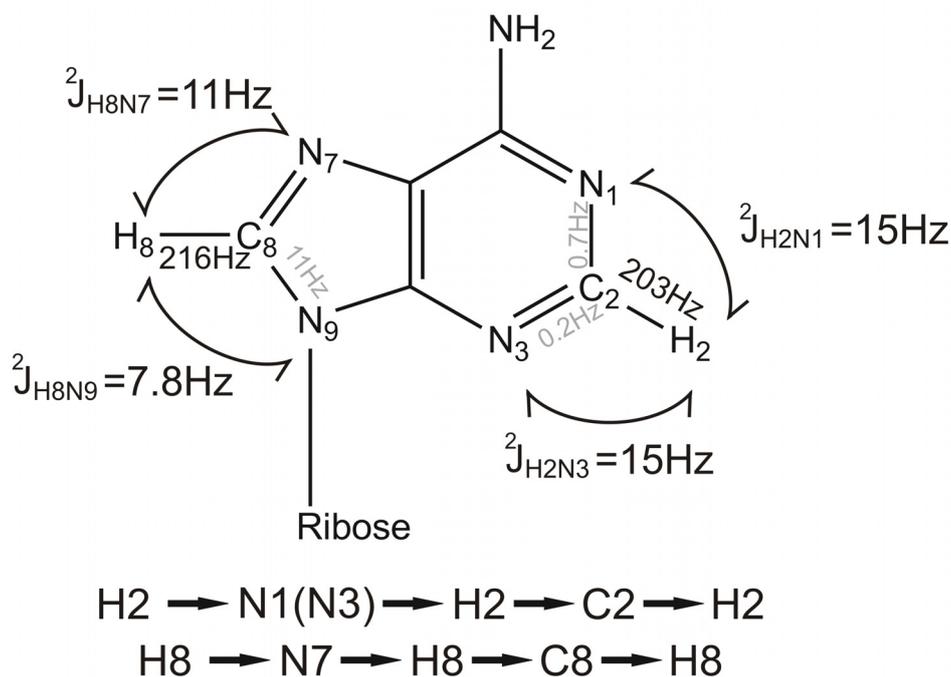


Abbildung 5.1 Schematische Darstellung der skalaren Kopplungen, die am Kohärenztransferweg des 3D- $(^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ -HNHC-Experiments in Adenin-Nukleobasen beteiligt sind [249]. Die $^1\text{J}(\text{C},\text{N})$ -Kopplungen, die im HCN-Experiment verwendet werden, sind in grau dargestellt [249]. Der schematische Kohärenztransferweg der 3D- $(^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ -HNHC Pulssequenz ist ebenfalls angegeben.

5.2 Ergebnisse und Diskussion

5.2.1 Pulssequenz

Das 3D- $(^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ -HNHC-Experiment (Abbildung 5.2) ist eine Kombination aus einem $[^1\text{H}, ^{13}\text{C}]$ -HSQC und einem $^2\text{J}-[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC. In diesem Experiment wird die Magnetisierung zweimal vor und zurück transferiert, vom H2 zum N1(3) und vom H2 zum C2 (Abbildung 5.1). Der Magnetisierungstransfer verläuft dabei ausschließlich über Einzelquantenkohärenzen. Neben der H2-C2-N1(3)-Korrelation bietet das Experiment ebenfalls die H8-C8-N7-Korrelation der Adenin- und Guaninbasen (Abbildung 5.1). Außerdem ist es möglich, über eine Anpassung der ^{15}N -Trägerfrequenz von 221 ppm auf 170 ppm ebenfalls die H8-C8-N9-Resonanzen miteinander zu korrelieren. Allerdings ist das herkömmliche HCN-Experiment [117] ebenfalls in der Lage diese Korrelation herzustellen. Aus diesem Grund wird in dem

neuen Experiment auf eine Anregung der N9-Kerne verzichtet. Dies geschieht über die Verwendung von harten Pulsen (Abbildung 5.2) an Stelle von adiabatischen Pulsen auf dem ^{15}N -Kanal und eine Verschiebung der ^{15}N -Trägerfrequenz auf 221 ppm. Dadurch wird es möglich, die spektrale Weite der ω_1 -Dimension auf 24 ppm zu reduzieren und das Experiment in kurzer Zeit mit hoher Auflösung durchzuführen. Das Rückfalten der H8-C8-N9-Signale in das Spektrum kann auf diese Weise verhindert werden.

Die Kohärenz $2\text{H}_{2z}\text{N}_1(3)_z$ zum Zeitpunkt **a** in der 3D- $(^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ -HNHC Pulssequenz (siehe Abbildung 5.2) wird über einen INEPT-Schritt erzeugt, indem die $^2\text{J}(\text{H}_2, \text{N}_1(\text{N}_3))$ -Kopplung (15Hz) entwickelt wird. Zwischen Zeitpunkt **a** und **b** wird die Kohärenz mit der ^{15}N -chemischen Verschiebung frequenzmarkiert. Im Refokussierungs-INEPT werden nun die $^2\text{J}(\text{H}_2, \text{N}_1(\text{N}_3))$ -Kopplung und die $^1\text{J}(\text{H}_2, \text{C}_2)$ -Kopplung entwickelt. Daraus resultiert der Operator $2\text{H}_{2z}\text{C}_{2z}\exp(i\omega_{\text{N}_1(3)}t_1)$ zum Zeitpunkt **c**. Zwischen Zeitpunkt **c** und **d** wird die C2-chemische Verschiebung entwickelt. Schließlich wird die $^1\text{J}(\text{H}_2, \text{C}_2)$ -Kopplung (200Hz) refokussiert, was zu der Inphase-Magnetisierung $\text{H}_{2x}\exp(i\omega_{\text{N}_1(3)}t_1)\exp(i\omega_{\text{C}_2}t_2)$ zum Zeitpunkt **e** führt.

Eine Produktoperatoranalyse des 3D- $(^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ -HNHC-Experiments liefert für die finale Transferamplitude unter Nichtberücksichtigung von R_1 - und R_2 -Relaxationseffekten:

$$\begin{aligned} & \text{H}_{2x} * \cos^2(\pi * ^2\text{J}_{\text{H}_2\text{N}_3} * \tau) * \sin^2(\pi * ^2\text{J}_{\text{H}_2\text{N}_1} * \tau) * \exp(i\omega_{\text{N}_1}t_1) * \exp(i\omega_{\text{C}_2}t_2) * \exp(i\omega_{\text{H}_2}t_2) \\ & + \text{H}_{2x} * \sin^2(\pi * ^2\text{J}_{\text{H}_2\text{N}_3} * \tau) * \cos^2(\pi * ^2\text{J}_{\text{H}_2\text{N}_1} * \tau) * \exp(i\omega_{\text{N}_3}t_1) * \exp(i\omega_{\text{C}_2}t_2) * \exp(i\omega_{\text{H}_2}t_2) \end{aligned}$$

Wenn man Relaxationseffekte vernachlässigt, erreicht man für das Experiment die optimale Sensitivität über das Setzen der Zeitspanne τ auf 16 ms ($1/4 * ^2\text{J}_{\text{H}_2\text{N}_1(3)}$). Allerdings muss für größere RNA-Moleküle, die hohe R_2 -Raten auf den H2-Protonen aufweisen, die Zeitspanne τ entsprechend verkürzt werden, um eine optimale Sensitivität zu erreichen. Da im Allgemeinen die genauen H2-Relaxationszeiten nicht bekannt sind, muss die Zeitspanne τ unter den gegebenen Messbedingungen (B_0 -Feld, Temperatur) optimiert werden. Die Pulssequenz in Abbildung 5.2

beinhaltet ein *Soft Watergate* Element zur Wasserunterdrückung [109], so dass die Pulssequenz auch auf H₂O-Proben angewandt werden kann. Obwohl die Pulssequenz auch auf D₂O-Proben anwendbar ist, wurden alle Gradienten und Wasser-*Flipback*-Pulse an einer H₂O-Probe optimiert, so dass die Möglichkeit besteht, die wichtigen Experimente 2D-NOESY, HNN-COSY, 3D-HNHC und TROSY-*relayed*-HCCH-COSY an einer Probe zu messen. Zusätzlich zu der *Soft Watergate* Version wurde eine *echo/antiecho sensitivity enhanced* Version (siehe Abbildung 5.3) [260] und eine *echo/antiecho* TROSY-Version (siehe Abbildung 5.4) [270] der 3D-(¹⁵N,¹³C,¹H)-HNHC Pulssequenz entwickelt. Im Falle der 36mer Test-RNA (4U-hp2-wt) ist die TROSY-Variante um einen Faktor 2 unempfindlicher. Allerdings weisen die Signale im Besonderen in der ¹³C-Dimension kleinere Linienbreiten auf. Alle Softpulse, die auf die Wasserfrequenz eingestrahlt werden (kleine graue Semiellipsen, siehe Abbildung 5.2, Abbildung 5.3, Abbildung 5.4), wurden optimiert, um die Intensität des Wassersignals zu unterdrücken. Die Softpulse sind immer so gesetzt, dass die Wassermagnetisierung in z-Richtung gehalten wird. Die Gradienten in der Pulssequenz haben die Aufgabe, Artefakte zu eliminieren und *Radiation Damping* des Wassersignals während der Zeiten zu unterdrücken, zu denen sich die Wassermagnetisierung entweder in der Transversalen oder entlang in -z befindet. Während der Entwicklungsperioden der chemischen Verschiebung befindet sich die Wassermagnetisierung für die Zeiten $t_1/2$ und $t_2/2$ in (-z)-Richtung. Deshalb werden während der chemischen Verschiebungsentwicklung t_1 und t_2 bipolare Gradienten [271] eingesetzt, um *Radiation Damping* des Wassersignals zu unterdrücken.

Es wurde außerdem die Möglichkeit untersucht, die erwünschten Korrelationen zu erhalten, indem man Doppel- und Nullquantenkohärenzen (DQ/ZQ) wie zum Beispiel $4H_zN1(3)^{+/-}C2^{+/-}$ und $4H_zN1(3)^{+/-}C2^{-/+}$ erzeugt. In einem solchen Experiment könnten die Summen und Differenzen der N1(3)- und C2-chemischen Verschiebungen gleichzeitig entwickelt werden. Dieses Experiment wäre demnach um eine CH-INEPT-Transferperiode kürzer als die von uns vorgezogene Einzelquantenversion des Experiments. Das DQ/ZQ-Experiment würde allerdings eine besondere Prozessierung der aufgenommenen Daten erfordern. Außerdem müsste der Phasenzyklus länger sein, um die Doppelquantenkohärenzen von den

Nullquantenkohärenzen zu trennen. Ein längerer Phasenzyklus wiederum erlaubt es nicht, den gesamten dreidimensionalen Frequenzraum in ausreichender Auflösung abzutasten. Da die Relaxationsverluste während einer CH-INEPT-Transferperiode relativ gering sind und die Pulssequenz ausreichend sensitiv ist, um schon in kurzer Zeit genügend Signal zu generieren, wurde der Einzelquantenversion der Vorzug gegeben.

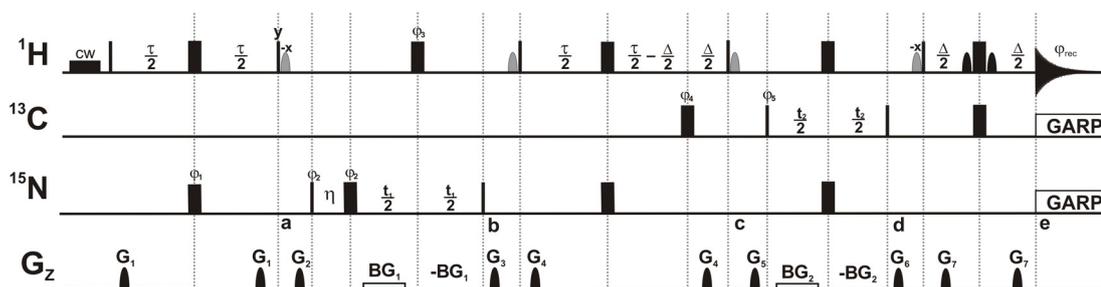


Abbildung 5.2 Pulssequenz des 3D-(^{15}N , ^{13}C , ^1H)-HNHC-Experiments in der Version mit *Soft Watergate* Wasserunterdrückung [109]. Schmale und breite gefüllte Rechtecke entsprechen 90° - und 180° -Pulsen, die mit einer RF-Feldstärke von 25.5 kHz (^1H), 19.5 kHz (^{13}C) und 6.95 kHz (^{15}N) angewendet werden. Gradienten (G_1 - G_7) sind als schwarze gefüllte Semiellipsen dargestellt. Bipolare Gradienten (BG_1 , BG_2) [271] sind als ungefüllte schwarze Rechtecke abgebildet. Die generelle Pulsphase ist x, falls nicht anders angegeben. Die Pulssequenz wurde an einem Bruker Spektrometer mit der für Bruker typischen Phasenomenklatur [257] optimiert. Das breite gefüllte Rechteck zu Beginn der Pulssequenz repräsentiert einen optionalen Sättigungspuls auf die Wasserresonanz. Die festen Zeitspannen werden wie folgt gesetzt: $\Delta = 2.5 \text{ ms}$ ($1/(2 \cdot ^1J_{\text{H}2\text{C}2})$), $\tau = 16 \text{ ms}$ ($1/(4 \cdot ^2J_{\text{H}2\text{N}(3)})$), $\eta = 20.4 \mu\text{s}$ (Länge des 180° -Pulses auf dem ^1H -Kanal + $t_1(0) = 26.4 \mu\text{s}$). Die Protonenträgerfrequenz wird auf die Wasserresonanz (4.7 ppm) gesetzt. Die Kohlenstoffträgerfrequenz wird auf 144 ppm (Mitte zwischen C2 und C8) und die Stickstoffträgerfrequenz auf 221 ppm (Mitte zwischen N1, N3 und N7) gesetzt. Bei einer magnetischen Feldstärke von 700 MHz werden bandselektive Pulse folgendermaßen gesetzt: 90° -Rechteckpuls (kleine graue Semiellipse, Wasser-*Flipback*-Puls) 1.5 ms, 90° -Rechteckpuls (kleine schwarze Semiellipse, *Soft Watergate* Wasserunterdrückung) 0.85 ms. Es wird asynchrone GARP-Entkopplung [110] auf dem ^{13}C - und dem ^{15}N -Kanal verwendet, um heteronukleare skalare Kopplungen während der Akquisition zu unterdrücken. Die Amplitude der gepulsten Gradienten G_1 - G_7 ist sinusförmig. G_1 - G_6 haben eine Länge von 1 ms und G_7 eine Länge von 200 μs . Bei allen gepulsten Gradienten handelt es sich um Gradienten in z-Richtung. Die verwendeten Gradienten haben folgende Stärken: G_1 : 41%, G_2 : 7%, G_3 : 11%, G_4 : %, G_5 : 23%, G_6 : 29%, G_7 : 85%. 100% Gradientenstärke entsprechen 55 Gauss/cm. Die gepulsten bipolaren Gradienten BG_1 und BG_2 [271] werden in z-Richtung angewendet, besitzen rechteckige Amplituden und Längen von $t_1/2$ (BG_1) beziehungsweise $t_2/2$ (BG_2). Die gepulsten bipolaren Gradienten haben die Stärken BG_1 : 2%, BG_2 : 3%. Phasenzyklus: $\phi_1 = x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_4 = x$; $\phi_5 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_6 = x$; $\phi_{\text{rec}} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$. ϕ_1 und ϕ_2 werden entsprechend der States-TPPI-Methode [261] für die Quadraturdetektion in der $^{15}\text{N}(\omega_1)$ -Dimension und ϕ_4 und ϕ_5 ebenfalls entsprechend der States-TPPI-Methode [261] für die Quadraturdetektion in der $^{13}\text{C}(\omega_2)$ -Dimension inkrementiert.

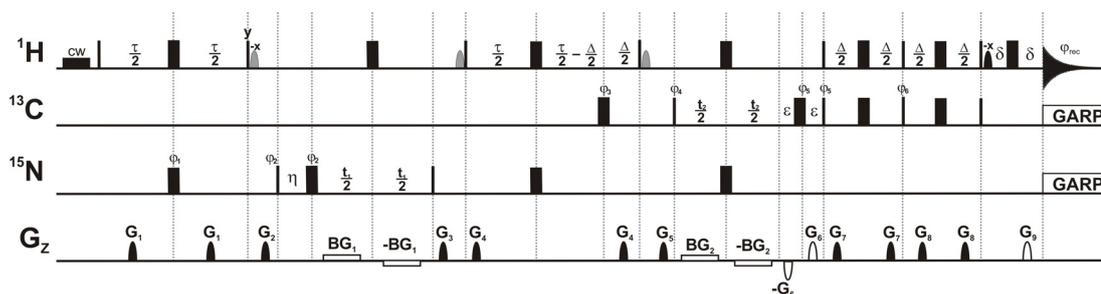


Abbildung 5.3 Pulssequenz des 3D-(^{15}N , ^{13}C , ^1H)-HNHC-Experiments in der *echo/antiecho sensitivity enhanced* Version [260]. Schmale und breite gefüllte Rechtecke entsprechen 90° - und 180° -Pulsen, die mit einer RF-Feldstärke von 25.5 kHz (^1H), 19.5 kHz (^{13}C) und 6.95 kHz (^{15}N) angewendet werden. Gradienten (G_1 - G_9) sind als schwarze gefüllte Semiellipsen dargestellt. Bipolare Gradienten (BG_1 , BG_2) [271] sind als ungefüllte schwarze Rechtecke abgebildet. Die generelle Pulsphase ist x , falls nicht anders angegeben. Die Pulssequenz wurde an einem Bruker Spektrometer mit der für Bruker typischen Phasennomenklatur [257] optimiert. Das breite gefüllte Rechteck zu Beginn der Pulssequenz repräsentiert einen optionalen Sättigungspuls auf die Wasserresonanz. Die festen Zeitspannen werden wie folgt gesetzt: $\Delta = 2.5 \text{ ms}$ ($1/(2 \cdot J_{\text{H}_2\text{C}_2})$), $\tau = 16 \text{ ms}$ ($1/(4 \cdot J_{\text{H}_2\text{N}_1(3)})$), $\eta = 20.4 \mu\text{s}$ (Länge des 180° -Pulses auf dem ^1H -Kanal + $t_1(0) = 26.4 \mu\text{s}$). Die Protonenträgerfrequenz wird auf die Wasserresonanz (4.7 ppm) gesetzt. Die Kohlenstoff-trägerfrequenz wird auf 144 ppm (Mitte zwischen C2 und C8) und die Stickstoffträgerfrequenz auf 221 ppm (Mitte zwischen N1, N3 und N7) gesetzt. Bei einer magnetischen Feldstärke von 700 MHz werden bandselektive Pulse folgendermaßen gesetzt: 90° -Rechteckpuls (kleine graue Semiellipse, Wasser-*Flipback*-Puls) 1.5 ms, 90° Rechteckpuls (kleine schwarze Semiellipse, Wasser-*Flipback*-Puls) 1 ms. Es wird asynchrone GARP-Entkopplung [110] auf dem ^{13}C - und dem ^{15}N -Kanal verwendet, um heteronukleare skalare Kopplungen während der Akquisition zu unterdrücken. Die Amplitude der gepulsten Gradienten G_1 - G_9 ist sinusförmig. G_1 - G_9 haben eine Länge von 1 ms. Bei allen gepulsten Gradienten handelt es sich um Gradienten in z -Richtung. Die verwendeten Gradienten haben folgende Stärken: G_1 : 41%, G_2 : 7%, G_3 : 11%, G_4 : 53%, G_5 : 23%, G_6 : -40%, G_7 : 37%, G_8 : 47%, G_9 : 20.1%, 100% Gradientenstärke entsprechen 55 Gauss/cm. Die gepulsten bipolaren Gradienten BG_1 und BG_2 [271] werden in z -Richtung angewendet, besitzen rechteckige Amplituden und Längen von $t_1/2$ (BG_1) beziehungsweise $t_2/2$ (BG_2). Die gepulsten bipolaren Gradienten haben die Stärken BG_1 : 2%, BG_2 : 3%. Phasenzyklus: $\phi_1 = x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = x$; $\phi_4 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_5 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_6 = 4(y), 4(-y)$; $\phi_{\text{rec}} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x$. ϕ_1 und ϕ_2 werden entsprechend der States-TPPI-Methode für die Quadraturdetektion in der $^{15}\text{N}(\omega_1)$ -Dimension inkrementiert [261]. *Echo/antiecho sensitivity enhancement* [260] wird für die Quadraturdetektion in der $^{13}\text{C}(\omega_2)$ -Dimension verwendet. Echo/Antiecho-Kohärenzpfade werden separat aufgenommen, indem man ϕ_6 zusammen mit G_6 für jedes t_2 -Inkrement invertiert. Zusätzlich dazu werden mit jedem t_2 -Inkrement die Phasen ϕ_3 , ϕ_4 und ϕ_{rec} invertiert.

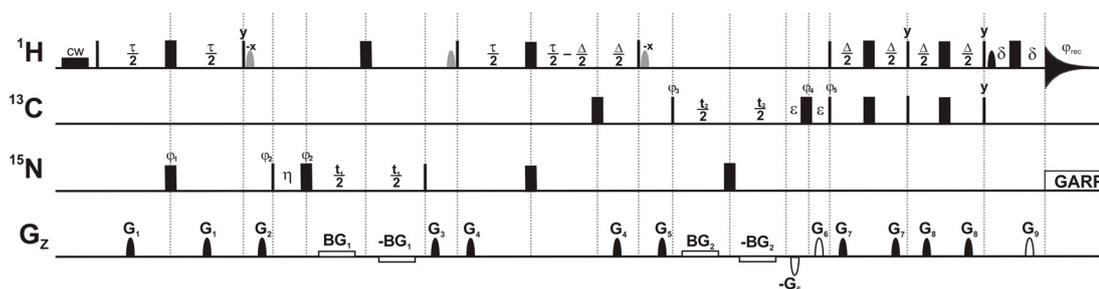


Abbildung 5.4 Pulssequenz des 3D-(^{15}N , ^{13}C , ^1H)-HNHC-Experiments in der *echo/antiecho* TROSY-Version [270]. Schmale und breite gefüllte Rechtecke entsprechen 90° - und 180° -Pulsen, die mit einer RF-Feldstärke von 25.5 kHz (^1H), 19.5 kHz (^{13}C) und 6.95 kHz (^{15}N) angewendet werden. Gradienten (G_1 - G_9) sind als schwarze gefüllte Semiellipsen dargestellt. Bipolare Gradienten (BG_1 , BG_2) [271] sind als ungefüllte schwarze Rechtecke abgebildet. Die generelle Pulsphase ist x, falls nicht anders angegeben. Die Pulssequenz wurde an einem Bruker Spektrometer mit der für Bruker typischen Phasenomenklatur [257] optimiert. Das breite gefüllte Rechteck zu Beginn der Pulssequenz repräsentiert einen optionalen Sättigungspuls auf die Wasserresonanz. Die festen Zeitspannen werden wie folgt gesetzt: $\Delta = 2.5$ ms ($1/(2 \cdot ^1J_{\text{H}_2\text{C}_2})$), $\tau = 16$ ms ($1/(4 \cdot ^2J_{\text{H}_2\text{N}_1(3)})$), $\eta = 20.4$ μs (Länge des 180° -Pulses auf dem ^1H -Kanal + $t_1(0) = 26.4$ μs). Die Protonenträgerfrequenz wird auf die Wasserresonanz (4.7 ppm) gesetzt. Die Kohlenstoff-trägerfrequenz wird auf 144 ppm (Mitte zwischen C2 und C8) und die Stickstoffträgerfrequenz auf 221 ppm (Mitte zwischen N1, N3 und N7) gesetzt. Bei einer magnetischen Feldstärke von 700 MHz werden bandselektive Pulse folgendermaßen gesetzt: 90° -Rechteckpuls (kleine graue Semiellipse, Wasser-*Flipback*-Puls) 1.5 ms, 90° -Rechteckpuls (kleine schwarze Semiellipse, Wasser-*Flipback*-Puls) 1 ms. Es wird asynchrone GARP-Entkopplung [110] auf dem ^{15}N -Kanal verwendet, um heteronukleare skalare Kopplungen während der Akquisition zu unterdrücken. Die Amplitude der gepulsten Gradienten G_1 - G_9 ist sinusförmig. G_1 - G_9 haben eine Länge von 1 ms. Bei allen gepulsten Gradienten handelt es sich um Gradienten in z-Richtung. Die verwendeten Gradienten haben folgende Stärken: G_1 : 41%, G_2 : 7%, G_3 : 11%, G_4 : 53%, G_5 : 23%, G_6 : -40%, G_7 : 37%, G_8 : 47%, G_9 : 20.1%, 100% Gradientenstärke entsprechen 55 Gauss/cm. Die gepulsten bipolaren Gradienten BG_1 und BG_2 [271] werden in z-Richtung angewendet, besitzen rechteckige Amplituden und Längen von $t_1/2$ (BG_1) beziehungsweise $t_2/2$ (BG_2). Die gepulsten bipolaren Gradienten haben die Stärken BG_1 : 2%, BG_2 : 3%. Phasenzyklus: $\phi_1 = x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_4 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_5 = x$; $\phi_{\text{rec}} = x, -x, -x, x$. ϕ_1 und ϕ_2 werden entsprechend der States-TPPI-Methode [261] für die Quadraturdetektion in der $^{15}\text{N}(\omega_1)$ -Dimension inkrementiert. Echo/Antiecho-Gradientenselektion [123, 260] wird für die Selektion der TROSY-Komponente und die Quadraturdetektion in der $^{13}\text{C}(\omega_2)$ -Dimension verwendet. Echo/Antiecho-Kohärenzpfade werden separat aufgenommen, indem man ϕ_5 zusammen mit G_6 für jedes t_2 -Inkrement invertiert. Zusätzlich dazu werden mit jedem t_2 -Inkrement die Phasen ϕ_3 und ϕ_{rec} invertiert.

5.2.2 Anwendung des 3D-HNHC-Experiments

Die neue Pulssequenz wurde an einer 0.7 mM ^{13}C -, ^{15}N -, Adenosin-, Cytidinmarkierten 36mer-RNA-Probe (Abbildung 5.5B) (D_2O -Puffer) getestet. Die Wasserunterdrückung wurde an einer anderen Probe optimiert. Ausschnitte aus dem 3D- $(^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ -HNHC-Spektrum sind in Abbildung 5.5A gezeigt. Jeder Ausschnitt zeigt zwei Signale, welche die H2-C2-N1- und H2-C2-N3-Korrelationen repräsentieren. Abbildung 5.5C zeigt im Vergleich dazu ein ^2J - $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum, das unter den gleichen Bedingungen wie das 3D- $(^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ -HNHC-Spektrum aufgenommen wurde. Ein Vergleich von Abbildung 5.5A und Abbildung 5.5C zeigt, dass alle Signale aus dem ^2J - $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum auch im 3D- $(^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ -HNHC-Spektrum vorhanden sind. Folglich ist das neue Experiment bei mittelgroßen RNA-Oligonukleotiden erfolgreich anwendbar. Zieht man das hohe Signal/Rausch-Verhältnis in Betracht, ist außerdem zu erwarten, dass das Experiment auch auf noch größere RNA-Moleküle erfolgreich anwendbar ist. Des Weiteren zeigt Abbildung 5.5, dass in der Protonendimension überlappende Signale, vor allem A22/A16 und A29/A7 mit dem 3D- $(^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}, ^1\text{H})$ -HNHC-Experiment erfolgreich aufgelöst und auf diese Weise Zuordnungsmehrdeutigkeiten beseitigt werden können.

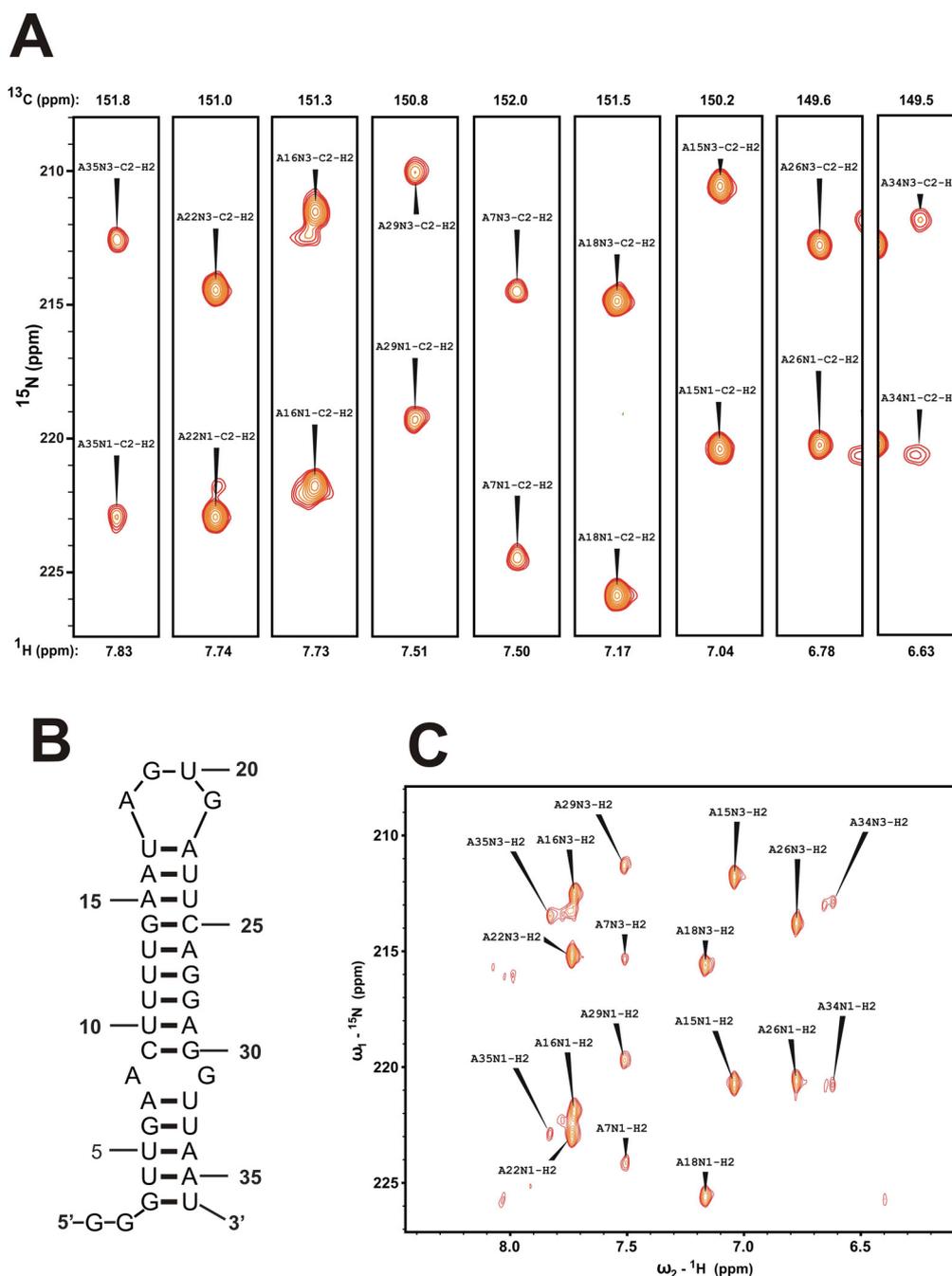


Abbildung 5.5 (A) Spektrum des 3D-HNHC-Experiments in der Streifenarstellung mit der $^{13}\text{C}(\omega_2)$ -Dimension senkrecht zur Papierebene. Das Spektrum wurde in 41 Stunden bei einer Temperatur von $T = 20^\circ\text{C}$ an einem Bruker 700-MHz-Spektrometer aufgenommen. Das Spektrometer war mit einem 5 mm TXI Kryoprobekopf ausgestattet. Das Spektrum wurde mit $88(^{15}\text{N}) \cdot 148(^{13}\text{C})$ Inkrementen aufgenommen. Für jedes Inkrement wurde über 8 FIDs summiert. Die spektralen Weiten wurden auf 24 ppm (^{15}N), 18 ppm (^{13}C) und 16 ppm (^1H) gesetzt. Das Spektrum wurde an einer selektiv Adenosin-, Cytidin-, ^{13}C -, ^{15}N -markierten Probe mit einer Konzentration von 0.7 mM gelöst in D_2O -Puffer aufgenommen. (B) Sekundärstruktur der 36mer *hairpin 2* RNA aus der transkribierten 5'-UTR (untranslatierte Region) des *Salmonella agsA* Gens [91]. (C) Ausschnitt aus dem $2\text{D-}^2\text{J-}[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -

HSQC-Spektrum des in (B) dargestellten RNA-Moleküls. Das Spektrum wurde in 2 Stunden mit 512 Inkrementen mit jeweils 8 FIDs unter den gleichen Bedingungen wie das 3D-HNHC-Experiment aufgenommen. Die spektralen Weiten wurden auf 140 ppm (^{15}N) und 16 ppm (^1H) gesetzt. Die ^{15}N -, ^{13}C - und ^1H -Trägerfrequenzen wurden auf 210 ppm (^{15}N), 144 ppm (^{13}C) und 4.7 ppm gesetzt. Während der Akquisition wurde auf dem ^{13}C -Kanal mit einer GARP-Pulsfolge breitbandentkoppelt.

5.3 Fazit

Es konnte eine neue NMR-spektroskopische Methode etabliert werden, die es erlaubt, die H2-C2-N1- und H2-C2-N3-Resonanzen von Adenin-Nukleobasen in ^{13}C , ^{15}N -markierten Oligonukleotiden zu korrelieren. Die neue Methode vereinfacht die Zuordnung von Adenin-Nukleobasen, indem sie Zuordnungsmehrdeutigkeiten aufgrund von degenerierten Protonenresonanzen auflöst. Dies ist besonders für die Zuordnung größerer RNA-Moleküle von Vorteil. Durch die Korrelation der H2-N1-Resonanzen mit den C2-Resonanzen bildet die neue Methode das fehlende Glied, um die Imino-H3-Resonanzen der Uracil-Nukleobasen über das AU-Basenpaar hinweg mit den H2-Resonanzen und daraufhin mit den H8-Resonanzen der Adenin-Nukleobasen zu korrelieren.

6 Zusammenfassung

Die Genexpression in prokaryotischen Organismen unterliegt einer Vielzahl von Regulationsmechanismen, deren Aufgabe darin besteht, die Zelle an sich ändernde Umweltbedingungen anzupassen, um so das Überleben des prokaryotischen Organismus zu gewährleisten. Eine Reihe von Hitzeschock- und Virulenzgenen unterliegen temperaturabhängiger Regulation, mit dem Ziel, die Zelle an die sich ändernde Umgebung anzupassen. Die Messung der Temperatur erfolgt dabei über temperatursensitive RNA-Elemente, sogenannte RNA Thermometer, die sich üblicherweise in der 5'-untranslatierten Region der Gene befinden, die sie regulieren. Sie unterdrücken die Translationsinitiation, indem sie die Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz bei niedrigen Temperaturen über Basenpaarung blockieren und dadurch die Bindung des Ribosoms verhindern.

In Kapitel 2 der vorliegenden Arbeit wurde die thermodynamische Stabilität der temperatursensitiven Haarnadelschleife 2 des *Salmonella* FourU RNA-Thermometers über einen breiten Temperaturbereich analysiert. Freie Enthalpie-, Enthalpie- und Entropie-Werte für die Basenpaaröffnung der einzelnen Nukleobasen innerhalb der RNA wurden über die temperaturabhängige Messung von Iminoprotonen-Austauschraten mittels NMR-Spektroskopie bestimmt. Die Austauschraten wurden für die Wildtyp-RNA und die A8C-Mutante bestimmt und miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die Wildtyp-RNA durch das außergewöhnlich stabile Basenpaar G14-C25 stabilisiert wird. Dies konnte durch die Untersuchung der Entfaltung der destabilisierenden G14A-C25U-Doppelmutante verifiziert werden. Über CD-spektroskopische Untersuchungen konnte der globale Entfaltungsübergang der jeweiligen RNA analysiert werden. Das *mismatch*-Basenpaar innerhalb des Wildtyp-RNA-Thermometers (A8-G31) erwies sich als Ursache für die geringere Kooperativität des Entfaltungsübergangs der Wildtyp-RNA im Vergleich zur A8C-Mutante. Enthalpie- und Entropie-Werte für die Basenpaaröffnung einzelner Nukleotide sind für beide RNAs linear korreliert. Die Steigungen dieser Korrelationen stimmen mit den Schmelzpunkten der RNAs

überein, die über CD-Spektroskopie bestimmt wurden. Entfaltung der RNA tritt also genau dann auf, wenn alle Nukleotide gleiche thermodynamische Stabilitäten besitzen. Die Resultate sind mit einem Reißverschluss-Mechanismus für die RNA-Helix Entfaltung konsistent und erklärbar, in dem die Stapelinteraktionen der benachbarten Nukleobasen innerhalb der RNA-Helix verantwortlich für die beobachtete Kooperativität sind. Die Ergebnisse weisen auch auf die Wichtigkeit der RNA-Lösungsmittel-Interaktion für die Stabilität der RNA-Struktur hin. So konnten langreichweitige Wechselwirkungen der A8C-Mutation auf die Stabilität der G14-Nukleobase identifiziert werden, die möglicherweise über die Hydrathülle der RNA vermittelt werden. Schließlich konnte für das FourU-Motiv eine Mg^{2+} -Bindestelle identifiziert werden, die die temperaturabhängige Stabilität des RNA-Thermometers beeinflusst. Es besteht also die Möglichkeit, dass Änderungen der intrazellulären Mg^{2+} -Konzentration die Expression des *agsA*-Gens *in vivo* modulierend beeinflusst.

In Kapitel 3 dieser Arbeit wurden die dynamischen Eigenschaften des Phosphodiesterückgrats einer perdeuterierten cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA untersucht. Dazu wurden die Relaxationseigenschaften aller ^{31}P -Kerne dieser RNA bei magnetischen Feldstärken von 300, 600 und 900 MHz untersucht. Dipolare Relaxationsbeiträge konnten unterdrückt werden, indem eine perdeuterierte RNA-Probe in einem D_2O -Puffer verwendet wurde. Um die ^{31}P -Relaxationsdaten (R_1 , R_2) interpretieren zu können, wurde zusätzlich mittels Festkörper-NMR die Chemische Verschiebungsanisotropie (CSA) der ^{31}P -Kerne des Phosphodiesterückgrats bestimmt. Die Messungen wurden bei verschiedenen Salzkonzentrationen und unter unterschiedlichen Hydratationsbedingungen durchgeführt. Aus den Daten konnte ein ^{31}P -CSA-Wert von 178.5 ppm im statischen Zustand ($S^2 = 1$) bestimmt werden. Auf der Grundlage der durchgeführten R_1 - und R_2 -Messungen wurde eine Modelfree-Analyse durchgeführt, um Informationen über die schnellen Dynamiken des Phosphodiesterückgrats zu erhalten. Die Resultate zeigen, dass die Dynamiken des Phosphodiesterückgrats auf der Subnanosekundenzeitskala stärker ausgeprägt sind als die Dynamiken der Ribofuranosylreste und der Nukleobasen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Dynamik einer individuellen Phosphatgruppe zu der jeweiligen 5'-benachbarten Nukleobase korreliert ist.

In Kapitel 4 dieser Arbeit wird die Entwicklung neuer Methoden beschrieben, mit denen Torsionswinkelinformation aus der Analyse kreuzkorrelierte Relaxationsraten gewonnen werden können. Im ersten Teil des Kapitels wird die Entwicklung einer neuen NMR-Pulssequenz beschrieben, über die der glykosidische Torsionswinkel χ in ^{13}C , ^{15}N -markierten Oligonukleotiden bestimmt werden kann. Mit dem neuen quantitativen Γ -HCNCH-Experiment ist es möglich, die dipolaren kreuzkorrelierten Relaxationsraten $\Gamma_{C6H6,C1'H1'}^{DD,DD}$ (Pyrimidine) und $\Gamma_{C8H8,C1'H1'}^{DD,DD}$ (Purine) zu messen. Die kreuzkorrelierten Relaxationsraten wurden an einer ^{13}C , ^{15}N -markierten cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA bestimmt. Die aus den Raten extrahierten χ -Winkel wurden mit bereits vorhandener Strukturinformation verglichen. Sie stimmen bemerkenswert gut mit den Winkeln der Kristallstruktur des *tetraloops* überein. Zusätzlich wurde die neue Methode an einer größeren 30mer-RNA, dem „*Stemloop D*“ (SLD) aus dem Coxsackievirus-B3-Kleeblatt, getestet. Für die SLD-RNA wurde der Effekt von anisotroper Rotationsdiffusion auf die Relaxationsraten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die χ -Winkelbestimmung besonders für Nukleotide in der anti-Konformation sehr genau ist und die Methode eine eindeutige Unterscheidung von syn- und anti-Konformation zulässt.

Im zweiten Teil von Kapitel 4 wird die Entwicklung des Γ -HCCCH-Experiments beschrieben. Hierbei handelt es sich um eine neue NMR-Pulssequenz zur Messung der $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ -Rate in ^{13}C -markierten RNAs. Die Funktionsfähigkeit der neuen Methode wurde an einer cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA demonstriert. Zusätzlich dazu wurden die analytischen $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}(P, \nu^{\max})$ -, $\Gamma_{C1'H1',C4'H4'}^{DD,DD}(P, \nu^{\max})$ - und $\Gamma_{C2'H2',C4'H4'}^{DD,DD}(P, \nu^{\max})$ -Abhängigkeiten mathematisch hergeleitet. Die an der 14mer-RNA gemessenen $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}$ -Raten wurden mit Hilfe der $\Gamma_{C1'H1',C3'H3'}^{DD,DD}(P, \nu^{\max})$ -Beziehung analysiert. Die Ergebnisse für die Pseudorotationsphase P sind konsistent mit Referenzwinkeln aus der 14mer-NMR-Struktur und den bereits bekannten $\Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD} / \Gamma_{C3'H3',C4'H4'}^{DD,DD}$ -Ratenverhältnissen. Die neue Methode liefert demnach zusätzliche Informationen, um Konformation (P, ν^{\max}) und Dynamik

$((S_{C'H1',C3'H3'}^{DD,DD})^2)$ der Riboseresete in RNA-Molekülen genauer beschreiben zu können.

In Kapitel 5 dieser Arbeit wird die Entwicklung des 3D-HNHC-Experiments, einer neuen NMR-Pulssequenz, beschrieben. Dieses Experiment ermöglicht es, die H2-, C2- und N1-Resonanzen in Adenin-Nukleobasen ^{13}C , ^{15}N -markierter RNA-Oligonukleotide miteinander zu korrelieren. Die Funktionsfähigkeit der neuen Methode wurde an einer mittelgroßen, entsprechend markierten 36mer-RNA demonstriert. Die neue Methode vereinfacht die Zuordnung der Kerne der Adenin-Nukleobasen, da Zuordnungsmehrdeutigkeiten aufgrund überlappender Resonanzen in der ^1H -Dimension aufgelöst werden können. In Kombination mit dem TROSY-relayed-HCCH-COSY-Experiment liefert das neue 3D-HNHC-Experiment das fehlende Glied für die Zuordnung der Imino-H3-Resonanzen der Uracil-Nukleobasen über das AU-Basenpaar hinweg zu den H8-Resonanzen der Adenin-Nukleobasen.

Tabelle 7-2 Chemische Verschiebungen der zugeordneten ^1H - und ^{13}C -Kerne der Ribosereste des Phosphodiesterückgrats der 4U-hp2-wt RNA bestimmt bei einer Temperatur von 20°C. Die chemischen Verschiebungen wurden mit DSS referenziert.

| Nukleotid | C1' | C2' | C3' | C4' | C5' | H1' | H2' | H3' | H4' | H5' | H5'' |
|-----------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| U5 | 90,12 | 73,13 | | | | 5,735 | 4,573 | | | | |
| G6 | 90,65 | | | | | 5,657 | | | | | |
| A7 | 87,93 | 75,04 | 69,09 | 82,69 | | 5,903 | 4,298 | 4,342 | 4,254 | | |
| C9 | 90,16 | | 67,16 | 80,71 | | 5,742 | 3,926 | 4,199 | 4,115 | | |
| C9a | | 74,50 | | | | | 3,929 | | | | |
| C9b | | 74,83 | | | | | 4,013 | | | | |
| U10 | 91,15 | 72,38 | 69,20 | | | 5,512 | 4,696 | 4,427 | | | |
| U11 | 91,90 | 72,75 | | | | 5,422 | 4,281 | 4,441 | | | |
| U12 | 90,78 | 72,95 | 70,21 | 79,86 | 62,55 | 5,548 | 4,113 | 4,581 | 4,364 | 4,415 | 4,034 |
| U13 | 90,22 | 72,37 | | | | 5,512 | 4,602 | | | | |
| G14 | 89,95 | 72,68 | | | | 5,689 | 4,552 | | | | |
| A15 | 90,20 | 72,83 | 69,89 | | | 5,79 | 4,499 | 4,688 | | | |
| A16 | 89,94 | 73,05 | | | | 5,858 | 4,366 | 4,544 | | | |
| U17 | 89,99 | 72,90 | | | 101,31 | 5,4 | 4,365 | | | | |
| A18 | 90,14 | 72,84 | | | | 5,609 | 4,446 | 4,542 | | | |
| G19 | 86,76 | 71,97 | 75,65 | 82,81 | | 5,52 | 4,683 | 4,564 | 4,307 | 4,196 | 3,985 |
| U20 | 86,95 | 73,18 | 74,91 | 82,48 | 65,26 | 5,775 | 4,194 | 4,512 | 4,118 | 3,893 | 3,667 |
| G21 | 87,69 | 72,26 | 74,64 | 82,70 | 66,06 | 5,79 | 4,897 | 4,888 | 4,508 | 4,212 | |
| A22 | 88,09 | 72,28 | 72,94 | | | 5,936 | 4,804 | 4,637 | | | |
| U23 | 91,21 | 72,42 | 70,61 | 80,26 | 63,87 | 5,612 | 4,458 | 4,358 | 4,521 | 4,452 | 4,258 |
| U24 | 91,04 | 72,66 | 69,78 | | | 5,65 | 4,462 | 4,5 | | | |
| C25 | 91,09 | 72,66 | | | | 5,48 | 4,41 | | | | |
| A26 | 89,65 | 73,41 | 70,21 | | | 5,903 | 4,59 | 4,687 | | | |
| G27 | 90,20 | 72,68 | 70,77 | | | 5,605 | 4,548 | 4,189 | | | |
| G28 | 90,67 | 72,63 | 69,92 | 79,46 | | 5,705 | 4,74 | 4,453 | 4,465 | | |
| A29 | 90,56 | 72,77 | 70,34 | | | 5,873 | 4,593 | 4,748 | | | |
| G30 | 90,20 | | | | | 5,559 | | | | | |
| U33 | | 72,89 | | | | | | 4,661 | | | |
| U33a | 91,14 | | | | | 5,429 | 4,192 | | | | |
| U33b | 91,01 | | | | | 5,46 | 4,21 | | | | |
| A34 | | 72,84 | | | | | 4,546 | 4,745 | | | |
| A34a | 89,53 | | | | | 5,784 | | | | | |
| A34b | 89,68 | | | | | 5,777 | | | | | |
| A35 | 90,07 | | | | | 5,775 | 4,457 | | | | |
| U36a | 88,84 | 73,81 | | | | 5,888 | 4,284 | | | | |
| U36b | 88,36 | 72,90 | | | | 5,917 | 4,397 | | | | |
| U36c | 88,06 | | | | | 5,859 | 4,344 | | | | |
| U36d | 88,15 | | | | | 5,798 | 4,305 | | | | |
| U36e | 88,81 | 74,10 | | | | 5,766 | 4,146 | 4,218 | | | |

7.2 Akquisitionsparameter der NMR-Experimente

7.2.1 FourU RNA-Thermometer

Tabelle 7-3 Akquisitions- und Prozessierungsparameter der NMR-Experimente, die an der ^{15}N -markierten 4U-hp2-wt RNA-Probe aufgenommen wurden.

| Experiment | T^a | B_0^b | sw_1^c | sw_2^c | sw_3^c | ns^d | d_1^e | td_1^f | td_2^f | td_3^f | ω_{15N}^g | ω_{13C}^g | SI_1^h | SI_2^h | SI_3^h | i |
|--|---------|---------|----------|----------|----------|--------|---------|----------|----------|----------|------------------|------------------|----------|----------|----------|---------------------------------|
| $[^1\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC (Iminos) | 283 | 600 | 40 | 24 | - | 8 | 1,3 | 256 | 2048 | - | 153 | - | 1024 | 4096 | - | |
| $[^1\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC (Aminos) | 283 | 600 | 50 | 24 | - | 8 | 1,3 | 320 | 2048 | - | 84 | - | 1024 | 4096 | - | |
| 2D- $[^1\text{H}-^1\text{H}]$ -NOESY | 283 | 600 | 17 | 24 | - | 64 | 1,66 | 1024 | 2048 | - | 153 | - | 2048 | 4096 | - | d8=150ms; cnst19=7.5ppm |
| 3D- $[^1\text{H}-^{15}\text{N}]$ -NOESY-HSQC | 283 | 900 | 14 | 8 | 24 | 16 | 1,38 | 256 | 32 | 2048 | 160 | - | 512 | 128 | 4096 | d8=150ms |
| HNN-COSY | 283 | 600 | 105 | 22 | - | 80 | 1,1 | 640 | 2048 | - | 187,5 | - | 2048 | 8192 | - | cnst21=153ppm |
| Inversion Recovery- $[^1\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC | 278-323 | 600 | - | 26 | 22 | 2 | 6 | 18-22 | 120 | 2048 | 152 | - | - | 512 | 4096 | $\tau_m=2\text{ms}-4\text{sec}$ |
| $[^1\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC (Iminos) ^j | 283 | 600 | 30 | 22 | - | 4 | 1,3 | 128 | 2048 | - | 153 | - | 512 | 4096 | - | |
| 2D- $[^1\text{H}-^1\text{H}]$ -NOESY ^j | 283 | 600 | 15 | 22 | - | 128 | 1,7 | 896 | 2048 | - | 153 | - | 2048 | 4096 | - | |

^a Temperatur in K

^b magnetische Feldstärke angegeben als ^1H -Resonanzfrequenz [MHz]

^c spektrale Weite der ersten, zweiten bzw. dritten Dimension in ppm

^d Anzahl der Transienten pro Inkrement

^e Wartezeit zwischen den Transienten in sec

^f Anzahl der aufgenommenen Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimension

^g Offset der Frequenzen für ^{15}N und ^{13}C in ppm

^h Prozessierte Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimension

ⁱ zusätzlicher, für die jeweilige Pulssequenz spezifischer Parameter

^j in Anwesenheit von 5 mM $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$

Tabelle 7-4 Akquisitions- und Prozessierungsparameter der NMR-Experimente, die an der ¹⁵N-markierten 4U-hp2-A8C Mutanten RNA-Probe aufgenommen wurden.

| Experiment | T ^a | B ₀ ^b | sw ₁ ^c | sw ₂ ^c | sw ₃ ^c | ns ^d | d ₁ ^e | td ₁ ^f | td ₂ ^f | td ₃ ^f | ω _{15N} ^g | ω _{13C} ^g | SI ₁ ^h | SI ₂ ^h | SI ₃ ^h | i |
|---|----------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| [¹ H, ¹⁵ N]-HSQC (Iminos) | 283, 293 | 800 | 26 | 24 | - | 4 | 1,3 | 320 | 4096 | - | 153 | - | 2048 | 8192 | - | |
| [¹ H, ¹⁵ N]-HSQC (Aminos) | 283, 293 | 800 | 60 | 24 | - | 4 | 1,3 | 512 | 4096 | - | 90 | - | 2048 | 8192 | - | |
| 2D-[¹ H- ¹ H]-NOESY | 283, 293 | 800 | 15 | 22 | - | 128 | 1,35 | 1024 | 2048 | - | 153 | - | 2048 | 4096 | - | d8=150ms; cnst19=7.5ppm |
| HNN-COSY | 283, 293 | 800 | 120 | 24 | - | 16 | 1,3 | 1024 | 2048 | - | 187,5 | - | 2048 | 4096 | - | cnst21=153ppm |
| Inversion Recovery-[¹ H, ¹⁵ N]-HSQC ^j | 278-323 | 600 | - | 10 | 24 | 4 | 6 | 18-22 | 48 | 2048 | 144 | - | - | 256 | 4096 | τ _m =2ms-4sec |

^a Temperatur in K^b magnetische Feldstärke angegeben als ¹H-Resonanzfrequenz [MHz]^c spektrale Weite der ersten, zweiten bzw. dritten Dimension in ppm^d Anzahl der Transienten pro Inkrement^e Wartezeit zwischen den Transienten in sec^f Anzahl der aufgenommenen Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimension^g Offset der Frequenzen für ¹⁵N und ¹³C in ppm^h Prozessierte Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimensionⁱ zusätzlicher, für die jeweilige Pulssequenz spezifischer Parameter^j Spektrum ist gefaltet

Tabelle 7-5 Akquisitions- und Prozessierungsparameter der NMR-Experimente, die an der A,C-¹³C,¹⁵N-doppelt-markierten 4U-hp2-wt RNA-Probe aufgenommen wurden.

| Experiment | T ^a | B ₀ ^b | sw ₁ ^c | sw ₂ ^c | sw ₃ ^c | ns ^d | d ₁ ^e | td ₁ ^f | td ₂ ^f | td ₃ ^f | ω _{15N} ^g | ω _{13C} ^g | SI ₁ ^h | SI ₂ ^h | SI ₃ ^h | i |
|---|----------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| ² J-[¹ H, ¹⁵ N]-HSQC | 293 | 600 | 53 | 16 | - | 16 | 1,3 | 512 | 2048 | - | 210 | 144 | 2048 | 8192 | - | d26=12.5ms |
| [¹ H, ¹³ C]-RT-HSQC (Aromaten) | 293 | 600 | 30 | 14 | - | 12 | 1,5 | 512 | 2048 | - | - | 142 | 2048 | 4096 | - | - |
| [¹ H, ¹³ C]-CT-HSQC (Zucker) | 293 | 600 | 60 | 10 | - | 12 | 1,5 | 832 | 1024 | - | - | 80 | 4096 | 4096 | - | d23=12,5ms (1/(2J _{CC})) |
| 3D-[¹ H- ¹³ C]-NOESY-HSQC (Aromaten) | 293 | 800 | 7,4 | 18 | 10 | 8 | 1,0 | 208 | 120 | 1024 | 190 | 144 | 1024 | 512 | 2048 | d8=200ms |
| 3D-HCN-MQ [H1'] | 293 | 800 | 26 | 4,2 | 10 | 8 | 1,5 | 192 | 20 | 2048 | 161 | 89,4 | 1024 | 128 | 4096 | d22=30ms (1/(2J _{CN})) |
| 3D-HCN [H6/H8] | 293 | 600 | 22 | 7 | 10 | 8 | 1,3 | 144 | 48 | 1024 | 161 | 137,5 | 512 | 256 | 2048 | d22=13ms (1/(4J _{CN})) |
| H(CN)H | 293 | 600 | 6 | 12 | - | 512 | 1,5 | 160 | 1024 | - | 165 | 89 | 1024 | 4096 | - | d22=13ms; d26=10,5ms |
| 3D-TROSY-(H)CCH-COSY | 293 | 600 | 44 | 18 | 12 | 8 | 0,94 | 76 | 128 | 1024 | 150 | 144 | 512 | 512 | 2048 | cnst28 = 98 ppm |
| 3D-HC(C)H-COSY | 293 | 950 | 2,8 | 36 | 16 | 4 | 1,17 | 128 | 320 | 2048 | 160 | 76 | 256 | 512 | 4096 | |
| 3D-HNHC (Soft Watergate) | 293 | 700 | 24 | 18 | 16 | 8 | 1,23 | 88 | 148 | 1024 | 221 | 144 | 256 | 512 | 2048 | cnst4=35Hz |
| 3D-HNHC (gps) | 293 | 700 | 24 | 18 | 16 | 8 | 1,23 | 88 | 148 | 1024 | 221 | 144 | 256 | 512 | 2048 | cnst4=35Hz |
| 3D-HNHC (TROSY Echo/Antiecho) | 293 | 700 | 24 | 18 | 16 | 8 | 1,23 | 88 | 148 | 1024 | 221 | 144 | 256 | 512 | 2048 | cnst4=35Hz |

- ^a Temperatur in K
^b magnetische Feldstärke angegeben als ¹H-Resonanzfrequenz [MHz]
^c spektrale Weite der ersten, zweiten bzw. dritten Dimension in ppm
^d Anzahl der Transienten pro Inkrement
^e Wartezeit zwischen den Transienten in sec
^f Anzahl der aufgenommenen Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimension
^g Offset der Frequenzen für ¹⁵N und ¹³C in ppm
^h Prozessierte Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimension
ⁱ zusätzlicher, für die jeweilige Pulssequenz spezifischer Parameter

Tabelle 7-6 Akquisitions- und Prozessierungsparameter der NMR-Experimente, die an der U-¹³C, ¹⁵N-doppelt-markierten 4U-hp2-wt RNA-Probe aufgenommen wurden.

| Experiment | T ^a | B ₀ ^b | sw ₁ ^c | sw ₂ ^c | sw ₃ ^c | ns ^d | d ₁ ^e | td ₁ ^f | td ₂ ^f | td ₃ ^f | ω _{15N} ^g | ω _{13C} ^g | SI ₁ ^h | SI ₂ ^h | SI ₃ ^h | i |
|--|----------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| [¹ H, ¹³ C]-RT-HSQC (Aromaten) ^k | 293 | 700 | 8 | 14 | - | 2 | 1,3 | 128 | 2048 | - | 160 | 139,5 | 1024 | 8192 | - | |
| [¹ H, ¹³ C]-CT-HSQC (Zucker) ^k | 293 | 600 | 10 | 60 | - | 4 | 1,5 | 368 | 1024 | - | 153 | 80 | 2048 | 2048 | - | d23=12,5ms (1/(2J _{CC})) |
| 3D-[¹ H- ¹³ C]-NOESY-HSQC (Aromaten) ^k | 293 | 900 | 6,6 | 5 | 10 | 16 | 1,3 | 320 | 32 | 1024 | 160 | 139,5 | 1024 | 128 | 2048 | d8=200ms |
| 3D-HCN [H1'] ^k | 293 | 600 | 6 | 6 | 10 | 16 | 1,4 | 36 | 44 | 1024 | 145 | 89 | 256 | 256 | 2048 | d22=16ms (1/(4J _{CN})) |
| 3D-HCN [H6] ^k | 293 | 600 | 6 | 5,4 | 10 | 16 | 1,4 | 36 | 36 | 1024 | 145 | 139,5 | 256 | 256 | 2048 | d22=15ms (1/(4J _{CN})) |
| 3D-TROSY-MQ-H(C)N(C)H ^k | 293 | 600 | 2,4 | 6,3 | 13 | 40 | 1,35 | 80 | 28 | 1024 | 145 | 139,5 | 256 | 128 | 2048 | |
| 3D-HC(C)H-COSY ^k | 293 | 600 | 3 | 44 | 11 | 8 | 1,1 | 152 | 160 | 1024 | - | 82 | 256 | 256 | 2048 | |
| H(CCN)H-COSY ^j | 293 | 700 | 10 | 24 | - | 32 | 1,28 | 384 | 4096 | - | 160 | 121 | 1024 | 4096 | - | |
| H(CCN)H-TOCSY ^j | 293 | 700 | 10 | 24 | - | 368 | 1,28 | 256 | 2048 | - | 160 | 121 | 1024 | 4096 | - | d15=19,5ms (TOCSY) |
| (H)C(CN)H-TOCSY ^j | 293 | 700 | 70 | 24 | - | 320 | 1,28 | 70 | 4096 | - | 160 | 121 | 2048 | 4096 | - | d15=19,5ms (TOCSY) |

^a

Temperatur in K

^bmagnetische Feldstärke angegeben als ¹H-Resonanzfrequenz [MHz]^c

spektrale Weite der ersten, zweiten bzw. dritten Dimension in ppm

^d

Anzahl der Transienten pro Inkrement

^e

Wartezeit zwischen den Transienten in sec

^f

Anzahl der aufgenommenen Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimension

^gOffset der Frequenzen für ¹⁵N und ¹³C in ppm^h

Prozessierte Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimension

ⁱ

zusätzlicher, für die jeweilige Pulssequenz spezifischer Parameter

^j90% H₂O, 10% D₂O Probe^k99,99% D₂O Probe

Tabelle 7-7 Akquisitions- und Prozessierungsparameter der NMR-Experimente, die an der G-¹³C, ¹⁵N-doppelt-markierten 4U-hp2-wt RNA-Probe aufgenommen wurden.

| Experiment | T ^a | B ₀ ^b | sw ₁ ^c | sw ₂ ^c | sw ₃ ^c | ns ^d | d ₁ ^e | td ₁ ^f | td ₂ ^f | td ₃ ^f | ω _{15N} ^g | ω _{13C} ^g | SI ₁ ^h | SI ₂ ^h | SI ₃ ^h | i |
|--|----------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| [¹ H, ¹³ C]-RT-HSQC (Aromaten) ^l | 293 | 600 | 16 | 14 | - | 16 | 1,4 | 128 | 2048 | - | 187 | 136 | 1024 | 4096 | - | |
| [¹ H, ¹³ C]-CT-HSQC (Zucker) ^l | 293 | 600 | 40 | 10 | - | 4 | 1,3 | 256 | 1024 | - | 160 | 76 | 1024 | 2048 | - | d23=12,5ms (1/(2J _{CC})) |
| 3D-[¹ H- ¹³ C]-NOESY-HSQC (Aromaten) ^l | 293 | 900 | 6 | 6 | 10 | 8 | 1,1 | 192 | 40 | 1024 | 190 | 136 | 512 | 128 | 2048 | d8=200ms |
| 3D-HCN [H1'] ^l | 293 | 600 | 10 | 7 | 10 | 16 | 1,5 | 48 | 40 | 1024 | 167,5 | 88,5 | 256 | 256 | 2048 | d22=14ms (1/(4J _{CN})) |
| 3D-HCN [H6'] ^l | 293 | 600 | 10 | 8 | 10 | 16 | 1,3 | 48 | 48 | 1024 | 167,5 | 136 | 256 | 256 | 2048 | d22=14ms (1/(4J _{CN})) |
| H(CN)H' ^l | 293 | 600 | 7 | 12 | - | 256 | 1,3 | 256 | 1024 | - | 167,5 | 89 | 1024 | 2048 | - | d22=15ms; d26=12ms |
| 3D-HC(C)H-COSY ^l | 293 | 600 | 3 | 30 | 10 | 4 | 1,15 | 192 | 224 | 1024 | 160 | 77 | 512 | 512 | 2048 | |
| 2D-H(NC6)C5 ^k | 293 | 600 | 30 | 22 | - | 128 | 1,4 | 256 | 2048 | - | 160 | 119 | 1024 | 4096 | - | |
| 3D-TROSY-(H)CCH-COSY ^k | 293 | 600 | 60 | 8 | 12 | 8 | 1,1 | 384 | 40 | 1024 | 150 | 136,5 | 1024 | 128 | 2048 | cnst28 = 98 ppm |
| 2D-H(N)CO ^k | 293 | 600 | 40 | 22 | - | 80 | 1,2 | 384 | 2048 | - | 150 | 160 | 512 | 4096 | - | cnst28 = 115 ppm |

^a

Temperatur in K

^bmagnetische Feldstärke angegeben als ¹H-Resonanzfrequenz [MHz]^c

spektrale Weite der ersten, zweiten bzw. dritten Dimension in ppm

^d

Anzahl der Transienten pro Inkrement

^e

Wartezeit zwischen den Transienten in sec

^f

Anzahl der aufgenommenen Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimension

^gOffset der Frequenzen für ¹⁵N und ¹³C in ppm^h

Prozessierte Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimension

ⁱ

zusätzlicher, für die jeweilige Pulssequenz spezifischer Parameter

^k90% H₂O, 10% D₂O Probe^l99,99% D₂O Probe

7.2.2 ^{31}P -Relaxationsmessungen ^2H -markierte 14mer-RNA

Tabelle 7-8 Akquisitions- und Prozessierungsparameter der NMR-Experimente, die an der ^2H -markierten cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA-Probe aufgenommen wurden.

| Experiment | T ^a | B ₀ ^b | sw ₁ ^c | sw ₂ ^c | ns ^d | d ₁ ^e | td ₁ ^f | td ₂ ^f | ω _{31P} ^g | SI ₁ ^h | SI ₂ ^h |
|---|----------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| ^{31}P -R ₁ -Relaxationsmessung | 310 | 300 | - | 15 | 512 | 10 | 18 | 4096 | 0,61 | - | 32768 |
| ^{31}P -R ₁ -Relaxationsmessung | 310 | 600 | - | 15 | 224 | 10 | 16 | 4096 | 0,61 | - | 32768 |
| ^{31}P -R ₁ -Relaxationsmessung | 310 | 900 | - | 15 | 480 | 10 | 16 | 4096 | 0,61 | - | 32768 |
| ^{31}P -R ₂ -Relaxationsmessung | 310 | 300 | - | 15 | 1696 | 3 | 12 | 4096 | 0,61 | - | 32768 |
| ^{31}P -R ₂ -Relaxationsmessung | 310 | 600 | - | 15 | 640 | 3 | 12 | 4096 | 0,61 | - | 32768 |

^a Temperatur in K

^b magnetische Feldstärke angegeben als ^1H -Resonanzfrequenz [MHz]

^c spektrale Weite der ersten, zweiten bzw. dritten Dimension in ppm

^d Anzahl der Transienten pro Inkrement

^e Wartezeit zwischen den Transienten in sec

^f Anzahl der aufgenommenen Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimension

^g Offset der Frequenzen für ^{15}N und ^{13}C in ppm

^h Prozessierte Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimension

ⁱ zusätzlicher, für die jeweilige Pulssequenz spezifischer Parameter

7.2.3 Festkörper-NMR-Messungen

Tabelle 7-9 Akquisitions- und Prozessierungsparameter der Festkörper NMR-Experimente, die an verschiedenen GC-20mer-Duplex-RNA-Proben aufgenommen wurden.

| Experiment | T ^a | B ₀ ^b | Probe ^c | KCl ^d | MAS ^e | sw ₁ ^f | ns ^g | d ₁ ^h | td ₁ ⁱ | td ₂ ⁱ | ω _{31P} ^j | SI ₁ ^k |
|--|----------------|-----------------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------------------|-----------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Festkörper ³¹ P-CSA-Messungen | 250 | 400 | Eis | 0 | 2000 | 500 | 26980 | 2 | 4096 | | 1,77 | 8192 |
| Festkörper ³¹ P-CSA-Messungen | 250 | 400 | Eis | 50 | 2000 | 500 | 6980 | 2 | 4096 | | 1,77 | 8192 |
| Festkörper ³¹ P-CSA-Messungen | 250 | 400 | Eis | 100 | 2000 | 500 | 30260 | 2 | 4096 | | 1,77 | 8192 |
| Festkörper ³¹ P-CSA-Messungen | 250 | 400 | Eis | 1000 | 2000 | 500 | 6660 | 2 | 4096 | | 1,77 | 8192 |
| Festkörper ³¹ P-CSA-Messungen | 250 | 400 | gefriergetr. | 0 | 3000 | 500 | 6324 | 2 | 4096 | | 1,77 | 8192 |
| Festkörper ³¹ P-CSA-Messungen | 250 | 400 | gefriergetr. | 500 | 3000 | 500 | 3760 | 2 | 4096 | | 1,77 | 8192 |
| Festkörper ³¹ P-CSA-Messungen | 250 | 400 | gefriergetr. | 1000 | 3000 | 500 | 8152 | 2 | 4096 | | 1,77 | 8192 |
| Festkörper ³¹ P-CSA-Messungen | 310 | 400 | gefriergetr. | 100 | 3000 | 500 | 31252 | 2 | 4096 | | 1,77 | 8192 |
| Festkörper ³¹ P-CSA-Messungen | 310 | 400 | 84% humid. | 100 | 3000 | 500 | 29600 | 2 | 4096 | | 1,77 | 8192 |

^a Temperatur in K

^b magnetische Feldstärke angegeben als ¹H-Resonanzfrequenz [MHz]

^c Proben wurden entweder in gefrorenem Puffer oder als gefriergetrocknetes Pulver gemessen, das mit 0% oder 84% relativer Luftfeuchtigkeit äquilibriert war.

^d Salzgehalt (KCl) der Probe

^e MAS-Rotationsgeschwindigkeit in Hz

^f spektrale Weite der ersten, zweiten bzw. dritten Dimension in ppm

^g Anzahl der Transienten pro Inkrement

^h Wartezeit zwischen den Transienten in sec

ⁱ Anzahl der aufgenommenen Punkte in der direkten Dimension

^j Offset der Frequenz für ³¹P in ppm

^k Prozessierte Punkte in der direkten Dimension

7.2.4 Kreuzkorrelierte Relaxationsraten

Tabelle 7-10 Akquisitions- und Prozessierungsparameter der Γ -HCNCH NMR-Experimente, die an der $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -doppelt-markierten cUUCGg-tetraloop-14mer-RNA-Probe aufgenommen wurden.

| Experiment | T^a | B_0^b | sw_1^c | sw_2^c | sw_3^c | ns^d | d_1^e | td_1^f | td_2^f | td_3^f | $\omega_{15\text{N}}^g$ | $\omega_{13\text{C}}^g$ | SI_1^h | SI_2^h | SI_3^h | i |
|-------------------------------------|-------|---------|----------|----------|----------|--------|---------|----------|----------|----------|-------------------------|-------------------------|----------|----------|----------|-------------------|
| Γ -HCNCH (C1'H1') cross | 298 | 700 | - | 7 | 10 | 128 | 1,5 | 1 | 64 | 1024 | 161 | 89 | - | 1024 | 2048 | $T_m=20\text{ms}$ |
| Γ -HCNCH (C1'H1') ref | 298 | 700 | - | 7 | 10 | 1024 | 1,5 | 1 | 64 | 1024 | 161 | 89 | - | 1024 | 2048 | $T_m=20\text{ms}$ |
| Γ -HCNCH (N1/9,H1') cross | 298 | 700 | 33 | - | 10 | 128 | 1,9 | 1 | 64 | 1024 | 161 | 89 | 1024 | - | 2048 | $T_m=20\text{ms}$ |
| Γ -HCNCH (N1/9,H1') ref | 298 | 700 | 33 | - | 10 | 1024 | 1,9 | 1 | 64 | 1024 | 161 | 89 | 1024 | - | 2048 | $T_m=20\text{ms}$ |
| Γ -HCNCH (C6/C8,H6/H8) cross | 298 | 700 | - | 10 | 10 | 1024 | 1,8 | 1 | 80 | 1024 | 161 | 137,5 | - | 1024 | 2048 | $T_m=20\text{ms}$ |
| Γ -HCNCH (C6/C8,H6/H8) ref | 298 | 700 | - | 10 | 10 | 128 | 1,8 | 1 | 80 | 1024 | 161 | 137,5 | - | 1024 | 2048 | $T_m=20\text{ms}$ |
| Γ -HCNCH (C1'H1') cross | 298 | 700 | - | 7 | 10 | 512 | 1,5 | 1 | 64 | 1024 | 161 | 89 | - | 1024 | 2048 | $T_m=30\text{ms}$ |
| Γ -HCNCH (C1'H1') ref | 298 | 700 | - | 7 | 10 | 128 | 1,5 | 1 | 64 | 1024 | 161 | 89 | - | 1024 | 2048 | $T_m=30\text{ms}$ |
| Γ -HCNCH (N1/9,H1') cross | 298 | 700 | 33 | - | 10 | 128 | 1,65 | 1 | 64 | 1024 | 161 | 89 | 1024 | - | 2048 | $T_m=30\text{ms}$ |
| Γ -HCNCH (N1/9,H1') ref | 298 | 700 | 33 | - | 10 | 1024 | 1,65 | 1 | 64 | 1024 | 161 | 89 | 1024 | - | 2048 | $T_m=30\text{ms}$ |
| Γ -HCNCH (C6/C8,H6/H8) cross | 298 | 700 | - | 10 | 10 | 1024 | 1,3 | 1 | 80 | 1024 | 161 | 137,5 | - | 1024 | 2048 | $T_m=30\text{ms}$ |
| Γ -HCNCH (C6/C8,H6/H8) ref | 298 | 700 | - | 10 | 10 | 128 | 1,3 | 1 | 80 | 1024 | 161 | 137,5 | - | 1024 | 2048 | $T_m=30\text{ms}$ |

^a Temperatur in K

^b magnetische Feldstärke angegeben als ^1H -Resonanzfrequenz [MHz]

^c spektrale Weite der ersten, zweiten bzw. dritten Dimension in ppm

^d Anzahl der Transienten pro Inkrement

^e Wartezeit zwischen den Transienten in sec

^f Anzahl der aufgenommenen Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimension

^g Offset der Frequenzen für ^{15}N und ^{13}C in ppm während der Entwicklung der Chemischen Verschiebung. Der Offset wird generell während der Pulssequenz mehrere Male verändert (siehe Verweis Pulssequenz)

^h Prozessierte Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimension

ⁱ zusätzlicher, für die jeweilige Pulssequenz spezifischer Parameter

Tabelle 7-11 Akquisitions- und Prozessierungsparameter der Γ -HCNCH NMR-Experimente, die an der A,U- ^{13}C , ^{15}N -doppelt-markierten 30mer-RNA-Probe (SLD der CVB3 genomischen RNA) aufgenommen wurden.

| Experiment | T^a | B_0^b | sw_1^c | sw_2^c | sw_3^c | ns^d | d_1^e | td_1^f | td_2^f | td_3^f | $\omega_{15\text{N}}^g$ | $\omega_{13\text{C}}^g$ | SI_1^h | SI_2^h | SI_3^h | i |
|--------------------------------|-------|---------|----------|----------|----------|--------|---------|----------|----------|----------|-------------------------|-------------------------|----------|----------|----------|-------------------|
| Γ -HCNCH (C1'H1') cross | 310 | 700 | - | 8 | 10 | 2560 | 1,5 | 1 | 44 | 1024 | 157,5 | 89 | - | 256 | 2048 | $T_m=10\text{ms}$ |
| Γ -HCNCH (C1'H1') ref | 310 | 700 | - | 8 | 10 | 256 | 1,5 | 1 | 44 | 1024 | 157,5 | 89 | - | 256 | 2048 | $T_m=10\text{ms}$ |
| Γ -HCNCH (C1'H1') cross | 310 | 700 | - | 8 | 10 | 2560 | 1,5 | 1 | 44 | 1024 | 157,5 | 89 | - | 256 | 2048 | $T_m=15\text{ms}$ |
| Γ -HCNCH (C1'H1') ref | 310 | 700 | - | 8 | 10 | 256 | 1,5 | 1 | 44 | 1024 | 157,5 | 89 | - | 256 | 2048 | $T_m=15\text{ms}$ |

^a Temperatur in K

^b magnetische Feldstärke angegeben als ^1H -Resonanzfrequenz [MHz]

^c spektrale Weite der ersten, zweiten bzw. dritten Dimension in ppm

^d Anzahl der Transienten pro Inkrement

^e Wartezeit zwischen den Transienten in sec

^f Anzahl der aufgenommenen Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimension

^g Offset der Frequenzen für ^{15}N und ^{13}C in ppm während der Entwicklung der Chemischen Verschiebung. Der Offset wird generell während der Pulssequenz mehrere Male verändert (siehe Verweis Pulssequenz)

^h Prozessierte Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimension

ⁱ zusätzlicher, für die jeweilige Pulssequenz spezifischer Parameter

Tabelle 7-12 Akquisitions- und Prozessierungsparameter des Γ -HCCCH NMR-Experiments, das an der ^{13}C , ^{15}N -doppelt-markierten cUUCGg-*tetraloop*-14mer-RNA-Probe (100% D_2O) aufgenommen wurde.

| Experiment | T^a | B_0^b | sw_1^c | sw_2^c | sw_3^c | ns^d | d_1^e | td_1^f | Td_2^f | td_3^f | $\omega_{^{15}\text{N}}^g$ | $\omega_{^{13}\text{C}}^g$ | SI_1^h | SI_2^h | SI_3^h | i |
|---|-------|---------|----------|----------|----------|--------|---------|----------|----------|----------|----------------------------|----------------------------|----------|----------|----------|---|
| 3D Γ-HCCCH (C2'C1'H1') cross | 298 | 700 | 4.2 | 6.2 | 13 | 128 | 1.5 | 16 | 24 | 2048 | 160 | 89.1 | 128 | 128 | 4096 | $T_m=25\text{ms}$; $d_5=0\text{ ms}$ |
| 3D Γ-HCCCH (C2'C1'H1') ref | 298 | 700 | 4.2 | 6.2 | 13 | 32 | 1.5 | 16 | 24 | 2048 | 160 | 89.1 | 128 | 128 | 4096 | $T_m=25\text{ms}$; $d_5=3.125\text{ ms}$ |
| 2D Γ-HCCCH (C1'H1') cross | 298 | 700 | - | 6.3 | 13 | 1024 | 2.0 | - | 24 | 2048 | 160 | 89.1 | - | 1024 | 4096 | $T_m=25\text{ms}$; $d_5=0\text{ ms}$ |
| 2D Γ-HCCCH (C1'H1') ref | 298 | 700 | - | 6.3 | 13 | 64 | 2.0 | - | 24 | 2048 | 160 | 89.1 | - | 1024 | 4096 | $T_m=25\text{ms}$; $d_5=3.125\text{ ms}$ |

a Temperatur in K

b magnetische Feldstärke angegeben als ^1H -Resonanzfrequenz [MHz]

c spektrale Weite der ersten, zweiten bzw. dritten Dimension in ppm

d Anzahl der Transienten pro Inkrement

e Wartezeit zwischen den Transienten in sec

f Anzahl der aufgenommenen Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimension

g Offset der Frequenzen für ^{15}N und ^{13}C in ppm während der Entwicklung der Chemischen Verschiebung. Der Offset wird während der Pulssequenz zweimal verändert (siehe Verweis Pulssequenz)

h Prozessierte Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimension

i zusätzlicher, für die jeweilige Pulssequenz spezifischer Parameter

7.3 Pulsprogramme

7.3.1 Γ -HCNCH-Referenzexperiment (Detektion auf H1')

```
;ddG_CN_final_ref_104_N3D_2
```

```
prosol relations=<triple_na>
```

```
#include <Avance.incl>
```

```
#include <Grad.incl>
```

```
#include <Delay.incl>
```

```
"p2=p1*2" ;1H
```

```
"p4=p3*2" ;13C
```

```
"p22=p21*2" ;15N
```

```
"d10=3u"
```

```
"d4=1.25m" ;H8C8 Transfer 1J=216Hz
```

```
"d5=1.5m" ;H1'C1' Transfer, 1J=170Hz
```

```
"d0=3u"
```

```
"d11=30m"
```

```
"d13=4u"
```

```
;"d23=18m" ;CN Transfer 1J=11 Hz
```

```
;"d22=16m"
```

```
;"d25=25m" ;mixing time cross correlated relaxation rate
```

```
;"d27=3m" ;reference exepriemt: 1/(2J(HC)), d27=2,7ms
```

```
"d28=d27/4-p22/2"
```

```
"d30=d24-d13-p16-d16-p24-p14/2"
```

```
"d20=d21-d13-p14-larger(p14,p30)/2"
```

```
"in20=in0"
```

```
"in30=in10"
```

```
"DELTA=d4-larger(p14,p2)/2"
```

```
"DELTA1=d22-p16-d13-d16-larger(p14,p30)/2"
```

```
"DELTA2=d23-p14/2-d16-p16"
```

```
"DELTA3=d25/4-p19-d16-p22/2-p25/4"
```

```
"DELTA4=d25/4-d28-p22/2-p25/4"
```

```
"DELTA5=d25/4-p19-d16-p22/2-p25/4"
```

```
"DELTA6=d25/4-d28-p22/2-p25/4"
```

```
"DELTA7=d24-d16-p16-d10-p24-p14/2"
```

```
"DELTA8=d21-d0-p14-larger(p14,p30)/2"
```

```
"TAU=d13+p16+d16+4u"
```

"spoff3=0"
"spoff9=0"

aqseq 321

1 ze

d11 pl12:f2 pl16:f3

2 d11 do:f2 do:f3

3 d12 pl9:f1

d1 cw:f1 ph29

d13 do:f1

d12 pl1:f1

d12 fq=cnst21(bf ppm):f2 ;on C8, 138ppm

d13 fq=cnst18(bf ppm):f3 ;N9, 161ppm

(p1 ph1) ; Start Transfer H8 to C8

d4 pl2:f2 pl1:f1

(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2)

d4 UNBLKGRAD

(p1 ph2)

4u

(p11:sp1 ph13:r):f1

d13

p16:gp1

d16 pl2:f2

(p3 ph3):f2 ; Start Transfer C8 to N9

DELTA1

d13

p16:gp2

d16 pl0:f3

(center (p14:sp3 ph1):f2 (p30:sp9 ph24):f3)

d13

p16:gp2

d16 pl2:f2 pl3:f3

DELTA1

(p3 ph2):f2 ; Start transfer N9 to C1'

d13 fq=cnst22(bf ppm):f2 ;on C1', 89ppm

4u

;(p11:sp1 ph13:r):f1

d13

p16:gp1

d16 pl2:f2

(p21 ph5):f3

DELTA2

d13

p16:gp6
d16
(center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph1):f3)
d13
p16:gp6
d16 pl2:f2 pl3:f3
DELTA2
(p21 ph2):f3
d13 fq=cnst23(bf ppm):f2 ;middle C1' and C8, 112ppm
d13 fq=cnst19(bf ppm):f3 ;middle N7 and N9, 188ppm
4u
(p11:sp1 ph13:r):f1
d13
p16:gp12
d16 pl2:f2
(p3 ph10):f2 ;start DQZQ evolution time
4u
DELTA3
p19:gp7
d16
(p22 ph1):f3
d28
(p2 ph1)
DELTA4
(p25:sp7 ph12):f2
DELTA5
p19:gp7
d16
(p22 ph1):f3
d28
(p2 ph1)
DELTA6

(p3 ph11):f2 ;start C8N9 ruecktransfer
d13 fq=cnst21(bf ppm):f2 ;on C8, 138ppm
d13 fq=cnst18(bf ppm):f3 ;N9, 161ppm
4u
; (p11:sp1 ph13):f1
d13
p16:gp10
d16

(p21 ph25):f3 ;start N9 evolution
d0
(center (p2 ph1) (p14:sp13 ph1):f2)
DELTA8
(center (p14:sp3 ph6):f2 (p30:sp9 ph1):f3)
d13

```

d20
(p14:sp13 ph1):f2
4u
(p21 ph1):f3
4u
; (p11:sp1 ph13:r):f1
d13 fq=cnst22 (bf ppm):f2 ;on C1', 89ppm
p16:gp5
d16

(p3 ph7):f2 ;start N9C1' ruecktransfer
d10 pl0:f2
(center (p2 ph1) (p24:sp5 ph1):f2 )
DELTA7
p16:gp3*EA*-1
d16
(center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph1):f3 )
d13
p16:gp3*EA
d16 pl2:f2
d30
(p24:sp5 ph1):f2
4u
(center (p1 ph1) (p3 ph8):f2 ) ;start C1'H1' ruecktransfer
d5
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
d5
(center (p1 ph2) (p3 ph9):f2 )
d5
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
d5
(p1 ph1)
TAU
(p2 ph1)
d13
p16:gp4
d16 pl12:f2 pl16:f3
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2 cpd3:f3
d11 do:f2 do:f3 mc #0 to 2
F1PH(rd10 & rd30 & ip25, id0 & dd20)
F2EA(igrad EA & ip9*2, id10 & dd30 & ip6*2 & ip7*2 & ip31*2)
exit

ph1=0
ph2=1

```

ph3=0
ph4=0
ph5=0
ph6=0
ph7=1 1 1 1 3 3 3 3
ph8=0 0 2 2
ph9=3 3 1 1
ph10=0 0 0 0 0 0 0 0
2 2 2 2 2 2 2 2
ph11=1 1 1 1 1 1 1 1
1 1 1 1 1 1 1 1
3 3 3 3 3 3 3 3
3 3 3 3 3 3 3 3
ph12=0
ph13=0
ph24=0
ph25=1 3
ph29=0
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2

7.3.2 Γ -HCNCH-Kreuzexperiment (Detektion auf H1')

```
;ddG_CN_final_ref_104_N3D_2
```

```
prosol relations=<triple_na>
```

```
#include <Avance.incl>
```

```
#include <Grad.incl>
```

```
#include <Delay.incl>
```

```
"p2=p1*2" ;1H
```

```
"p4=p3*2" ;13C
```

```
"p22=p21*2" ;15N
```

```
"d10=3u"
```

```
"d4=1.25m" ;H8C8 Transfer 1J=216Hz
```

```
"d5=1.5m" ;H1'C1' Transfer, 1J=170Hz
```

```
"d0=3u"
```

```
"d11=30m"
```

```
"d13=4u"
```

```
;"d23=18m" ;CN Transfer 1J=11 Hz
```

```
;"d22=16m"
```

```
;"d25=25m" ;mixing time cross correlated relaxation rate
```

```
;"d27=3m" ;reference exepiment: 1/(2J(HC)), d27=2,7ms
```

```
"d28=d27/4-p22/2"
```

```
"d30=d24-d13-p16-d16-p24-p14/2"
```

```
"d20=d21-d13-p14-larger(p14,p30)/2"
```

```
"in20=in0"
```

```
"in30=in10"
```

```
"DELTA=d4-larger(p14,p2)/2"
```

```
"DELTA1=d22-p16-d13-d16-larger(p14,p30)/2"
```

```
"DELTA2=d23-p14/2-d16-p16"
```

```
"DELTA3=d25/4-p19-d16-p22/2-p25/4"
```

```
"DELTA4=d25/4-p22/2-p25/4"
```

```
"DELTA5=d25/4-p19-d16-p22/2-p25/4"
```

```
"DELTA6=d25/4-p22/2-p25/4"
```

```
"DELTA7=d24-d16-p16-d10-p24-p14/2"
```

```
"DELTA8=d21-d0-p14-larger(p14,p30)/2"
```

```
"TAU=d13+p16+d16+4u"
```

```
"spoff3=0"
```

```
"spoff9=0"
```

aqseq 321

1 ze

d11 pl12:f2 pl16:f3

2 d11 do:f2 do:f3

3 d12 pl9:f1

d1 cw:f1 ph29

d13 do:f1

d12 pl1:f1

d12 fq=cnst21(bf ppm):f2 ;on C8, 138ppm

d13 fq=cnst18(bf ppm):f3 ;N9, 161ppm

(p1 ph1) ; Start Transfer H8 to C8

d4 pl2:f2 pl1:f1

(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2)

d4 UNBLKGRAD

(p1 ph2)

4u

(p11:sp1 ph13:r):f1

d13

p16:gp1

d16 pl2:f2

(p3 ph3):f2

; Start Transfer C8 to N9

DELTA1

d13

p16:gp2

d16 pl0:f3

(center (p14:sp3 ph1):f2 (p30:sp9 ph24):f3)

d13

p16:gp2

d16 pl2:f2 pl3:f3

DELTA1

(p3 ph2):f2

; Start transfer N9 to C1'

d13 fq=cnst22(bf ppm):f2 ;on C1', 89ppm

4u

;(p11:sp1 ph13:r):f1

d13

p16:gp1

d16 pl2:f2

(p21 ph5):f3

DELTA2

d13

p16:gp6

d16

(center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph1):f3)

d13

p16:gp6
d16 p12:f2 p13:f3
DELTA2
(p21 ph2):f3
d13 fq=cnst23(bf ppm):f2 ;middle C1' and C8, 112ppm
d13 fq=cnst19(bf ppm):f3 ;middle N7 and N9, 188ppm
4u
(p11:sp1 ph13:r):f1
d13
p16:gp12
d16 p12:f2
(p3 ph10):f2 ;start DQZQ evolution time
4u
DELTA3
p19:gp7
d16
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3)
DELTA4
(p25:sp7 ph12):f2
DELTA5
p19:gp7
d16
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3)
DELTA6

(p3 ph11):f2 ;start C8N9 ruecktransfer
d13 fq=cnst21(bf ppm):f2 ;on C8, 138 ppm
d13 fq=cnst18(bf ppm):f3 ;N9, 161ppm
4u
; (p11:sp1 ph13):f1
d13
p16:gp10
d16

(p21 ph25):f3 ;start N9 evolution
d0
(center (p2 ph1) (p14:sp13 ph1):f2)
DELTA8
(center (p14:sp3 ph6):f2 (p30:sp9 ph1):f3)
d13
d20
(p14:sp13 ph1):f2
4u
(p21 ph1):f3
4u
; (p11:sp1 ph13:r):f1
d13 fq=cnst22 (bf ppm):f2 ;on C1', 89ppm
p16:gp5

d16

```
(p3 ph7):f2 ;start N9C1' ruecktransfer
d10 pl0:f2
(center (p2 ph1) (p24:sp5 ph1):f2 )
DELTA7
p16:gp3*EA*-1
d16
(center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph1):f3 )
d13
p16:gp3*EA
d16 pl2:f2
d30
(p24:sp5 ph1):f2
4u
(center (p1 ph1) (p3 ph8):f2 ) ;start C1'H1' ruecktransfer
d5
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
d5
(center (p1 ph2) (p3 ph9):f2 )
d5
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
d5
(p1 ph1)
TAU
(p2 ph1)
d13
p16:gp4
d16 pl12:f2 pl16:f3
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2 cpd3:f3
d11 do:f2 do:f3 mc #0 to 2
  F1PH(rd10 & rd30 & ip25, id0 & dd20)
  F2EA(igrad EA & ip9*2, id10 & dd30 & ip6*2 & ip7*2 & ip31*2)
exit
```

```
ph1=0
ph2=1
ph3=0
ph4=0
ph5=0
ph6=0
ph7=1 1 1 1 3 3 3 3
ph8=0 0 2 2
ph9=3 3 1 1
ph10=0 0 0 0 0 0 0 0
      2 2 2 2 2 2 2 2
```

ph11=1 1 1 1 1 1 1

1 1 1 1 1 1 1

3 3 3 3 3 3 3

3 3 3 3 3 3 3

ph12=0

ph13=0

ph24=0

ph25=1 3

ph29=0

ph31=0 2 2 0 2 0 0 2

7.3.3 Γ -HCNCH-Referenzexperiment (Detektion auf H6/H8)

```
;ddG_HCN_final_ref_H8_N3D_2
```

```
prosol relations=<triple_na>
```

```
#include <Avance.incl>
```

```
#include <Grad.incl>
```

```
#include <Delay.incl>
```

```
"p2=p1*2" ;1H
```

```
"p4=p3*2" ;13C
```

```
"p22=p21*2" ;15N
```

```
"d10=3u"
```

```
"d4=1.5m" ;H1'C1' Transfer 1J=170Hz
```

```
"d5=1.25m" ;H8C8 Transfer, 1J=216Hz
```

```
"d0=3u"
```

```
"d11=30m"
```

```
"d13=4u"
```

```
"d23=16m" ;CN Transfer 1J=11 Hz
```

```
"d22=18m"
```

```
;"d25=25m" ;mixing time cross correlated relaxation rate
```

```
;"d27=3m" ;reference experiment: 1/(2J(HC)), d27=2,7ms
```

```
"d28=d27/4-p22/2"
```

```
"d30=d23-d13-p16-d16-p24-p14/2"
```

```
"d20=d22-d13-p14-larger(p14,p30)/2"
```

```
"in20=in0"
```

```
"in30=in10"
```

```
"DELTA=d4-larger(p14,p2)/2"
```

```
"DELTA1=d22-p16-d13-d16-larger(p14,p30)/2"
```

```
"DELTA2=d23-p14/2-d16-p16"
```

```
"DELTA3=d25/4-p22/2-p25/4"
```

```
"DELTA4=d25/4-p16-d16-d28-p22/2-p25/4"
```

```
"DELTA5=d25/4-p16-d16-p22/2-p25/4"
```

```
"DELTA6=d25/4-d28-p22/2-p25/4"
```

```
"DELTA7=d23-p16-d16-d10-p24-p14/2"
```

```
"DELTA8=d22-d0-p14-larger(p14,p30)/2"
```

```
"TAU=d13+p16+d16+4u"
```

```
"TAU2=d5-p19-p9-12u"
```

```
"spoff3=0"
```

```
"spoff9=0"
```

aqseq 321

1 ze

d11 pl12:f2 pl16:f3

2 d11 do:f2 do:f3

3 d12 pl9:f1

d1 cw:f1 ph29

d13 do:f1

d12 pl1:f1

d12 fq=cnst21(bf ppm):f2 ;on C1' 89ppm

d13 fq=cnst18(bf ppm):f3 ;N9, 161ppm

(p1 ph1) ; Start Transfer H1' to C1'

d4 pl2:f2 pl1:f1

(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2)

d4 UNBLKGRAD

(p1 ph2)

4u

;(p11:sp1 ph13:r):f1

d13

p16:gp1

d16 pl2:f2

(p3 ph3):f2

; Start Transfer C1' to N9

DELTA1

d13

p16:gp2

d16 pl0:f3

(center (p14:sp3 ph1):f2 (p30:sp9 ph24):f3)

d13

p16:gp2

d16 pl2:f2 pl3:f3

DELTA1

(p3 ph2):f2

; Start transfer N9 to C8

d13 fq=cnst22(bf ppm):f2 ;on C8, 138ppm

4u

;(p11:sp1 ph13:r):f1

d13

p16:gp1

d16 pl2:f2

(p21 ph5):f3

DELTA2

d13

p16:gp6

d16

(center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph1):f3)

d13
p16:gp6
d16 pl2:f2 pl3:f3
DELTA2
(p21 ph2):f3
d13 fq=cnst23(bf ppm):f2 ;middle C1' and C8, 112ppm
d13 fq=cnst19(bf ppm):f3 ;middle N7 and N9, 188ppm
4u
;(p11:sp1 ph13:r):f1
d13
p16:gp12
d16 pl2:f2
(p3 ph10):f2 ;start DQZQ evolution time
4u
DELTA3
(p22 ph1):f3
d28
(p2 ph1)
DELTA4
p16:gp7
d16
(p25:sp7 ph12):f2
DELTA5
p16:gp7
d16
(p22 ph1):f3
d28
(p2 ph1)
DELTA6

(p3 ph11):f2 ;start C1'N9 ruecktransfer
d13 fq=cnst21(bf ppm):f2 ;on C1', 89ppm
d13 fq=cnst18(bf ppm):f3 ;N9, 161ppm
4u
;(p11:sp1 ph13):f1
d13
p16:gp10
d16

(p21 ph25):f3 ;start N9 evolution
d0
(center (p2 ph1) (p14:sp13 ph1):f2)
DELTA8
(center (p14:sp3 ph6):f2 (p30:sp9 ph1):f3)
d13
d20
(p14:sp13 ph1):f2
4u

(p21 ph1):f3
4u
;(p11:sp1 ph13:r):f1
d13 fq=cnst22 (bf ppm):f2 ;on C8, 138ppm
p16:gp5
d16

(p3 ph7):f2 ;start N9C8 ruecktransfer
d10 pl0:f2
(center (p2 ph1) (p24:sp5 ph1):f2)
DELTA7
p16:gp3
d16
(center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph1):f3)
d13
p16:gp3
d16 pl2:f2
d30
(p24:sp5 ph1):f2
4u
(p3 ph8):f2
4u
p16:gp4
d16 pl0:f1
(p11:sp1 ph17:r):f1
4u
4u pl1:f1

(p1 ph1)
4u
p19:gp12
TAU2 pl0:f1
(p9:sp6 ph17:r):f1
4u
4u pl1:f1
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2)
4u pl0:f1
(p9:sp6 ph17:r):f1
4u
p19:gp12
TAU2
d16 pl12:f2 pl16:f3
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2 cpd3:f3
d11 do:f2 do:f3 mc #0 to 2
F1PH(rd10 & rd30 & ip25, id0 & dd20)
F2PH(ip6 & ip7, id10 & dd30)

exit

ph1=0

ph2=1

ph3=0

ph4=0

ph5=0

ph6=0

ph7=1 1 1 1 3 3 3 3

ph8=0 0 2 2

ph9=3 3 1 1

ph10=0 0 0 0 0 0 0 0

2 2 2 2 2 2 2 2

ph11=1 1 1 1 1 1 1 1

1 1 1 1 1 1 1 1

3 3 3 3 3 3 3 3

3 3 3 3 3 3 3 3

ph12=0

ph13=0

ph17=2

ph24=0

ph25=1 3

ph29=0

ph31=0 2 2 0 2 0 0 2

7.3.4 Γ -HCNCH-Kreuzexperiment (Detektion auf H6/H8)

```
;ddG_HCN_final_cross_H8_N3D_2
```

```
prosol relations=<triple_na>
```

```
#include <Avance.incl>
```

```
#include <Grad.incl>
```

```
#include <Delay.incl>
```

```
"p2=p1*2" ;1H
```

```
"p4=p3*2" ;13C
```

```
"p22=p21*2" ;15N
```

```
"d10=3u"
```

```
"d4=1.5m" ;H1'C1' Transfer, 1J=170Hz
```

```
"d5=1.25m" ;H8C8 Transfer 1J=216Hz
```

```
"d0=3u"
```

```
"d11=30m"
```

```
"d13=4u"
```

```
"d23=16m" ;CN Transfer 1J=11 Hz
```

```
"d22=18m"
```

```
;"d25=25m" ;mixing time cross correlated relaxation rate
```

```
"d30=d23-d13-p16-d16-p24-p14/2"
```

```
"d20=d22-d13-p14-larger(p14,p30)/2"
```

```
"in20=in0"
```

```
"in30=in10"
```

```
"DELTA=d4-larger(p14,p2)/2"
```

```
"DELTA1=d22-p16-d13-d16-larger(p14,p30)/2"
```

```
"DELTA2=d23-p14/2-d16-p16"
```

```
"DELTA3=d25/4-p22/2-p25/4"
```

```
"DELTA4=d25/4-p16-d16-p22/2-p25/4"
```

```
"DELTA5=d25/4-p16-d16-p22/2-p25/4"
```

```
"DELTA6=d25/4-p22/2-p25/4"
```

```
"DELTA7=d23-p16-d16-d10-p24-p14/2"
```

```
"DELTA8=d22-d0-p14-larger(p14,p30)/2"
```

```
"TAU=d13+p16+d16+4u"
```

```
"TAU2=d5-p19-p9-12u"
```

```
"spoff3=0"
```

```
"spoff9=0"
```

aqseq 321

1 ze

d11 pl12:f2 pl16:f3

2 d11 do:f2 do:f3

3 d12 pl9:f1

d1 cw:f1 ph29

d13 do:f1

d12 pl1:f1

d12 fq=cnst21(bf ppm):f2 ;on C1', 89ppm

d13 fq=cnst18(bf ppm):f3 ;N9, 161ppm

(p1 ph1) ; Start Transfer H1' to C1'

d4 pl2:f2 pl1:f1

(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2)

d4 UNBLKGRAD

(p1 ph2)

4u

;(p11:sp1 ph13:r):f1

d13

p16:gp1

d16 pl2:f2

(p3 ph3):f2 ; Start Transfer C1' to N9

DELTA1

d13

p16:gp2

d16 pl0:f3

(center (p14:sp3 ph1):f2 (p30:sp9 ph24):f3)

d13

p16:gp2

d16 pl2:f2 pl3:f3

DELTA1

(p3 ph2):f2 ; Start transfer N9 to C8

d13 fq=cnst22(bf ppm):f2 ;on C8, 138ppm

4u

;(p11:sp1 ph13:r):f1

d13

p16:gp11

d16 pl2:f2

(p21 ph5):f3

DELTA2

d13

p16:gp6

d16

(center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph1):f3)

d13

p16:gp6

d16 p12:f2 p13:f3
DELTA2
(p21 ph2):f3
d13 fq=cnst23(bf ppm):f2 ;middle C1' and C8, 112ppm
d13 fq=cnst19(bf ppm):f3 ;middle N7 and N9, 188ppm
4u
;(p11:sp1 ph13:r):f1
d13
p16:gp12
d16 p12:f2
(p3 ph10):f2 ;start DQZQ evolution time
4u
DELTA3
(center (p22 ph1):f3 (p2 ph1))
DELTA4
p16:gp7
d16
(p25:sp7 ph12):f2
DELTA5
p16:gp7
d16
(center (p22 ph1):f3 (p2 ph1))
DELTA6

(p3 ph11):f2 ;start C1'N9 ruecktransfer
d13 fq=cnst21(bf ppm):f2 ;on C1', 89ppm
d13 fq=cnst18(bf ppm):f3 ;N9, 161ppm
4u
;(p11:sp1 ph13):f1
d13
p16:gp10
d16

(p21 ph25):f3 ;start N9 evolution
d0
(center (p2 ph1) (p14:sp13 ph1):f2)
DELTA8
(center (p14:sp3 ph6):f2 (p30:sp9 ph1):f3)
d13
d20
(p14:sp13 ph1):f2
4u
(p21 ph1):f3
4u
;(p11:sp1 ph13:r):f1
d13 fq=cnst22 (bf ppm):f2 ;on C8, 138ppm
p16:gp5
d16

```

(p3 ph7):f2                                ;start N9C8 ruecktransfer
d10 pl0:f2
(center (p2 ph1) (p24:sp5 ph1):f2 )
DELTA7
p16:gp3
d16
(center (p14:sp3 ph1):f2 (p22 ph1):f3 )
d13
p16:gp3
d16 pl2:f2
d30
(p24:sp5 ph1):f2
4u
(p3 ph8):f2
4u
p16:gp4
d16 pl0:f1
(p11:sp1 ph17:r):f1
4u
4u pl1:f1

(p1 ph1)
4u
p19:gp12
TAU2 pl0:f1
(p9:sp6 ph17:r):f1
4u
4u pl1:f1
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
4u pl0:f1
(p9:sp6 ph17:r):f1
4u
p19:gp12
TAU2
d16 pl12:f2 pl16:f3
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2 cpd3:f3
d11 do:f2 do:f3 mc #0 to 2
  F1PH(rd10 & rd30 & ip25, id0 & dd20)
  F2PH(ip6 & ip7, id10 & dd30)
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0

```

ph4=0
ph5=0
ph6=0
ph7=1 1 1 1 3 3 3 3
ph8=0 0 2 2
ph9=3 3 1 1
ph10=0 0 0 0 0 0 0 0
2 2 2 2 2 2 2 2
ph11=1 1 1 1 1 1 1 1
1 1 1 1 1 1 1 1
3 3 3 3 3 3 3 3
3 3 3 3 3 3 3 3
ph12=0
ph13=0
ph17=2
ph24=0
ph25=1 3
ph29=0
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2

7.3.5 3D-Γ-HCCCH

```
;sp13_ddG_onC1'_ref_4_3D
```

```
prosol relations=<triple>
```

```
#include <Avance.incl>
```

```
#include <Grad.incl>
```

```
#include <Delay.incl>
```

```
"p2=p1*2" ;1H
```

```
"p4=p3*2" ;13C
```

```
"p22=p21*2" ;15N
```

```
"d0=3u"
```

```
"d10=3u"
```

```
"d4=1.5m" ;H1'C1' Tranfer 1J=160 Hz
```

```
"d11=30m"
```

```
"d13=4u"
```

```
"d16=200u"
```

```
"d17=100u"
```

```
"d22=6.25m" ;CC Transfer 1J=40 Hz
```

```
"d28=d5/4" ;H1'C1' (H3'C3') Transfer mixing time 1J=160Hz
```

```
"d20=d22-4u-p19-d16-p4/2"
```

```
"d30=d22-4u-p19-d16-p4/2"
```

```
"in20=in0"
```

```
"in30=in10"
```

```
"DELTA=d4-4u-larger(p14,p2)/2"
```

```
"DELTA1=d22-p16-d16-p14/2-4u"
```

```
"DELTA2=d22-p19-d16-4u-p2-p4/2-d0"
```

```
"DELTA3=d22-p16-d16-p14/2-4u"
```

```
"DELTA4=d22+d28-p2/2"
```

```
"DELTA5=d22-d28-p16-d16-p4/2-p2/2-4u"
```

```
"DELTA6=d22+d28-p16-d16-p4/2-p2/2-4u"
```

```
"DELTA7=d22-d28-p2/2"
```

```
"DELTA8=d22-p19-d16-4u-p2-p4/2-d10"
```

```
"TAU=d4-p19-d16-8u-p15/2"
```

```
aqseq 321
```

```
"l0=1"
```

```
l ze
```

```
d11 p112:f2
```

```
2 d11 do:f2
3 d12 pl9:f1
  d1 cw:f1 ph29
  d13 do:f1
  d12 pl1:f1 pl2:f2
  d12 pl3:f3
  d12 UNBLKGRAD
  d12 fq=cnst21(bf ppm):f2           ;on C1', 89.1 ppm
  (p3 ph1):f2
  p16:gp7
  d16
  (p1 ph1)                           ; Start Transfer H3' to C3'
  4u
  DELTA pl0:f2
  (center (p2 ph1) (p14:sp3 ph1):f2) ; p14, 2.5 ms on C3'
  4u
  DELTA
  (p1 ph2)
  4u
  p16:gp1
  d16 pl2:f2

  if "l0 %2 == 1"                     ; Start Transfer C3' to C2'
  {
    (p3 ph5):f2
  }
  else
  {
    (p3 ph12):f2
  }

  DELTA1
  p16:gp2
  d16 pl0:f2
  4u
  (p14:sp3 ph1):f2
  4u
  p16:gp2
  d16 pl2:f2
  DELTA1 fq=cnst23(bf ppm):f2       ; on C2', 73.75 ppm
  (p3 ph10):f2                       ; Start Transfer C2' to C1' and refocusing C3' to C2'

  d0
  (center (p2 ph1) (p22 ph1):f3)
  DELTA2
  p19:gp3
```

d16
4u
(p4 ph1):f2
4u
p19:gp3
d16
d20
(p4 ph13):f2
DELTA3 fq=cnst21(bf ppm):f2 ; on C1', 89.1 ppm ; Start Transfer from C2'
to C3'
p16:gp4
d16 pl0:f2
4u
(p14:sp3 ph1):f2
4u
p16:gp4
d16 pl2:f2
DELTA3
(p3 ph8):f2 ; Start DQZQ evolution time

DELTA4
(p2 ph1)
DELTA5
p16:gp5
d16
4u
(p4 ph1):f2
4u
p16:gp5
d16
DELTA6
(p2 ph1)
DELTA7
(p3 ph9):f2 ; End DQZQ evolution time Start Refocusing C3' to C2'

DELTA1
p16:gp6
d16 pl0:f2
4u
(p14:sp3 ph6):f2
4u
p16:gp6
d16 pl2:f2
;d17 fq=cnst22(bf ppm):f2 ; on C1', 89.1 ppm
DELTA1
(p3 ph1):f2 ; Start Refocusing C2' constant time C1' evolution
d10
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3)

```
DELTA8
p19:gp8
d16
4u
(p4 ph1):f2
4u
p19:gp8
d16
d30
(p3 ph7):f2 ; End constant time C1' evolution
d12 fq=cnst22(bf ppm):f2 ; on C1', 89.1 ppm
4u
p16:gp9
d16
(p1 ph1) ; Start Refocusing C1'
TAU
p19:gp10
d16
8u
(center (p2 ph1) (p15:sp4 ph1):f2)
4u
p19:gp10
d16 pl12:f2 pl16:f3
TAU
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 mc #0 to 2
F1PH(rd10 & rd30 & ip10 & ip5 & ip12 & iu0, id0 & dd20)
F2PH(ip7, id10 & dd30)
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=2
ph4=3
ph5=0 0 2 2
ph6=0
ph7=1 3
ph8=0 0 0 0 2 2 2 2
ph9=1 1 1 1 1 1 1 1 3 3 3 3 3 3 3
ph10=1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
      3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
ph12=0 0 2 2
ph13=1 3
ph29=0
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0
```

7.3.6 3D-HNHC (Soft Watergate)

```
;na_hnhcgpph3d  
;  
;$CLASS=HighRes  
;$DIM=3D  
;$TYPE=  
;$SUBTYPE=  
;$COMMENT=
```

```
prosol relations=<triple_na>
```

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

```
"p2=p1*2"  
"p22=p21*2"  
"p4=p3*2"  
"d11=30m"  
"d12=20u"  
"d13=4u"  
"d26=1s/(cnst4*4)"
```

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

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

```
"DELTA=d19-p22/2"  
"DELTA1=d26-p16-d16"  
"DELTA2=d26-p16-d16-d4"  
"DELTA3=2*d0+p2"  
"DELTA4=d4-p16-d16-p22/2"  
"DELTA5=d4-p19-d19-p29-8u-p4/2"
```

```
"TAU=d26-p16-d16-4u"
```

```
aqseq 321
```

1 ze
d11 pl12:f2 pl16:f3
2 d11 do:f2 do:f3
d12 pl9:f1
d12 do:f2 do:f3
d1 cw:f1 ph29
4u do:f1
3 d12 pl1:f1
50u UNBLKGRAD
(p1 ph1)
4u
p16:gp1
d16
TAU pl2:f2 pl3:f3
(center (p2 ph1) (p22 ph6):f3)
4u
p16:gp1
d16
TAU
(p1 ph2)
4u pl0:f1
(p11:sp1 ph12)
p16:gp2
d16 pl1:f1
(p21 ph3):f3
DELTA3
(p22 ph3):f3
d0
(p2 ph5)
d0
(p21 ph1):f3
4u
p16:gp3
d16 pl0:f1
(p11:sp1 ph13)
4u
4u pl1:f1
(p1 ph7)
DELTA2
p16:gp4
d16
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3)
p16:gp4
d16
DELTA2
DELTA4
p16:gp5
d16

(center (p2 ph1):f1 (p4 ph11):f2 (p22 ph1):f3)
 p16:gp5
 d16
 DELTA4
 (p1 ph1)
 4u p10:f1
 4u
 (p11:sp1 ph12)
 p16:gp6
 d16 p11:f1
 (p3 ph10):f2
 d10
 (p2 ph1)
 d10
 (p3 ph1):f2
 p16:gp7
 d16 p10:f1
 ;(p11:sp1 ph12)
 4u
 4u p11:f1
 (p1 ph1)
 DELTA5
 p19:gp8
 d19 p10:f1
 (p29:sp11 ph14:r)
 4u
 4u p11:f1
 (center (p2 ph1) (p4 ph1):f2)
 4u
 4u p10:f1
 (p29:sp11 ph14:r)
 p19:gp8
 d19
 DELTA5 p112:f2 p116:f3
 4u BLKGRAD
 go=2 ph31 cpd2:f2 cpd3:f3
 d11 do:f2 do:f3 mc #0 to 2
 F1PH(rd10 & rp10 & rp11 & ip3 & ip6, id0)
 F2PH(ip10 & ip11, id10)
 exit

ph1=0
 ph2=1
 ph3=0 2
 ph5=0 0 2 2
 ph6=0
 ph7=2

ph8=1
ph9=3
ph10=0 0 0 0 2 2 2 2
ph11=0
ph12=2
ph13=0
ph14=0
ph29=0
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

7.3.7 3D-HNHC (Echo/Antiecho, *sensitivity enhanced*)

```

;na_hnhcgpsi3d
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=3D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

prosol relations=<triple_na>

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

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"p4=p3*2"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=4u"
"d26=1s/(cnst4*4)"

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

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

"DELTA=p16+d16+50u+p22+d10*2"
"DELTA1=d26-p16-d16"
"DELTA2=d26-p16-d16-d4"
"DELTA4=p21*2/3.1416"
"DELTA5=p16+d16+d13+4u"
"DELTA6=d4-p19-d16"

# ifdef LABEL_CN
"DELTA3=d0+larger(p2,p14)/2"
# else
"DELTA3=d0+p2/2"
# endif /*LABEL_CN*/

"TAU=d26-p16-4u"

```

aqseq 321

```
1 ze
  d11 pl12:f2 pl16:f3
2 d11 do:f2 do:f3
  4u pl9:f1
  d1 cw:f1 ph29
  4u do:f1
3 d12 pl1:f1
  50u UNBLKGRAD
  (p1 ph1)
  4u
  p16:gp1
  TAU pl2:f2 pl3:f3
  (center (p2 ph1) (p22 ph6):f3 )
  4u
  p16:gp1
  TAU
  (p1 ph2)
  4u
  p16:gp2
  d16
  (p21 ph3):f3
  DELTA3
  (p22 ph3):f3
  DELTA4 pl0:f2
  d0

# ifdef LABEL_CN
  (center (p2 ph5) (p14:sp3 ph1):f2 )
# else
  (p2 ph5)
# endif /*LABEL_CN*/

d0
DELTA4 pl2:f2
(p22 ph4):f3
DELTA3
(p21 ph4):f3
4u
p16:gp2
d16
(p1 ph7)
DELTA2
(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3)
DELTA2
d4
(center (p2 ph1):f1 (p4 ph11):f2 (p22 ph1):f3)
```

d4

(p1 ph1) (p3 ph13):f2

d10

(center (p2 ph17) (p22 ph1):f3)

d10

50u UNBLKGRAD

p16:gp5*EA

d16

(p4 ph14):f2

DELTA

(center (p1 ph1) (p3 ph14):f2)

DELTA6

p19:gp7

d16

(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2)

p19:gp7

d16

DELTA6

(center (p1 ph2) (p3 ph15):f2)

DELTA6

p19:gp8

d16

(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2)

p19:gp8

d16

DELTA6

(p1 ph1)

DELTA5

(p2 ph1)

d13

p16:gp6

d16 pl12:f2 pl16:f3

4u BLKGRAD

go=2 ph31 cpd2:f2 cpd3:f3

d11 do:f2 do:f3 mc #0 to 2

F1PH(rd10 & rp11 & rp13 & rp31 & ip3 & ip6, id0)

F2EA(igrad EA & ip15*2, id10 & ip11*2 & ip13*2 & ip31*2)

exit

ph1=0

ph2=1

ph3=0 2

ph4=0 0 2 2

ph5=0

ph6=0

ph7=2

ph8=1
ph9=3
ph10=0
ph11=0
ph13=0
ph14=0 0 0 0 2 2 2 2
ph15=1 1 1 1 3 3 3 3
ph16=0
ph17=0
ph29=0
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2

7.3.8 3D-HNHC (Echo/Antiecho, TROSY)

```
;na_trnhcetsi3d
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=3D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

prosol relations=<triple_na>

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

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"p4=p3*2"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=4u"
"d26=1s/(cnst4*4)"

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

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

"DELTA=d10"
"DELTA1=d26-p16-d16"
"DELTA2=d26-p16-d16-d4"
"DELTA4=p21*2/3.1416"
"DELTA5=p16+d16+d13+4u"
"DELTA6=d4-p19-d16"

# ifdef LABEL_CN
"DELTA3=d0+larger(p2,p14)/2"
# else
"DELTA3=d0+p2/2"
# endif /*LABEL_CN*/

"TAU=d26-p16-4u"
```

aqseq 321

1 ze

d11 pl12:f2 pl16:f3

2 d11 do:f2 do:f3

4u pl9:f1

d1 cw:f1 ph29

4u do:f1

3 d12 pl1:f1

50u UNBLKGRAD

(p1 ph1)

4u

p16:gp1

TAU pl2:f2 pl3:f3

(center (p2 ph1) (p22 ph6):f3)

4u

p16:gp1

TAU

(p1 ph2)

4u

p16:gp2

d16

(p21 ph3):f3

DELTA3

(p22 ph3):f3

DELTA4 pl0:f2

d0

ifdef LABEL_CN

(center (p2 ph5) (p14:sp3 ph1):f2)

else

(p2 ph5)

endif /*LABEL_CN*/

d0

DELTA4 pl2:f2

(p22 ph4):f3

DELTA3

(p21 ph4):f3

4u

p16:gp2

d16

(p1 ph7)

DELTA2

(center (p2 ph1) (p22 ph1):f3)

DELTA2

d4

(center (p2 ph1):f1 (p4 ph11):f2 (p22 ph1):f3)

d4

(p1 ph1) (p3 ph13):f2

d10

p16:gp5*EA

d16

(p4 ph16):f2

DELTA

p16:gp5*EA*-1

d16

(center (p1 ph1) (p3 ph14):f2)

DELTA6

p19:gp7

d16

(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2)

p19:gp7

d16

DELTA6

(center (p1 ph2) (p3 ph1):f2)

DELTA6

p19:gp8

d16

(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2)

p19:gp8

d16

DELTA6

(center (p1 ph2) (p3 ph2):f2)

DELTA5

(p2 ph1)

d13

p16:gp6

d16 pl12:f2 pl16:f3

4u BLKGRAD

go=2 ph31 cpd3:f3

d11 do:f2 do:f3 mc #0 to 2

F1PH(rd10 & rp11 & rp13 & rp31 & ip3 & ip6, id0)

F2EA(igrad EA & ip14*2, id10 & ip13*2 & ip31*2)

exit

ph1=0

ph2=1

ph3=0 2

ph4=0

ph5=0

ph6=0

ph7=2

ph8=1

ph9=3
ph10=0
ph11=0
ph13=0 0 2 2
ph14=0 0 0 0
ph15=0 0 0 0
ph16=0 0 0 0 2 2 2 2
ph17=2
ph29=0
ph31=0 2 2 0

8 Literatur

1. Wishart DS and Sykes BD, *Chemical shifts as a tool for structure determination*. Methods Enzymol, **1994**. 239: p. 363-92.
2. Cornilescu G, Delaglio F and Bax A, *Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology*. J Biomol NMR, **1999**. 13(3): p. 289-302.
3. Shen Y, et al., *TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts*. J Biomol NMR, **2009**. 44(4): p. 213-23.
4. Ohlenschläger O, et al., *Conformational signatures of ¹³C chemical shifts in RNA ribose*. J Biomol NMR, **2008**. 42(2): p. 139-42.
5. Fares C, Amata I and Carlomagno T, *¹³C-detection in RNA bases: revealing structure-chemical shift relationships*. J Am Chem Soc, **2007**. 129(51): p. 15814-23.
6. Abragam A, *Principles of Nuclear Magnetism*. 1961, Oxford: Clarendon Press.
7. Ernst RR, Bodenhausen G and Wokaun A, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*. 1987, Oxford: Clarendon Press.
8. Kumar A, Ernst RR and Wüthrich K, *A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D-NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules*. Biochem Biophys Res Commun, **1980**. 95(1): p. 1-6.
9. Jeener J, et al., *Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy*. J Chem Phys, **1979**. 71(11): p. 4546-4553.
10. Cavanagh J, et al., *Protein NMR Spectroscopy. Principles and Practice*. 1996, New York: Academic Press.
11. Bothner-By AA, et al., *Structure determination of a tetrasaccharide: transient nuclear Overhauser effects in the rotating frame*. J Am Chem Soc, **1984**. 106(3): p. 811-813.
12. Bax A and Grzesiek S, in *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*. **1996**, Wiley: Chichester. p. 4157-4167.

-
13. Schleucher J, et al., in *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*. **1996**, Wiley: Chichester. p. 4789-4804.
 14. Varani G, Aboul-ela F and Allain FH-T, *NMR investigation of RNA structure*. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, **1996**. 29: p. 51-127.
 15. Wijmenga SS, van Buuren, B. N. M., *The use of NMR methods for conformational studies of nucleic acids*. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, **1998**. 32: p. 287-387.
 16. Fürtig B, et al., *NMR-spectroscopy of RNA*. *ChemBioChem*, **2003**. 4: p. 936-962.
 17. Vuister GW, et al., *Pulse Sequences for Measuring Coupling Constants*, in *Biological Magnetic Resonance 16*, N. Rama Krishna and L.J. Berliner, Editors. **1998**, Kluwer Academic/ Plenum Publishers. p. 195-258.
 18. Griesinger C, et al., *Methods for the Determination of Torsion Angle Restraints in Biomacromolecules*, in *Biological Magnetic Resonance 16*, N. Rama Krishna and L.J. Berliner, Editors. **1998**, Kluwer Academic/ Plenum Publishers. p. 259-368.
 19. Blackledge M, *Recent progress in the study of biomolecular structure and dynamics in solution from residual dipolar couplings*. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, **2005**. 46(1): p. 23-61.
 20. Cornilescu G and Bax A, *Measurement of Proton, Nitrogen, and Carbonyl Chemical Shielding Anisotropies in a Protein Dissolved in a Dilute Liquid Crystalline Phase*. *J Am Chem Soc*, **2000**. 122(41): p. 10143-10154.
 21. Wu Z, Tjandra N and Bax A, *³¹P Chemical Shift Anisotropy as an Aid in Determining Nucleic Acid Structure in Liquid Crystals*. *J Am Chem Soc*, **2001**. 123(15): p. 3617-3618.
 22. Bryce DL, Grishaev A and Bax A, *Measurement of Ribose Carbon Chemical Shift Tensors for A-form RNA by Liquid Crystal NMR Spectroscopy*. *J Am Chem Soc*, **2005**. 127(20): p. 7387-7396.
 23. Hansen AL and Al-Hashimi HM, *Insight into the CSA tensors of nucleobase carbons in RNA polynucleotides from solution measurements of residual CSA: Towards new long-range orientational constraints*. *J Magn Reson*, **2006**. 179(2): p. 299-307.
 24. Reif B, Hennig M and Griesinger C, *Direct measurement of angles between bond vectors in high-resolution NMR*. *Science*, **1997**. 276(5316): p. 1230-3.
 25. Schwalbe H, et al., *Cross-correlated relaxation for measurement of angles between tensorial interactions*. *Methods Enzymol*, **2001**. 338: p. 35-81.

-
26. Richter C, et al., *NMR Spectroscopic Determination of Angles α and ζ in RNA from CH-Dipolar Coupling, P-CSA Cross-Correlated Relaxation*. J Am Chem Soc, **2000**. 122: p. 12728-12731.
 27. Nozinovic S, et al., *Quantitative 2D and 3D Gamma-HCP Experiments for the Determination of the Angles alpha and zeta in the Phosphodiester Backbone of Oligonucleotides*. J Am Chem Soc, **2010**. in revision.
 28. Cordier F, et al., *Observation of through-hydrogen-bond 2hJHC' in a perdeuterated protein*. J Magn Reson, **1999**. 140(2): p. 510-2.
 29. Wang YX, et al., *Measurement of 3hJNC' connectivities across hydrogen bonds in a 30 kDa protein*. J Biomol NMR, **1999**. 14(2): p. 181-4.
 30. Dingley AJ and Grzesiek S, *Direct Observation of Hydrogen Bonds in Nucleic Acid Base Pairs by Internucleotide 2JNN Couplings*. J Am Chem Soc, **1998**. 120(33): p. 8293-8297.
 31. Wöhnert J, et al., *Direct identification of NH...N hydrogen bonds in non-canonical base pairs of RNA by NMR spectroscopy*. Nucleic Acids Res, **1999**. 27(15): p. 3104-10.
 32. Hennig M and Williamson JR, *Detection of N-H...N hydrogen bonding in RNA via scalar couplings in the absence of observable imino proton resonances*. Nucleic Acids Res, **2000**. 28(7): p. 1585-93.
 33. Majumdar A, Kettani A and Skripkin E, *Observation and measurement of internucleotide 2JNN coupling constants between 15N nuclei with widely separated chemical shifts*. J Biomol NMR, **1999**. 14(1): p. 67-70.
 34. Dyson HJ and Wright PE, *Insights into protein folding from NMR*. Annu Rev Phys Chem, **1996**. 47: p. 369-95.
 35. Battiste JL and Wagner G, *Utilization of Site-Directed Spin Labeling and High-Resolution Heteronuclear Nuclear Magnetic Resonance for Global Fold Determination of Large Proteins with Limited Nuclear Overhauser Effect Data*. Biochemistry, **2000**. 39(18): p. 5355-5365.
 36. Palmer AG, 3rd, *NMR characterization of the dynamics of biomacromolecules*. Chem Rev, **2004**. 104(8): p. 3623-40.
 37. Lipari G and Szabo A, *Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity*. J Am Chem Soc, **1982**. 104(17): p. 4546-4559.
 38. Lipari G and Szabo A, *Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results*. J Am Chem Soc, **1982**. 104(17): p. 4559-4570.

-
39. Clore GM, et al., *Deviations from the simple two-parameter model-free approach to the interpretation of nitrogen-15 nuclear magnetic relaxation of proteins*. J Am Chem Soc, **1990**. 112(12): p. 4989-4991.
 40. Carr HY and Purcell EM, *Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments*. Phys Rev, **1954**. 94(3): p. 630-638.
 41. Meiboom S and Gill D, *Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times*. Review of Scientific Instruments, **1958**. 29(8): p. 688-691.
 42. Tollinger M, et al., *Slow dynamics in folded and unfolded states of an SH3 domain*. J Am Chem Soc, **2001**. 123(46): p. 11341-52.
 43. Akke M, *NMR methods for characterizing microsecond to millisecond dynamics in recognition and catalysis*. Curr Opin Struct Biol, **2002**. 12(5): p. 642-7.
 44. Palmer AG, 3rd, Kroenke CD and Loria JP, *Nuclear magnetic resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules*. Methods Enzymol, **2001**. 339: p. 204-38.
 45. Deverell C, Morgan RE and Strange JH, *Studies of chemical exchange by nuclear magnetic relaxation in rotating frame*. Molecular Physics, **1970**. 18(4): p. 553-559.
 46. Trott O and Palmer AG, 3rd, *R1rho relaxation outside of the fast-exchange limit*. J Magn Reson, **2002**. 154(1): p. 157-60.
 47. Auer R, et al., *Measurement of signs of chemical shift differences between ground and excited protein states: a comparison between H(S/M)QC and R1rho methods*. J Biomol NMR, **2010**. 46(3): p. 205-16.
 48. Wang C and Palmer AG, 3rd, *Differential multiple quantum relaxation caused by chemical exchange outside the fast exchange limit*. J Biomol NMR, **2002**. 24(3): p. 263-8.
 49. Dittmer J and Bodenhausen G, *Evidence for slow motion in proteins by multiple refocusing of heteronuclear nitrogen/proton multiple quantum coherences in NMR*. J Am Chem Soc, **2004**. 126(5): p. 1314-5.
 50. Orekhov VY, Korzhnev DM and Kay LE, *Double- and Zero-Quantum NMR Relaxation Dispersion Experiments Sampling Millisecond Time Scale Dynamics in Proteins*. J Am Chem Soc, **2004**. 126(6): p. 1886-1891.
 51. Korzhnev DM, et al., *Probing Slow Dynamics in High Molecular Weight Proteins by Methyl-TROSY NMR Spectroscopy: Application to a 723-Residue Enzyme*. J Am Chem Soc, **2004**. 126(12): p. 3964-3973.

-
52. Fares C, et al., *Accessing ns-micros side chain dynamics in ubiquitin with methyl RDCs*. J Biomol NMR, **2009**. 45(1-2): p. 23-44.
 53. Zhang Q, et al., *Resolving the motional modes that code for RNA adaptation*. Science, **2006**. 311(5761): p. 653-6.
 54. Getz M, et al., *NMR studies of RNA dynamics and structural plasticity using NMR residual dipolar couplings*. Biopolymers, **2007**. 86(5-6): p. 384-402.
 55. Al-Hashimi HM and Walter NG, *RNA dynamics: it is about time*. Curr Opin Struct Biol, **2008**. 18(3): p. 321-329.
 56. Günther UL and Schaffhausen B, *NMRKIN: simulating line shapes from two-dimensional spectra of proteins upon ligand binding*. J Biomol NMR, **2002**. 22(3): p. 201-9.
 57. Günther U, Mittag T and Schaffhausen B, *Probing Src homology 2 domain ligand interactions by differential line broadening*. Biochemistry, **2002**. 41(39): p. 11658-69.
 58. Mittag T, et al., *Retinol modulates site-specific mobility of apo-cellular retinol-binding protein to promote ligand binding*. J Am Chem Soc, **2006**. 128(30): p. 9844-8.
 59. Farrow NA, et al., *A heteronuclear correlation experiment for simultaneous determination of ^{15}N longitudinal decay and chemical exchange rates of systems in slow equilibrium*. J Biomol NMR, **1994**. 4(5): p. 727-34.
 60. Jeener J, et al., *Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy*. J Chem Phys, **1979**. 71: p. 4546-4553.
 61. Wenter P, et al., *Kinetics of RNA refolding in dynamic equilibrium by ^1H -detected ^{15}N exchange NMR spectroscopy*. J Am Chem Soc, **2006**. 128(23): p. 7579-87.
 62. Gopalakrishnan K and Bodenhausen G, *Lifetimes of the singlet-states under coherent off-resonance irradiation in NMR spectroscopy*. J Magn Reson, **2006**. 182(2): p. 254-9.
 63. Sarkar R, et al., *Extending the scope of singlet-state spectroscopy*. ChemPhysChem, **2007**. 8(18): p. 2652-6.
 64. Sarkar R, Vasos PR and Bodenhausen G, *Singlet-state exchange NMR spectroscopy for the study of very slow dynamic processes*. J Am Chem Soc, **2007**. 129(2): p. 328-34.
 65. Fürtig B, et al., *Time-resolved NMR studies of RNA folding*. Biopolymers, **2007**. 86(5-6): p. 360-83.

-
66. Buck J, et al., *Time-resolved NMR methods resolving ligand-induced RNA folding at atomic resolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2007**. 104(40): p. 15699-704.
 67. Schlepckow K, et al., *Conserved folding pathways of alpha-lactalbumin and lysozyme revealed by kinetic CD, fluorescence, NMR, and interrupted refolding experiments*. J Mol Biol, **2008**. 378(3): p. 686-98.
 68. Morris GA and Freeman R, *Selective excitation in Fourier transform nuclear magnetic resonance*. J Magn Reson, **1978**. 29(3): p. 433-462.
 69. Hwang TL, van Zijl PC and Mori S, *Accurate quantitation of water-amide proton exchange rates using the phase-modulated CLEAN chemical EXchange (CLEANEX-PM) approach with a Fast-HSQC (FHSQC) detection scheme*. J Biomol NMR, **1998**. 11(2): p. 221-6.
 70. Chevelkov V, et al., *¹⁵N H/D-SOLEXSY experiment for accurate measurement of amide solvent exchange rates: application to denatured drkN SH3*. J Biomol NMR, **2010**. 46(3): p. 227-44.
 71. Mohan PM, Chakraborty S and Hosur RV, *NMR investigations on residue level unfolding thermodynamics in DLC8 dimer by temperature dependent native state hydrogen exchange*. J Biomol NMR, **2009**. 44(1): p. 1-11.
 72. Mohan PM, Chakraborty S and Hosur RV, *Residue-wise conformational stability of DLC8 dimer from native-state hydrogen exchange*. Proteins, **2009**. 75(1): p. 40-52.
 73. Russu IM, *Probing site-specific energetics in proteins and nucleic acids by hydrogen exchange and nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Methods Enzymol, **2004**. 379: p. 152-75.
 74. Gueron M and Leroy JL, *Studies of base pair kinetics by NMR measurement of proton exchange*. Methods Enzymol, **1995**. 261: p. 383-413.
 75. Bocobza SE and Aharoni A, *Switching the light on plant riboswitches*. Trends Plant Sci, **2008**. 13(10): p. 526-33.
 76. Sudarsan N, Barrick JE and Breaker RR, *Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes*. RNA, **2003**. 9(6): p. 644-7.
 77. Croft MT, et al., *Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2007**. 104(52): p. 20770-5.
 78. Sharp PA, *The centrality of RNA*. Cell, **2009**. 136(4): p. 577-80.
 79. Waters LS and Storz G, *Regulatory RNAs in bacteria*. Cell, **2009**. 136(4): p. 615-28.

-
80. Narberhaus F and Vogel J, *Regulatory RNAs in prokaryotes: here, there and everywhere*. Mol Microbiol, **2009**. 74(2): p. 261-9.
 81. Dambach MD and Winkler WC, *Expanding roles for metabolite-sensing regulatory RNAs*. Curr Opin Microbiol, **2009**. 12(2): p. 161-9.
 82. Serganov A, *The long and the short of riboswitches*. Curr Opin Struct Biol, **2009**. 19(3): p. 251-9.
 83. Roth A and Breaker RR, *The structural and functional diversity of metabolite-binding riboswitches*. Annu Rev Biochem, **2009**. 78: p. 305-34.
 84. Montange RK and Batey RT, *Riboswitches: emerging themes in RNA structure and function*. Annu Rev Biophys, **2008**. 37: p. 117-33.
 85. Schwalbe H, et al., *Structures of RNA switches: insight into molecular recognition and tertiary structure*. Angew Chem Int Ed Engl, **2007**. 46(8): p. 1212-9.
 86. Narberhaus F, Waldminghaus T and Chowdhury S, *RNA thermometers*. FEMS Microbiol Rev, **2006**. 30(1): p. 3-16.
 87. Waldminghaus T, et al., *RNA thermometers are common in alpha- and gamma-proteobacteria*. Biol Chem, **2005**. 386(12): p. 1279-86.
 88. Nocker A, et al., *A mRNA-based thermosensor controls expression of rhizobial heat shock genes*. Nucleic Acids Res, **2001**. 29(23): p. 4800-7.
 89. Balsiger S, et al., *Replicon-specific regulation of small heat shock genes in Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol, **2004**. 186(20): p. 6824-9.
 90. Chowdhury S, et al., *Molecular basis for temperature sensing by an RNA thermometer*. Embo J, **2006**. 25(11): p. 2487-97.
 91. Waldminghaus T, et al., *FourU: a novel type of RNA thermometer in Salmonella*. Mol Microbiol, **2007**. 65(2): p. 413-24.
 92. Waldminghaus T, et al., *Generation of synthetic RNA-based thermosensors*. Biol Chem, **2008**. 389(10): p. 1319-26.
 93. Neupert J, Karcher D and Bock R, *Design of simple synthetic RNA thermometers for temperature-controlled gene expression in Escherichia coli*. Nucleic Acids Res, **2008**. 36(19): p. e124.
 94. Nonin S, Jiang F and Patel DJ, *Imino proton exchange and base-pair kinetics in the AMP-RNA aptamer complex*. J Mol Biol, **1997**. 268(2): p. 359-74.

-
95. Snoussi K and Leroy JL, *Imino proton exchange and base-pair kinetics in RNA duplexes*. *Biochemistry*, **2001**. 40(30): p. 8898-904.
 96. Chen C, et al., *Structural energetics and base-pair opening dynamics in sarcin-ricin domain RNA*. *Biochemistry*, **2006**. 45(45): p. 13606-13.
 97. Lee JH and Pardi A, *Thermodynamics and kinetics for base-pair opening in the P1 duplex of the Tetrahymena group I ribozyme*. *Nucleic Acids Res*, **2007**. 35(9): p. 2965-74.
 98. Lee JH, Jucker F and Pardi A, *Imino proton exchange rates imply an induced-fit binding mechanism for the VEGF165-targeting aptamer, Macugen*. *FEBS Lett*, **2008**. 582(13): p. 1835-9.
 99. Dupont JA and Snoussi K, *Mg(2+) modulation of EMCV IRES key activity fragment equilibria and r(G.C) base-pair kinetics*. *J Biol Phys*, **2009**. 35(3): p. 231-43.
 100. Vermeulen A, McCallum SA and Pardi A, *Comparison of the global structure and dynamics of native and unmodified tRNAval*. *Biochemistry*, **2005**. 44(16): p. 6024-33.
 101. Kochoyan M, Leroy JL and Gueron M, *Proton exchange and base-pair lifetimes in a deoxy-duplex containing a purine-pyrimidine step and in the duplex of inverse sequence*. *J Mol Biol*, **1987**. 196(3): p. 599-609.
 102. Leroy JL, et al., *Characterization of base-pair opening in deoxynucleotide duplexes using catalyzed exchange of the imino proton*. *J Mol Biol*, **1988**. 200(2): p. 223-38.
 103. Leroy JL, et al., *Evidence from base-pair kinetics for two types of adenine tract structures in solution: their relation to DNA curvature*. *Biochemistry*, **1988**. 27(25): p. 8894-8.
 104. Leroy JL, et al., *Proton exchange and internal motions in two chromomycin dimer-DNA oligomer complexes*. *Biochemistry*, **1991**. 30(23): p. 5653-61.
 105. Wärmländer S, Sen A and Leijon M, *Imino proton exchange in DNA catalyzed by ammonia and trimethylamine: evidence for a secondary long-lived open state of the base pair*. *Biochemistry*, **2000**. 39(3): p. 607-15.
 106. Gonzalez C, et al., *Structural study of a DNA.RNA hybrid duplex with a chiral phosphorothioate moiety by NMR: extraction of distance and torsion angle constraints and imino proton exchange rates*. *Biochemistry*, **1994**. 33(37): p. 11062-72.
 107. Maltseva TV, Zarytova VF and Chattopadhyaya J, *Base-pair exchange kinetics of the imino and amino protons of the 3'-phenazinium tethered DNA-*

-
- RNA duplex, r(5'GAUUGAA3'):d(5'TCAATC3'-Pzn), and their comparison with those of B-DNA duplex.* J Biochem Biophys Methods, **1995**. 30(2-3): p. 163-77.
108. Huang Y, Chen C and Russu IM, *Dynamics and stability of individual base pairs in two homologous RNA-DNA hybrids.* Biochemistry, **2009**. 48(18): p. 3988-97.
109. Piotto M, Saudek V and Sklenar V, *Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions.* J Biomol NMR, **1992**. 2(6): p. 661-5.
110. Shaka AJ, Barker PB and Freeman RJ, *Computer-optimized decoupling scheme for wideband applications and low-level operation.* J Magn Reson, **1985**. 64: p. 547-552.
111. Jahnke W, et al., *Improved Accuracy of NMR Structures by a Modified NOESY-HSQC Experiment.* J Magn Reson, Series B, **1995**. 106(1): p. 86-88.
112. Bodenhausen G and Ruben DJ, *Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy.* Chemical Physics Letters, **1980**. 69(1): p. 185-189.
113. Sklenar V, et al., *Gradient-Tailored Water Suppression for 1H-15N HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity.* J Magn Reson, Series A, **1993**. 102(2): p. 241-245.
114. Dingley AJ, et al., *Direct detection of N-H[...N hydrogen bonds in biomolecules by NMR spectroscopy.* Nat Protoc, **2008**. 3(2): p. 242-8.
115. Wöhnert J, Görlach M and Schwalbe H, *Triple resonance experiments for the simultaneous correlation of H6/H5 and exchangeable protons of pyrimidine nucleotides in 13C,15N-labeled RNA applicable to larger RNA molecules.* J Biomol NMR, **2003**. 26(1): p. 79-83.
116. Wöhnert J, et al., *Triple-resonance experiments for correlation of H5 and exchangeable pyrimidine base hydrogens in (13)C,(15)N-labeled RNA.* J Magn Reson, **1999**. 139(2): p. 430-3.
117. Sklenar V, et al., *Two- and three-dimensional HCN experiments for correlating base and sugar resonances in 15N,13C-labeled RNA oligonucleotides.* J Biomol NMR, **1993**. 3(6): p. 721-7.
118. Fiala R, Jiang F and Sklenář V, *Sensitivity optimized HCN and HCNCH experiments for 13C/15N labeled oligonucleotides.* J Biomol NMR, **1998**. 12(3): p. 373-383.

-
119. Fiala R, Czernek J and Sklenar V, *Transverse relaxation optimized triple-resonance NMR experiments for nucleic acids*. J Biomol NMR, **2000**. 16(4): p. 291-302.
 120. Rinnenthal J and Schwalbe H, *HNHC: a triple resonance experiment for correlating the H2, N1(N3) and C2 resonances in adenine nucleobases of ¹³C-, ¹⁵N-labeled RNA oligonucleotides*. J Biomol NMR, **2009**. 44(2): p. 101-5.
 121. Simon B, Zanier K and Sattler M, *A TROSY relayed HCCH-COSY experiment for correlating adenine H2/H8 resonances in uniformly ¹³C-labeled RNA molecules*. J Biomol NMR, **2001**. 20(2): p. 173-6.
 122. Ono A, et al., *Preparation and heteronuclear 2D NMR spectroscopy of a DNA dodecamer containing a thymidine residue with a uniformly ¹³C-labeled deoxyribose ring*. J Biomol NMR, **1994**. 4(4): p. 581-6.
 123. Schleucher J, Sattler M and Griesinger C, *Coherence Selection by Gradients without Signal Attenuation: Application to the Three-Dimensional HNCO Experiment*. Angew Chem Int Ed, **1993**. 32(10): p. 1489-1491.
 124. Grzesiek S and Bax A, *Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein*. J Magn Reson, **1992**. 96(2): p. 432-440.
 125. Kay LE, Xu GY and Yamazaki T, *Enhanced-Sensitivity Triple-Resonance Spectroscopy with Minimal H₂O Saturation*. J Magn Reson, Series A, **1994**. 109(1): p. 129-133.
 126. Fürtig B, et al., *New NMR experiments for RNA nucleobase resonance assignment and chemical shift analysis of an RNA UUCG tetraloop*. J Biomol NMR, **2004**. 28(1): p. 69-79.
 127. Kay LE, et al., *A Gradient-Enhanced HCCH-TOCSY Experiment for Recording Side-Chain ¹H and ¹³C Correlations in H₂O Samples of Proteins*. J Magn Reson, Series B, **1993**. 101(3): p. 333-337.
 128. Noeske J, *Strukturelle Untersuchungen an Metabolit-bindenden Riboswitch-RNAs mittels NMR*, in *Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie*. **2007**, Johann Wolfgang Goethe-Universität: Frankfurt am Main.
 129. Stoldt M, et al., *The NMR structure of the 5S rRNA E-domain-protein L25 complex shows preformed and induced recognition*. Embo J, **1999**. 18(22): p. 6508-21.
 130. Hunter CA and Anderson HL, *What is cooperativity?* Angew Chem Int Ed Engl, **2009**. 48(41): p. 7488-99.

-
131. *Handbook of Chemistry and Physics*. 55th ed, ed. R.C. WEAST. 1974: CRC PRESS.
 132. Feller SE, et al., *Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method*. J Chem Phys, **1995**. 103(11): p. 4613-4621.
 133. Noeske J, Schwalbe H and Wöhnert J, *Metal-ion binding and metal-ion induced folding of the adenine-sensing riboswitch aptamer domain*. Nucleic Acids Res, **2007**. 35(15): p. 5262-73.
 134. Kang RS, et al., *Solution structure of a CUE-ubiquitin complex reveals a conserved mode of ubiquitin binding*. Cell, **2003**. 113(5): p. 621-30.
 135. Searle MS and Williams DH, *On the stability of nucleic acid structures in solution: enthalpy-entropy compensations, internal rotations and reversibility*. Nucleic Acids Res, **1993**. 21(9): p. 2051-6.
 136. Vokacova Z, et al., *Structure and Dynamics of the ApA, ApC, CpA, and CpC RNA Dinucleoside Monophosphates Resolved with NMR Scalar Spin-Spin Couplings*. J Phys Chem B, **2009**. 113(4): p. 1182-1191.
 137. Chen SJ and Dill KA, *RNA folding energy landscapes*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2000**. 97(2): p. 646-51.
 138. Dewey TG and Turner DH, *Laser temperature-jump study of stacking in adenylic acid polymers*. Biochemistry, **1979**. 18(26): p. 5757-62.
 139. Vesnaver G and Breslauer KJ, *The contribution of DNA single-stranded order to the thermodynamics of duplex formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1991**. 88(9): p. 3569-73.
 140. Sharp K, *Entropy-enthalpy compensation: fact or artifact?* Protein Science, **2001**. 10(3): p. 661-7.
 141. Folta-Stogniew E and Russu IM, *Sequence dependence of base-pair opening in a DNA dodecamer containing the CACA/GTGT sequence motif*. Biochemistry, **1994**. 33(36): p. 11016-24.
 142. Chen C and Russu IM, *Sequence-dependence of the energetics of opening of AT basepairs in DNA*. Biophys J, **2004**. 87(4): p. 2545-51.
 143. Rufus L and Shyamala R, *Enthalpy-entropy compensation phenomena in water solutions of proteins and small molecules: A ubiquitous property of water*. Biopolymers, **1970**. 9(10): p. 1125-1227.
 144. Strazewski P, *Thermodynamic correlation analysis: hydration and perturbation sensitivity of RNA secondary structures*. J Am Chem Soc, **2002**. 124(14): p. 3546-54.

-
145. Auffinger P and Westhof E, *Melting of the solvent structure around a RNA duplex: a molecular dynamics simulation study*. Biophys Chem, **2002**. 95(3): p. 203-10.
 146. Klinkert B and Narberhaus F, unpublished results, **2009**.
 147. Kieft JS and Tinoco Jr I, *Solution structure of a metal-binding site in the major groove of RNA complexed with cobalt (III) hexammine*. Structure, **1997**. 5(5): p. 713-721.
 148. Hansen AL and Al-Hashimi HM, *Dynamics of large elongated RNA by NMR carbon relaxation*. J Am Chem Soc, **2007**. 129(51): p. 16072-82.
 149. Hobartner C and Micura R, *Bistable secondary structures of small RNAs and their structural probing by comparative imino proton NMR spectroscopy*. J Mol Biol, **2003**. 325(3): p. 421-31.
 150. Hobartner C, et al., *Triggering of RNA secondary structures by a functionalized nucleobase*. Angew Chem Int Ed Engl, **2004**. 43(30): p. 3922-5.
 151. Wenter P, et al., *Kinetics of photoinduced RNA refolding by real-time NMR spectroscopy*. Angew Chem Int Ed Engl, **2005**. 44(17): p. 2600-3.
 152. Wenter P, et al., *A caged uridine for the selective preparation of an RNA fold and determination of its refolding kinetics by real-time NMR*. ChemBioChem, **2006**. 7(3): p. 417-20.
 153. Fürtig B, et al., *Conformational dynamics of bistable RNAs studied by time-resolved NMR spectroscopy*. J Am Chem Soc, **2007**. 129(51): p. 16222-9.
 154. Tucker BJ and Breaker RR, *Riboswitches as versatile gene control elements*. Curr Opin Struct Biol, **2005**. 15(3): p. 342-8.
 155. Winkler WC, *Riboswitches and the role of noncoding RNAs in bacterial metabolic control*. Curr Opin Chem Biol, **2005**. 9(6): p. 594-602.
 156. Lang K, Rieder R and Micura R, *Ligand-induced folding of the thiM TPP riboswitch investigated by a structure-based fluorescence spectroscopic approach*. Nucleic Acids Res, **2007**. 35(16): p. 5370-8.
 157. Rieder R, et al., *Ligand-induced folding of the adenosine deaminase A-riboswitch and implications on riboswitch translational control*. ChemBioChem, **2007**. 8(8): p. 896-902.
 158. Zhang Q, et al., *Visualizing spatially correlated dynamics that directs RNA conformational transitions*. Nature, **2007**. 450(7173): p. 1263-7.

-
159. Ferner J, et al., *Structures of HIV TAR RNA-Ligand Complexes Reveal Higher Binding Stoichiometries*. ChemBioChem, **2009**.
 160. Miller JL and Kollman PA, *Theoretical studies of an exceptionally stable RNA tetraloop: observation of convergence from an incorrect NMR structure to the correct one using unrestrained molecular dynamics*. J Mol Biol, **1997**. 270(3): p. 436-50.
 161. Williams DJ and Hall KB, *Unrestrained Stochastic Dynamics Simulations of the UUCG Tetraloop Using an Implicit Solvation Model*. Biophys J, **1999**. 76(6): p. 3192-3205.
 162. Williams DJ and Hall KB, *Experimental and theoretical studies of the effects of deoxyribose substitutions on the stability of the UUCG tetraloop*. J Mol Biol, **2000**. 297(1): p. 251-65.
 163. Nina M and Simonson T, *Molecular Dynamics of the tRNA(Ala) Acceptor Stem: Comparison between Continuum Reaction Field and Particle-Mesh Ewald Electrostatic Treatments*. J Phys Chem B, **2002**. 106(14): p. 3696-3705.
 164. Showalter SA, et al., *Iron responsive element RNA flexibility described by NMR and isotropic reorientational eigenmode dynamics*. J Biomol NMR, **2005**. 32(3): p. 179-93.
 165. Villa A and Stock G, *What NMR Relaxation Can Tell Us about the Internal Motion of an RNA Hairpin: A Molecular Dynamics Simulation Study*. J. Chem. Theory Comput., **2006**. 2(5): p. 1228-1236.
 166. Koplín J, et al., *Structure and dynamics of an RNA tetraloop: a joint molecular dynamics and NMR study*. Structure, **2005**. 13(9): p. 1255-67.
 167. Duchardt E, Nilsson L and Schleucher J, *Cytosine ribose flexibility in DNA: a combined NMR ^{13}C spin relaxation and molecular dynamics simulation study*. Nucleic Acids Res, **2008**. 36(12): p. 4211-9.
 168. Ferner J, et al., *NMR and MD studies of the temperature-dependent dynamics of RNA YNMG-tetraloops*. Nucleic Acids Res, **2008**. 36(6): p. 1928-40.
 169. Duchardt E and Schwalbe H, *Residue specific ribose and nucleobase dynamics of the cUUCGg RNA tetraloop motif by NMR ^{13}C relaxation*. J Biomol NMR, **2005**. 32(4): p. 295-308.
 170. Shajani Z and Varani G, *^{13}C NMR relaxation studies of RNA base and ribose nuclei reveal a complex pattern of motions in the RNA binding site for human U1A protein*. J Mol Biol, **2005**. 349(4): p. 699-715.

-
171. Shajani Z and Varani G, *NMR studies of dynamics in RNA and DNA by ^{13}C relaxation*. *Biopolymers*, **2007**. 86(5-6): p. 348-59.
 172. Johnson JE, Jr., Julien KR and Hoogstraten CG, *Alternate-site isotopic labeling of ribonucleotides for NMR studies of ribose conformational dynamics in RNA*. *J Biomol NMR*, **2006**. 35(4): p. 261-74.
 173. Johnson JE and Hoogstraten CG, *Extensive Backbone Dynamics in the GCAA RNA Tetraloop Analyzed Using (^{13}C) NMR Spin Relaxation and Specific Isotope Labeling*. *J Am Chem Soc*, **2008**. 130(49): p. 16757-69.
 174. Hoogstraten CG, Wank JR and Pardi A, *Active site dynamics in the lead-dependent ribozyme*. *Biochemistry*, **2000**. 39(32): p. 9951-8.
 175. Blad H, et al., *Dynamics and metal ion binding in the U6 RNA intramolecular stem-loop as analyzed by NMR*. *J Mol Biol*, **2005**. 353(3): p. 540-55.
 176. Oberstrass FC, Allain FH and Ravindranathan S, *Changes in dynamics of SRE-RNA on binding to the VTS1p-SAM domain studied by ^{13}C NMR relaxation*. *J Am Chem Soc*, **2008**. 130(36): p. 12007-20.
 177. Hansen AL, et al., *Extending the range of microsecond-to-millisecond chemical exchange detected in labeled and unlabeled nucleic acids by selective carbon $R(\rho)$ NMR spectroscopy*. *J Am Chem Soc*, **2009**. 131(11): p. 3818-9.
 178. Olsen JI, et al., *Carbon-13 NMR relaxation studies of pre-melt structural dynamics in [4- ^{13}C -uracil] labeled *E. coli* transfer RNA^{IVa}*. *Nucleic Acids Res*, **1982**. 10(14): p. 4449-64.
 179. Schmidt PG, Playl T and Agris PF, *Internal dynamics of transfer ribonucleic acid determined by nuclear magnetic resonance of carbon-13-enriched ribose carbon 1*. *Biochemistry*, **1983**. 22(6): p. 1408-15.
 180. Schmidt PG, Sierzputowska-Gracz H and Agris PF, *Internal motions in yeast phenylalanine transfer RNA from ^{13}C NMR relaxation rates of modified base methyl groups: a model-free approach*. *Biochemistry*, **1987**. 26(26): p. 8529-34.
 181. Williamson JR and Boxer SG, *Multinuclear NMR studies of DNA hairpins. 1. Structure and dynamics of d(CGCGTTGTTGCG)*. *Biochemistry*, **1989**. 28(7): p. 2819-31.
 182. Williamson JR and Boxer SG, *Multinuclear NMR studies of DNA hairpins. 2. Sequence-dependent structural variations*. *Biochemistry*, **1989**. 28(7): p. 2831-6.

-
183. Kojima C, et al., *DNA duplex dynamics: NMR relaxation studies of a decamer with uniformly ^{13}C -labeled purine nucleotides*. *J Magn Reson*, **1998**. 135(2): p. 310-33.
 184. Boisbouvier J, et al., *^{13}C spin relaxation measurements in RNA: Sensitivity and resolution improvement using spin-state selective correlation experiments*. *J Biomol NMR*, **1999**. 14(3): p. 241-252.
 185. Lane AN, et al., *Interaction of berenil with the EcoRI dodecamer $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$ in solution studied by NMR*. *Biochemistry*, **1991**. 30(5): p. 1372-85.
 186. Borer PN, et al., *^{13}C -NMR relaxation in three DNA oligonucleotide duplexes: model-free analysis of internal and overall motion*. *Biochemistry*, **1994**. 33(9): p. 2441-50.
 187. Spielmann HP, *Dynamics in psoralen-damaged DNA by ^1H -detected natural abundance ^{13}C NMR spectroscopy*. *Biochemistry*, **1998**. 37(16): p. 5426-38.
 188. Akke M, et al., *Base dynamics in a UUCG tetraloop RNA hairpin characterized by ^{15}N spin relaxation: correlations with structure and stability*. *RNA*, **1997**. 3(7): p. 702-9.
 189. Kan JH, et al., *The dynamical structure of the RNA in alfalfa mosaic virus studied by ^3P -nuclear magnetic resonance*. *Eur J Biochem*, **1987**. 168(3): p. 635-9.
 190. Magusin PC and Hemminga MA, *Analysis of ^3P MAS NMR spectra and transversal relaxation of bacteriophage M13 and tobacco mosaic virus*. *Biophys J*, **1994**. 66(4): p. 1197-208.
 191. Odahara T, et al., *Dynamic Properties of Nucleic Acids in Biosupramolecular Systems, as Studied by ^3P NMR*. *J Biochem*, **1994**. 115(2): p. 270-278.
 192. Varani G and Tinoco I, Jr., *RNA structure and NMR spectroscopy*. *Q Rev Biophys*, **1991**. 24(4): p. 479-532.
 193. Allain FH and Varani G, *Structure of the P1 helix from group I self-splicing introns*. *J Mol Biol*, **1995**. 250(3): p. 333-53.
 194. Lynch SR and Puglisi JD, *Structure of a eukaryotic decoding region A-site RNA*. *J Mol Biol*, **2001**. 306(5): p. 1023-35.
 195. Nozinovic S, et al., *High-resolution NMR structure of an RNA model system: the 14-mer $c\text{UUCGg}$ tetraloop hairpin RNA*. *Nucleic Acids Res*, **2010**. 38(2): p. 683-94.

-
196. Ennifar E, et al., *The crystal structure of UUCG tetraloop*. J Mol Biol, **2000**. 304(1): p. 35-42.
 197. Villa A, Widjajakusuma E and Stock G, *Molecular dynamics simulation of the structure, dynamics, and thermostability of the RNA hairpins uCACGg and cUUCGg*. J Phys Chem B, **2008**. 112(1): p. 134-42.
 198. Williams DJ, Boots JL and Hall KB, *Thermodynamics of 2'-ribose substitutions in UUCG tetraloops*. RNA, **2001**. 7(1): p. 44-53.
 199. Mandel AM, Akke M and Palmer IIIAG, *Backbone Dynamics of Escherichia coli Ribonuclease HI: Correlations with Structure and Function in an Active Enzyme*. J Mol Biol, **1995**. 246(1): p. 144-163.
 200. d'Auvergne EJ and Gooley PR, *The use of model selection in the model-free analysis of protein dynamics*. J Biomol NMR, **2003**. 25(1): p. 25-39.
 201. Garcia de la Torre J, Huertas ML and Carrasco B, *HYDRONMR: prediction of NMR relaxation of globular proteins from atomic-level structures and hydrodynamic calculations*. J Magn Reson, **2000**. 147(1): p. 138-46.
 202. Herzfeld J, Griffin RG and Haberkorn RA, *³¹P chemical-shift tensors in barium diethyl phosphate and urea-phosphoric acid: model compounds for phospholipid head-group studies*. Biochemistry, **1978**. 17(14): p. 2711-2718.
 203. Marino JP, et al., *Three-Dimensional Triple-Resonance ¹H, ¹³C, ³¹P Experiment: Sequential Through-Bond Correlation of Ribose Protons and Intervening Phosphorus along the RNA Oligonucleotide Backbone*. J Am Chem Soc, **1994**. 116(14): p. 6472-6473.
 204. Marino JP, et al., *Sequential correlation of anomeric ribose protons and intervening phosphorus in RNA oligonucleotides by a ¹H, ¹³C, ³¹P triple resonance experiment: HCP-CCH-TOCSY*. J Biomol NMR, **1995**. 5(1): p. 87-92.
 205. Kellogg GW, *Proton-detected hetero-TOCSY experiments with application to nucleic acids*. J Magn Reson (1969), **1992**. 98(1): p. 176-182.
 206. Fushman D, Tjandra N and Cowburn D, *Direct Measurement of ¹⁵N Chemical Shift Anisotropy in Solution*. J Am Chem Soc, **1998**. 120(42): p. 10947-10952.
 207. Kroenke CD, Rance M and Palmer AG, *Variability of the ¹⁵N Chemical Shift Anisotropy in Escherichia coli Ribonuclease H in Solution*. J Am Chem Soc, **1999**. 121(43): p. 10119-10125.
 208. Loth K, Pelupessy P and Bodenhausen G, *Chemical shift anisotropy tensors of carbonyl, nitrogen, and amide proton nuclei in proteins through cross-*

-
- correlated relaxation in NMR spectroscopy*. J Am Chem Soc, **2005**. 127(16): p. 6062-8.
209. Hall JB and Fushman D, *Variability of the ^{15}N chemical shielding tensors in the B3 domain of protein G from ^{15}N relaxation measurements at several fields. Implications for backbone order parameters*. J Am Chem Soc, **2006**. 128(24): p. 7855-70.
210. Yao L, et al., *Site-specific backbone amide (^{15}N) chemical shift anisotropy tensors in a small protein from liquid crystal and cross-correlated relaxation measurements*. J Am Chem Soc, **2010**. 132(12): p. 4295-309.
211. Terao T, Matsui S and Akasaka K, *Phosphorus-31 chemical shift anisotropy in solid nucleic acids*. J Am Chem Soc, **1977**. 99(18): p. 6136-6138.
212. Heisaburo S, *NMR relaxation processes of ^{31}P in macromolecules*. Biopolymers, **1980**. 19(3): p. 509-522.
213. Reichert D, et al., *A solid-state NMR study of the fast and slow dynamics of collagen fibrils at varying hydration levels*. Magn Reson Chem, **2004**. 42(2): p. 276-284.
214. Hemminga MA, et al., *Magic-angle-spinning NMR on solid biological systems. Analysis Of the origin of the spectral linewidths*. J Magn Reson (1969), **1987**. 71(3): p. 446-460.
215. Magusin PC and Hemminga MA, *A theoretical study of rotational diffusion models for rod-shaped viruses. The influence of motion on ^{31}P nuclear magnetic resonance lineshapes and transversal relaxation*. Biophys J, **1993**. 64(6): p. 1851-60.
216. Precechtelova J, et al., *^{31}P chemical shift tensors for canonical and non-canonical conformations of nucleic acids: a DFT study and NMR implications*. J Phys Chem B, **2008**. 112(11): p. 3470-8.
217. Catoire LJ, *Phosphorus-31 transverse relaxation rate measurements by NMR spectroscopy: insight into conformational exchange along the nucleic acid backbone*. J Biomol NMR, **2004**. 28(2): p. 179-84.
218. Vallurupalli P and Kay LE, *A suite of ^2H NMR spin relaxation experiments for the measurement of RNA dynamics*. J Am Chem Soc, **2005**. 127(18): p. 6893-901.
219. Batey RT, et al., *Preparation of isotopically labeled ribonucleotides for multidimensional NMR spectroscopy of RNA*. Nucleic Acids Res, **1992**. 20(17): p. 4515-23.

-
220. Nikonowicz EP, et al., *Preparation of ^{13}C and ^{15}N labelled RNAs for heteronuclear multi-dimensional NMR studies*. *Nucleic Acids Res*, **1992**. 20: p. 4507-4513.
221. Quant S, et al., *Chemical Synthesis of ^{13}C -labelled Monomers for Solid-Phase and Template Controlled Enzymatic Synthesis of DNA and RNA Oligomers*. *Tetrahedron Letters*, **1994**. 35(36): p. 6649-6652.
222. Batey RT, Battiste JL and Williamson JR, *Preparation of isotopically enriched RNAs for heteronuclear NMR*. *Methods Enzymol*, **1995**. 261: p. 300-22.
223. Cromsig J, et al., *Resonance assignment and structure determination for RNA*. *Methods Enzymol*, **2001**. 338: p. 371-99.
224. Schwalbe H, et al., *Determination of a complete set of coupling constants in ^{13}C -labeled oligonucleotides*. *J Biomol NMR*, **1994**. 4(5): p. 631-44.
225. Trantirek L, et al., *Determination of the glycosidic torsion angles in uniformly ^{13}C -labeled nucleic acids from vicinal coupling constants $3J(\text{C}2)/4\text{-H}1'$ and $3J(\text{C}6)/8\text{-H}1'$* . *J Biomol NMR*, **2002**. 23(1): p. 1-12.
226. Munzarova ML and Sklenar V, *DFT analysis of NMR scalar interactions across the glycosidic bond in DNA*. *J Am Chem Soc*, **2003**. 125(12): p. 3649-58.
227. Duchardt E, et al., *Determination of the glycosidic bond angle χ in RNA from cross-correlated relaxation of CH dipolar coupling and N chemical shift anisotropy*. *J Am Chem Soc*, **2004**. 126(7): p. 1962-70.
228. Pelupessy P, et al., *Efficient determination of angles subtended by C(α)-H(α) and N-H(N) vectors in proteins via dipole-dipole cross-correlation*. *J Biomol NMR*, **1999**. 13(4): p. 375-80.
229. Carlomagno T, et al., *Determination of aliphatic side-chain conformation using cross-correlated relaxation: application to an extraordinarily stable 2'-aminoethoxy-modified oligonucleotide triplex*. *J Am Chem Soc*, **2001**. 123(30): p. 7364-70.
230. Boisbouvier J and Bax A, *Long-range magnetization transfer between uncoupled nuclei by dipole-dipole cross-correlated relaxation: a precise probe of beta-sheet geometry in proteins*. *J Am Chem Soc*, **2002**. 124(37): p. 11038-45.
231. Kloiber K, Schuler W and Konrat R, *Automated NMR determination of protein backbone dihedral angles from cross-correlated spin relaxation*. *J Biomol NMR*, **2002**. 22(4): p. 349-63.

-
232. Zwahlen C and Vincent SJ, *Determination of (1)H homonuclear scalar couplings in unlabeled carbohydrates*. J Am Chem Soc, **2002**. 124(24): p. 7235-9.
233. Ilin S, et al., *Gamma-HMBC: an NMR experiment for the conformational analysis of the o-glycosidic linkage in glycopeptides*. Angew Chem Int Ed, **2003**. 42(12): p. 1394-7.
234. Carlomagno T, et al., *Transferred Cross-Correlated Relaxation: Application to the Determination of Sugar Pucker in an Aminoacylated tRNA-Mimetic Weakly Bound to EF-Tu*. J Am Chem Soc, **1999**. 121: p. 1945-1948.
235. Felli I, et al., *Determination of RNA Sugar Pucker Mode from Cross-Correlated Relaxation in Solution NMR Spectroscopy*. J Am Chem Soc, **1999**. 121: p. 1956-1957.
236. Richter C, et al., *Determination of sugar conformation in large RNA oligonucleotides from analysis of dipole-dipole cross correlated relaxation by solution NMR spectroscopy*. J Biomol NMR, **1999**. 15(3): p. 241-50.
237. Sychrovsky V, et al., *Sugar pucker modulates the cross-correlated relaxation rates across the glycosidic bond in DNA*. J Am Chem Soc, **2005**. 127(42): p. 14663-7.
238. Banci L, et al., *Side chain mobility as monitored by CH-CH cross correlation: the example of cytochrome b5*. J Biomol NMR, **2001**. 20(1): p. 1-10.
239. Ravindranathan S, Kim CH and Bodenhausen G, *Cross correlations between ¹³C-¹H dipolar interactions and ¹⁵N chemical shift anisotropy in nucleic acids*. J Biomol NMR, **2003**. 27(4): p. 365-75.
240. Tugarinov V and Kay LE, *¹H,¹³C-¹H,¹H dipolar cross-correlated spin relaxation in methyl groups*. J Biomol NMR, **2004**. 29(3): p. 369-76.
241. Markwick PR, Sprangers R and Sattler M, *Local structure and anisotropic backbone dynamics from cross-correlated NMR relaxation in proteins*. Angew Chem Int Ed, **2005**. 44(21): p. 3232-7.
242. Wang T, et al., *Changes in calmodulin main-chain dynamics upon ligand binding revealed by cross-correlated NMR relaxation measurements*. J Am Chem Soc, **2005**. 127(3): p. 828-9.
243. Stueber D and Grant DM, *¹³C and ¹⁵N chemical shift tensors in adenosine, guanosine dihydrate, 2'-deoxythymidine, and cytidine*. J Am Chem Soc, **2002**. 124(35): p. 10539-51.

-
244. Brumovska E, et al., *Effect of local sugar and base geometry on ^{13}C and ^{15}N magnetic shielding anisotropy in DNA nucleosides*. J Biomol NMR, **2008**. 42(3): p. 209-23.
245. Ohlenschläger O, et al., *The structure of the stemloop D subdomain of coxsackievirus B3 cloverleaf RNA and its interaction with the proteinase 3C*. Structure, **2004**. 12(2): p. 237-48.
246. Foloppe N and MacKerell Jr. AD, *All-atom empirical force field for nucleic acids: I. Parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data*. J Comp Chem, **2000**. 21(2): p. 86-104.
247. MacKerell Jr AD and Banavali NK, *All-atom empirical force field for nucleic acids: II. Application to molecular dynamics simulations of DNA and RNA in solution*. J Comp Chem, **2000**. 21(2): p. 105-120.
248. Jorgensen WL, et al., *Comparison of simple potential functions for simulating liquid water*. J Chem Phys, **1983**. 79(2): p. 926-935.
249. Fiala R, Munzarova ML and Sklenar V, *Experiments for correlating quaternary carbons in RNA bases*. J Biomol NMR, **2004**. 29(4): p. 477-90.
250. Ban N, et al., *The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution*. Science, **2000**. 289(5481): p. 905-20.
251. Vugmeyster L, et al., *Cross-correlated relaxation in NMR of macromolecules in the presence of fast and slow internal dynamics*. C. R. Physique 5, **2004**: p. 377-386.
252. Schneider H, Z Naturforsch Teil A, **1964**. 19: p. 510.
253. Hubbard PS, *Nonexponential Relaxation of Three-Spin Systems in Nonspherical Molecules*. J Chem Phys, **1969**. 51: p. 1647.
254. Sklenar V, et al., *Two-dimensional triple-resonance HCNCH experiment for direct correlation of ribose H1' and base H8, H6 protons in ^{13}C , ^{15}N -labeled RNA oligonucleotides*. J Am Chem Soc, **1993**. 115(25): p. 12181-12182.
255. Sklenar V, et al., *Optimization of triple-resonance HCN experiments for application to larger RNA oligonucleotides*. J Magn Reson, **1998**. 130(1): p. 119-24.
256. Millet O, et al., *Measurement of Relaxation Rates of NH and Ha Backbone Protons in Proteins with Tailored Initial Conditions*. J Magn Reson, **1999**. 139: p. 434-438.

-
257. Roehrl MH, Heffron GJ and Wagner G, *Correspondence between spin-dynamic phases and pulse program phases of NMR spectrometers*. J Magn Reson, **2005**. 174(2): p. 325-30.
258. Emsley L and Bodenhausen G, *Optimization of Shaped Selective Pulses for NMR Using a Quaternion Description of Their Overall Propagators*. J Magn Reson, **1992**. 97: p. 135-148.
259. Geen HF and Freeman R, *Band-Selective Radiofrequency Pulses*. J Magn Reson, **1991**. 93: p. 93-141.
260. Kay L, Keifer P and Saarinen T, *Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity*. J Am Chem Soc, **1992**. 114(26): p. 10663-10665.
261. Marion D, et al., *Rapid Recording of 2D NMR Spectra without Phase Cycling. Application to the Study of Hydrogen Exchange in Proteins*. J Magn Reson, **1989**. 85: p. 393-399.
262. Ying J, Grishaev A and Bax A, *Carbon-13 chemical shift anisotropy in DNA bases from field dependence of solution NMR relaxation rates*. Magn Reson Chem, **2006**. 44: p. 302-310.
263. Haasnoot CAG, et al., *The relationship between proton-proton NMR coupling constants and substituent electronegativities. II - conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides in solution using a generalized Karplus equation*. Org Magn Reson, **1981**. 15(1): p. 43-52.
264. Griesinger C and Eggenberger U, *Determination of proton-proton coupling constants in ¹³C-labeled molecules*. J Magn Reson, **1992**. 97(2): p. 426-434.
265. Schwalbe H, et al., *Measurement of H,H-Coupling Constants Associated with .nu.1, .nu.2, and .nu.3 in Uniformly ¹³C-Labeled RNA by HCC-TOCSY-CCH-E.COSY*. J Am Chem Soc, **1995**. 117(27): p. 7251-7252.
266. Marino JP, et al., *Determination of γ and Stereospecific Assignment of H5' Protons by Measurement of 2J and 3J Coupling Constants in Uniformly ¹³C Labeled RNA*. J Am Chem Soc, **1996**. 118(18): p. 4388-4395.
267. Glaser SJ, et al., *Directed TOCSY, a Method for Selection of Directed Correlations by Optimal Combinations of Isotropic and Longitudinal Mixing*. J Magn Reson, Series B, **1996**. 112(2): p. 160-180.
268. Felli IC, et al., *Determination of RNA Sugar Pucker Mode from Cross-Correlated Relaxation in Solution NMR Spectroscopy*. J Am Chem Soc, **1999**. 121(9): p. 1956-1957.

269. van Dongen MJ, et al., *Through-bond correlation of adenine H2 and H8 protons in unlabeled DNA fragments by HMBC spectroscopy*. J Biomol NMR, **1996**. 8(2): p. 207-12.
270. Nietlispach D, *Suppression of anti-TROSY lines in a sensitivity enhanced gradient selection TROSY scheme*. J Biomol NMR, **2005**. 31(2): p. 161-6.
271. Sklenar V, *Suppression of Radiation Damping in Multidimensional NMR Experiments Using Magnetic Field Gradients*. J Magn Reson, Series A, **1995**. 114(1): p. 132-135.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Harald Schwalbe dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Ich möchte mich außerdem für das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken, mich auf mehreren, interessanten Projekten gleichzeitig arbeiten zu lassen. Die damit verbundene Vielseitigkeit an unterschiedlichen wissenschaftlichen Fragestellungen habe ich als großes Privileg empfunden, da sie meine Arbeit stets kurzweilig erscheinen ließ und mir gleichzeitig die Möglichkeit gegeben hat, mein Wissen auf vielen Gebieten zu erweitern. Ich möchte mich für die Unterstützung bei meinen Projekten bedanken, die immer da war, wenn ich sie benötigte und für die Freiheit, selbstständig an meinen Projekten arbeiten zu dürfen.

Christian Richter möchte ich für die Hilfe an den NMR-Spektrometern danken. Besonders in Momenten, in denen irgendetwas kaputt gegangen ist, man verzweifelt vor dem Spektrometer gesessen hat und sonst auch keiner da war, weil Feiertag oder Wochenende war, war ich außerordentlich dankbar Deine Telefonnummer zu haben.

Anna Paulus und Elena Hartmann möchte ich für die ausgezeichnete Arbeit, die sie bei der Organisation des Arbeitskreises aus dem Sekretariat heraus geleistet haben, danken. Außerdem bedanken möchte ich mich für die stets freundliche Art und Weise mit der dies geschah, auch dann, wenn es gerade einmal stressig oder unpassend sein mochte. Ach ja, und das gelegentliche Gläschen Wein mit Euch habe ich auch sehr genossen.

Elke Stinal möchte ich für Ihre professionelle und gewissenhafte Arbeitseinstellung danken, von der ich glücklicherweise profitieren durfte. Dies betrifft vor allem die Durchführung der vielen HPLC-Läufe meiner RNA-Proben aber auch die Bestellung von Laborutensilien. Ich kann mich nicht an einen HPLC-Lauf erinnern, der schiefgelaufen ist! Danke Elke für den gewissenhaften Umgang mit meinen Proben.

Prof. Dr. Clemens Glaubitz und Jakob Lopez möchte ich für die gute Zusammenarbeit auf dem Phosphor-CSA-Projekt danken. Danke Jakob, es hat mir echt Spaß gemacht.

Prof. Dr. Franz Narberhaus, Birgit Klinkert und Jens Kortmann danke ich für die gute Zusammenarbeit auf den RNA-Thermometer-Projekten.

Den Mitgliedern des *Horizon Room* Senada Nozinovic, Katja Barthelmes, Christian Gerum und neuerdings auch Mirko Cevce möchte ich für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre danken.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für das gute und konstruktive Arbeitsklima sowie die gegenseitige Hilfsbereitschaft.

Meiner Familie möchte ich für die Unterstützung während meines Studiums und meiner Doktorarbeit danken. Vor allem möchte ich ihr aber einfach nur dafür danken, dass es sie gibt und ich hoffe, dass das noch sehr, sehr lange so bleibt.

10 Publikationen

Rinnenthal J, Richter C, Ferner J, Duchardt E and Schwalbe H (2007)
Quantitative Γ -HCNCH: determination of the glycosidic torsion angle χ in RNA oligonucleotides from the analysis of CH dipolar cross-correlated relaxation by solution NMR spectroscopy.

J Biomol NMR, 39(1): p. 17-29.

PMID: 17641824

Rinnenthal J and Schwalbe H (2009)

HNHC: a triple resonance experiment for correlating the H2, N1(N3) and C2 resonances in adenine nucleobases of ^{13}C -, ^{15}N -labeled RNA oligonucleotides.

J Biomol NMR, 44(2): p. 101-5.

PMID: 19424666

Rinnenthal J, Richter C, Nozinovic S, Fürtig B, Lopez JJ, Glaubitz C and Schwalbe H (2009)

RNA phosphodiester backbone dynamics of a perdeuterated cUUCGg tetraloop RNA from phosphorus-31 NMR relaxation analysis.

J Biomol NMR, 45(1-2): p. 143-55.

PMID: 19636800

Rinnenthal J, Klinkert B, Narberhaus F and Schwalbe H (2010)

Direct observation of the temperature-induced melting process of the Salmonella fourU RNA thermometer at base-pair resolution.

Nucleic Acids Res, featured article, in press

PMID: 20211842

Schwalbe H and Rinnenthal J (2010)

Thermodynamics: the world is flat.

Nat Chem Biol, 6(5): p. 312-3.

PMID: 20404816

Nozinovic S, Richter C, Rinnenthal J, Fürtig B, Durchardt-Ferner E, Weigand JE and Schwalbe H (2010)

Quantitative 2D and 3D Γ -HCP experiments for the determination of the angles α and ζ in the phosphodiester backbone of oligonucleotides

J Am Chem Soc, in revision

Kortmann J, Sczodrok S, Rinnenthal J, Schwalbe H and Narberhaus H (2010)
Translation on demand: a simple cyanobacterial RNA-based thermosensor is critical
for stress management
Mol Cell, in revision

Rinnenthal J, Klinkert B, Narberhaus F and Schwalbe H (2010)
Influence of metal-ion binding on the function of the Salmonella fourU RNA
thermometer.
in preparation

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Rinnenthal
Vorname: Jörg
Geburtsdatum: 18. Oktober 1979
Geburtsort: Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit: deutsch

Werdegang

1986-1990 Grundschule Oberhöchstadt
1990-1999 Altkönigschule Kronberg, Abschluss Abitur
9/1999-7/2000 Ableistung des Zivildienstes
2000-2005 Studium der Fachrichtung Biochemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
9/2005-4/2010 Doktorarbeit unter Prof. Dr. Harald Schwalbe, „Strukturelle und dynamische Untersuchungen an RNA-Molekülen“ Johann Wolfgang Goethe-Universität

Sonstiges:

Familienstand: ledig
Führerschein: Klasse 3
Fremdsprachenkenntnisse: Englisch, Französisch, Italienisch

Meine **akademischen Lehrer** an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main waren (in alphabetischer Reihenfolge):

Prof. Dr. Wolf Aßmus, Prof. Dr. Ernst Bamberg, Prof. Dr. Jürgen Bereiter-Hahn, Prof. Dr. Volker Dötsch, Prof. Dr. Ernst Egert, Prof. Dr. Dr. Hugo Fasold, PD Dr. Klaus Fendler, Prof. Dr. Jürgen Feierabend, Prof. Dr. Clemens Glaubitz, Prof. Dr. Werner Gnatzy, Prof. Dr. Michael Göbel, PD Dr. Ulrich Günther, Prof. Dr. Bernd O. Kolbesen, Prof. Dr. Bernd Ludwig, Prof. Dr. Walter E. Müller, Prof. Dr. Heinz D. Osiewacz, Prof. Dr. Roland Prinzinger, Prof. Dr. Heinz Rüterjans, Prof. Dr. Reinhard Schmidt, Prof. Dr. Harald Schwalbe, Prof. Dr. Robert Tampé, Prof. Dr. Walter Volkmandt, Prof. Dr. Jens Wöhnert, Prof. Dr. Herbert Zimmermann