

Strukturelle Untersuchungen an Metabolit-bindenden Riboswitch-RNAs mittels NMR

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Jonas Noeske
aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2007

(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Harald Schwalbe
Prof. Dr. Bernd Ludwig

Datum der Disputation 06. März 2008

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abkürzungsverzeichnis	2
Zusammenfassung	5
Einleitung	
1.1 Genexpression	9
1.2 Mechanismen der Genregulation durch RNA-Strukturänderung	10
1.3 SELEX-Aptamere	38
Material und Methoden	
2.1 Probenzubereitung	45
2.2 Gelelektrophoretische Methoden	52
2.3 UV-Spektroskopie	54
2.4 NMR-Spektroskopie	55
Ergebnisse	
3.1 Riboswitch-RNA-Synthese und Aufreinigung	63
3.2 Ligandbindung an die Purin-bindenden-Riboswitch Aptamerdomänen	65
3.3 Konformationelle Änderungen der Purin-Riboswitch Aptamerdomänen	85
3.4 Kationbindungsstellen in Purin-Riboswitch Aptamerdomänen	103
3.5 Konformationelle Änderungen im gesamten Guanin-Riboswitch	113
3.6 Bindung von Hypoxanthin an die X-Aptamer-RNA	120
3.7 Phosphatgruppenerkennung durch den TPP-Riboswitch	124
Diskussion	129
Anhang	153
Literatur	158
Danksagung	169
Publikationen	171
Curriculum Vitae	173

Abkürzungsverzeichnis

°C	Temperatur in Grad Celsius
1D, 2D,...,nD	ein-, zweidimensional,..., n-dimensional
5'-UTR	5'-Untranslatierte Region
A, Ade	Adenin
AdoCbl	Adenosylcobalamin
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B.subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C, Cyt	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
COSY	Korrelationsspektroskopie (correlated spectroscopy)
D ₂ O	Deuteriumoxid
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl-Sepharose, Anionenaustauschermatrix
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escheria coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure (ethylenediamine tetraacetic acid)
FID	freier Induktionsabfall (free induction decay)
FMN	Flavinmononukleotid
FT	Fourier-Transformation
g	Gramm
G, Gua	Guanin
GlcN6P	Glucosamin-6-phosphat
GTP	Guanosintriphosphat

Abkürzungsverzeichnis

h	Stunde
His	Histidin
H ₂ O	Wasser
HNN-COSY	Korrelationspektroskopie über eine Bindung der Art N-H...N
HPLC	Hochdruck(leistungs)-Flüssigchromatographie (high pressure (performance) liquid chromatography)
HSQC	heteronukleare Einquantenkohärenz (heteronuclear single quantum coherence)
Hyp	Hypoxanthin
J	skalare Kopplungskonstante
K _D	Dissoziationskonstante
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
M	Molar
μ	mikro
min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MWCO	Molekulargewichts-Ausschlussgrenze für die Passage durch Membranen (molecular weight cut-off)
N	Nukleotid, A, G, C oder U
NaOAc	Natrium-Acetat
ncRNA	nicht-kodierende RNA
NMP	Nukleotidmonophosphat
NMR	kernmagnetische Resonanz (nuclear magnetic resonance)
NOE	Kern-Overhauser-Effekt (nuclear Overhauser effect)
NOESY	Kern-Overhauser-Effekt Spektroskopie
nt	Nukleotide
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD _{xxx}	Extinktion bei x nm
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
polyA	Adenosin-Wiederholungssequenz am Ende einer mRNA
ppm	parts per million, Größe der chemische Verschiebung

RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNAi	RNA-Interferenz
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
rpm	Umdrehungszahl pro Minute (rounds per minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SELEX	systematic evolution of ligands by exponential enrichment
S.O.C	LB-Medium mit 250 mM KCl, 2 M MgCl ₂ und 1 M Glucose
SD	Shine-Dalgarno
T	Thymin
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBE	Tris/Borat/EDTA
TMP	Thiaminmonophosphat
TPP	Thiaminopyrophosphat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
Trp	Tryptophan
U, Ura	Uracil
UV	Ultra violett
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Watergate	water suppression by gradient-tailored excitation, Technik zur Unterdrückung des H ₂ O-NMR-Signals
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Riboswitche sind hoch strukturierte RNA-Elemente, die durch direkte Bindung von kleinen Metaboliten die Expression vieler bakterieller Gene kontrollieren. Sie bestehen aus einer Ligand-bindenden Aptamerdomäne und einer so genannten Expressionsplattform. Im Zuge der Metabolitbindung an die Aptamerdomäne ändert sich die Konformation der Expressionsplattform. Diese Konformationsänderung führt zu einem vorzeitigen Abbruch der mRNA-Transkription oder zu einer Inhibierung der Translationsinitiation. In *Bacillus subtilis* wurden zwei Klassen von Riboswitchen gefunden, die trotz einer sehr hohen Homologie in ihrer Primär- und Sekundärstruktur spezifisch zwischen den Purinen Guanin und Adenin unterscheiden.

Durch den direkten NMR-spektroskopischen Nachweis von Wasserstoffbrückenbindungen konnte der Bindungsmodus von Adenin, Guanin und von weiteren Purinliganden an diese beiden Klassen von Riboswitch-RNAs beschrieben werden. Für beide Purin-Riboswitche wurde ein gemeinsamer Bindungsmechanismus des Purinliganden an die RNA beobachtet. Hierbei bildet der Purinligand ein intermolekulares Basentripel mit der Riboswitch-RNA aus. Die Spezifität der Metabolitbindung ist das Resultat eines intermolekularen Watson-Crick Basenpaars zwischen dem gebundenen Liganden Guanin und einem Cytidin bzw. zwischen dem Liganden Adenin und einem Uridin der jeweiligen Riboswitch-RNA. Zusätzlich wurde eine zweite Basenpaarung zwischen der Riboswitch-RNA und dem gebundenen Liganden entdeckt, die in beiden Riboswitch-Klassen identisch ist und ein weiteres Uridin der RNA und die N3/N9 Seite des Purinliganden einschließt. Diese Basenpaarung entsteht durch ein bislang unbeschriebenes Wasserstoffbrückenbindungsmuster, das zur Affinität der RNA-Ligand-Wechselwirkung beiträgt. Die beobachteten intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der RNA und dem gebundenen Purinliganden erklären die beobachtete Spezifitätsumkehrung einer C zu U Mutation in der Ligandbindungstasche der Riboswitch-RNA und die Unterschiede der Bindungsaffinitäten von verschiedenen Purinanaloga.

Weiterhin wurden die Ligand- und Kation-induzierten konformationellen Änderungen der isolierten Aptamerdomänen beider Purin-bindenden Riboswitche und des gesamten Guanin-Riboswitches mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Demnach ist die Ligandbindungstasche in der Ligand-ungebundenen Form unstrukturiert und Ligandbindung verläuft nach einem *induced fit*-Mechanismus. Die Untersuchung der freien und Mg^{2+} -gebundenen Form der Ligand-ungebundenen Aptamerdomäne zeigte Unterschiede zwischen den beiden eng verwandten Purin-bindenden Riboswitchen. Während die Wechselwirkung zwischen den hoch konservierten Sequenzen der apikalen Schlaufen der Helix II und III in der Mg^{2+} -freien Form des Guanin-Riboswitches vorgeformt ist, ist sie in der Mg^{2+} -freien Form des Adenin-Riboswitches nicht ausgebildet, wird jedoch in Gegenwart von Mg^{2+} ausgebildet. Es konnte

gezeigt werden, dass dieser konformationelle Unterschied zwischen den Ligandungebundenen Purin-Riboswitchen durch die Stabilität der apikalen Basenpaare in Helix II festgelegt wird. Die im Guanin-Riboswitch gefundene stabile Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung kann auch außerhalb der Riboswitchsequenz existieren. Durch Mg^{2+} , Mn^{2+} und $Co(NH_3)_6^{3+}$ Titrations der Ligand-gebundenen Purin-Riboswitch Aptamerdomänen konnten spezifische Kationbindungsstellen lokalisiert werden, die in beiden Komplexen übereinstimmen und eine Rolle in der Stabilisierung der RNA-Struktur spielen.

Um die Sekundärstruktur des gesamten Guanin-Riboswitches in seiner freien und Ligandgebundenen Form zu untersuchen, wurden die NMR-Spektren dieser RNA mit denen der freien und Ligandgebundenen isolierten Aptamerdomäne und der isolierten Terminator- und Antiterminatorelemente verglichen. Überraschenderweise bildet bereits die freie Form des gesamten Guanin-Riboswitches das Terminatorelement und die Aptamerdomäne aus. Somit finden konformationelle Änderungen im Zuge der Ligandbindung einzig in der Aptamerdomäne statt. Weiterhin wurde die Struktur der freien und Ligandgebundenen Form einer verkürzten Guanin-Riboswitch-RNA untersucht. Diese RNA ist ein Modell für ein Transkriptionsintermediat, das durch eine der drei RNA-Polymerase-Ruhestellen induziert wird, die in der Riboswitch-Sequenz aufzufinden sind. Interessanterweise schließen sich die Ligandbindung an die Aptamerdomäne und die Ausbildung des Antiterminators nicht gegenseitig aus, wie bisher angenommen. Die verkürzte RNA kann in Abhängigkeit von verschiedenen experimentellen Bedingungen unterschiedliche Sekundärstrukturen annehmen. Das hat interessante Auswirkungen auf die Rolle der im Terminatorelement lokalisierten Transkriptionsruhestelle für den genregulatorischen Prozess und führt zu einem neuen Modell der Funktionsweise des Guanin-Riboswitches.

EINLEITUNG

1.1 Genexpression

Bakterien müssen ihre Stoffwechselwege schnell und effektiv an sich verändernde Umweltbedingungen und Metabolit-Verfügbarkeiten anpassen. Hierzu besitzen Bakterien eine Vielzahl von unterschiedlichen Kontrollmechanismen. So wird z.B. die Aktivität von vielen Schlüsselproteinen durch allosterische Veränderungen und durch reversible kovalente Modifikationen kontrolliert und durch Abläufe, die sich auf die Proteinstabilität, ihre Lokalisation und ihre Wechselwirkung mit anderen Proteinen auswirken. Neben Protein-modifizierenden Regulationsmechanismen regulieren Bakterien fundamentale zelluläre Prozesse durch die Kontrolle der Genexpression. Hierbei sind Mechanismen bekannt, die die Transkription, die Translation und die *messenger RNA* (mRNA)-Stabilität beeinflussen (Stryer, 1995; Voet und Voet, 1995).

Die Genaktivität wird primär auf der Ebene der Transkriptionsinitiation reguliert, indem Proteine, so genannte Transkriptionsfaktoren, mit einer spezifischen DNA-Sequenz, dem Operator, direkt wechselwirken. Je nach der Natur des Transkriptionsfaktors wird dadurch die Transkription positiv oder negativ beeinflusst. Repressorproteine hemmen die Transkription, wohingegen Stimulatorproteine die Transkription aktivieren. Bekannte und gut untersuchte Systeme sind beispielsweise das *lac*-Operon aus *E.coli*, dessen Transkription durch den *lac*-Repressor gehemmt wird (Dickson et al., 1975). Bindung von Allolactose an den *lac*-Repressor hebt den transkriptionshemmenden Effekt des Repressorproteins auf. Im Gegensatz dazu ist das bakterielle CAP (*catabolite gene activator protein*) ein Stimulatorprotein, das durch Bindung von zyklischem AMP (cAMP) die Transkription von vielen katabolen Operons aktiviert (Kolb et al., 1993).

1.2 Mechanismen der Genregulation durch RNA-Strukturänderungen

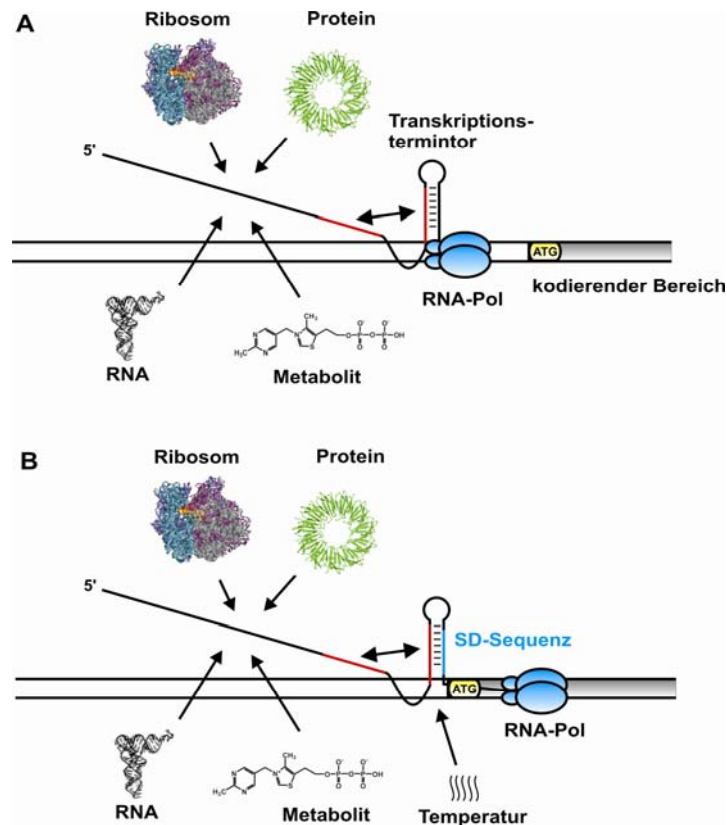
Neben den vielfältigen Genregulationsmechanismen auf der Ebene der Transkriptionsinitiation ist seit 30 Jahren bekannt, dass die Genregulation auch durch Modulation von RNA-Strukturen hervorgerufen werden kann.

Dies kann auf der Ebene der Transkription stattfinden, wo unterschiedlichste zelluläre Komponenten wie das Ribosom, Proteine, tRNAs oder Metabolite die Transkriptionstermination bzw. –antitermination auslösen können. Auch können Proteine, RNAs und Metaboliten strukturelle Änderungen in RNA-Molekülen hervorrufen, die die Initiation der Translation beeinflussen (Abbildung 1.1).

Die Mechanismen der Genregulation durch RNA-Strukturänderungen, die ihre Wirkung auf der Ebene der Transkription entfalten, sind dadurch gekennzeichnet, dass hauptsächlich im 5' nichttranslatierten Bereich (5'-UTR) des regulierten Operons RNA-Sequenzen auftreten, die alternativ entweder einen Transkriptionsterminator oder einen Transkriptionsantiterminator ausbilden können. Die Sequenzen für den Transkriptionsterminator, der die Transkription negativ beeinflusst, und den Transkriptionsantiterminator, der die Transkription positiv beeinflusst, sind stets räumlich nahe beieinander aufzufinden (Abbildung 1.1 A). Der Transkriptionsterminator ist eine Haarnadelschleife gefolgt von einigen Uridinresten. Die Haarnadelschleife ist ausreichend, um die transkribierende RNA-Polymerase zum Pausieren zu veranlassen, und führt in Zusammenhang mit den darauf folgenden Uridinresten, durch die ein U-A RNA-DNA-Hybrid ausgebildet wird, zum vorzeitigen Abbruch der Transkription. Die Transkription wird in diesem Fall abgebrochen, noch bevor die vollständige mRNA transkribiert werden kann, so dass der kodierende Bereich des Gens nicht umgeschrieben wird. Der Transkriptionsantiterminator ist lediglich eine Struktur, die sich ausbildet, um der Ausbildung des Transkriptionsterminators entgegenzuwirken. Demzufolge führt die Ausbildung des Transkriptionsantiterminators durch Unterbindung der Ausbildung des Transkriptionsterminators zum Fortschreiten der Transkription ausgeführt von der RNA-Polymerase und die vollständige mRNA wird transkribiert. Die Ausbildung des Transkriptionsterminators und des Transkriptionsantiterminators schließen sich gegenseitig aus und somit besteht ein Gleichgewicht zwischen der Ausbildung der einen bzw. der anderen der beiden Strukturen. Der entscheidende Schritt im Zuge der Genregulation ist die Verschiebung dieses strukturellen Gleichgewichts entweder zu Gunsten des Transkriptionsterminators oder des Transkriptionsantiterminators durch zelluläre Faktoren wie Ribosomen, Proteine, tRNAs oder Metaboliten (Grundy und Henkin, 2006; Henkin und

Yanofsky, 2002). Diese Faktoren stabilisieren über unterschiedliche Wege eine der beiden Strukturen, wie es im Folgenden beschrieben wird.

Bei der Regulation der Genexpression auf der Ebene der Translation scheint es einen allgemeinen Mechanismus zu geben, der die Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz einbezieht. Die SD-Sequenz ist eine drei bis neun Nukleotide lange Purin-reiche Sequenz, die etwa zehn Nukleotide stromaufwärts vom Startkodon liegt und deren Aufgabe es ist, das Ribosom an das Startkodon der mRNA heranzuführen (Shine und Dalgarno, 1975). Die Wechselwirkung zwischen der SD-Sequenz und der ribosomalen RNA (rRNA) des Ribosoms ist in Bakterien essentiell für die Initiation der Translation. Translationsinitiation wird in vielfältiger Weise über die Zugänglichkeit der SD-Sequenz für das Ribosom reguliert. Ist die SD-Sequenz durch Einwirkung unterschiedlicher Faktoren maskiert, wird die Initiation der Translation inhibiert und die Expression des nachfolgenden Gens partiell unterdrückt. Es wurden Mechanismen entdeckt, in denen RNA-bindende Proteine oder RNA-Sequenzen Wechselwirkungen mit der SD-Sequenz eingehen und sie so maskieren. In dem Fall, in dem die SD-Sequenz mit einer RNA-Sequenz eine Wechselwirkung eingeht, kann diese RNA-Sequenz auf dem selben Strang liegen, auf dem auch die SD-Sequenz liegt. Solche RNAs werden als *cis*-agierende RNAs bezeichnet. Wenn es sich um eine RNA-Sequenz von einem unterschiedlichen RNA-Strang handelt, wird sie als *trans*-agierende RNA bezeichnet. In den meisten Fällen wird die Wechselwirkung der RNA-bindenden Proteine oder der RNA-Sequenz mit der SD-Sequenz durch Effektoren in Form von Metaboliten gesteuert, aber es sind auch Beispiele bekannt, in denen ein physikalisches Signal, z.B. eine Temperaturerhöhung, einen solchen Mechanismus steuert (Abbildung 1.1 B).

**Abbildung 1.1**

Modell für die Genregulation durch RNA-Strukturänderung. (A) Kontrolle des Transkriptionsabbruchs. Die Wechselwirkung eines regulierenden Moleküls (Ribosom, Protein, RNA oder Metabolit) mit dem 5'-UTR favorisiert entweder die Ausbildung des Transkriptionsterminators oder des Transkriptionsantiterminators. In der Abbildung ist der Transkriptionsterminator ausgebildet, der ein intrinsisches Transkriptionsabbruchsignal darstellt. Durch Basenpaarungen zwischen den rot gefärbten RNA-Abschnitten wird der Transkriptionsantiterminator ausgebildet, wodurch die Ausbildung des Transkriptionsterminators unterbunden wird. (B) Translationskontrolle. Die Wechselwirkung eines regulierenden Moleküls oder Temperaturänderungen entscheidet darüber, ob die SD-Sequenz des nachfolgenden Gens maskiert vorliegt. In der Abbildung ist die SD-Sequenz maskiert, so dass die Translation nicht beginnen kann und das nachfolgende Gen inhibiert wird. Durch Basenpaarungen zwischen den rot gefärbten RNA-Abschnitten wird eine alternative Konformation ausgebildet, durch die die SD-Sequenz in einer einzelsträngigen Konformation vorliegt und dem Ribosom zugänglich ist, wodurch die Expression des nachfolgenden Gens stattfindet. Dargestellte Strukturen von Effektormolekülen: 70S Ribosom aus *T.thermophilus* (1GIX und 1GIY im Protein-Datenbankcode), TRAP (1UTD), tRNA^{Phe} aus Hefe (1EVV) und Thiaminpyrophosphat.

Die Regulation der Genexpression auf der Ebene der Translation ist reversibel. Durch das Wegdiffundieren des regulierenden Moleküls liegt die mRNA wieder in einer Form vor, in der das von ihr kodierte Gen exprimiert werden kann. Im Fall des so genannten RNA-Thermometers (siehe unten) kann das allein durch einen Temperaturanstieg vonstatten gehen. Im Gegensatz dazu ist die Genregulation auf der Ebene der Transkription irreversibel. Wenn der Transkriptionsterminator ausgebildet wurde, bricht die Transkription ab, ohne dass das Gen vollständig transkribiert wurde.

In beiden Fällen erfolgt die Genregulation durch eine Art Rückkopplungsmechanismus, da der regulatorisch ausschlaggebende Faktor stets mit dem Genprodukt des regulierten Gens in Verbindung steht, z.B. indem das Genprodukt an der Biosynthese des Faktors, seinem Abbau oder seinem Transport beteiligt ist.

Ribosom-vermittelte Genregulation (Transkriptionsattenuation)

In vielen Bakterien wurde beobachtet, dass Operons, deren Genprodukte an der Biosynthese spezifischer Aminosäuren beteiligt sind, auf der Ebene der Transkription durch Ribosom-vermittelten Transkriptionsabbruch reguliert werden.

Ein derartiger Regulationsmechanismus wurde für das *his*-Operon aus *S.typhimurium* entdeckt und sieht folgendermaßen aus: Im 5'-UTR des *his*-Operons findet man eine Sequenz, die entweder einen Transkriptionsterminator oder einen Transkriptionsantiterminator ausbilden kann. Neben dem Transkriptionsterminator und dem Transkriptionsantiterminator findet man im 5'-UTR auch eine Sequenz, deren Translation ein homopolymeres His₇ entstehen lässt (Landick et al., 1996). Ein Defizit in der Verfügbarkeit von tRNA^{His} führt zum Pausieren des Ribosoms während der Synthese des His₇-Peptids, das auch als Leitpeptid bezeichnet wird. Diese Verlangsamung der Translation des Leitpeptids, hervorgerufen durch einen Mangel an tRNA^{His}, begünstigt die Ausbildung des Transkriptionsantiterminators, wodurch die Transkription des *his*-Operons begünstigt ist und somit Proteine exprimiert werden können, die an der Histidin-Biosynthese beteiligt sind.

Das *trp*-Operon aus *E.coli* weist einen ähnlichen Regulationsmechanismus auf. Auch hier wurde vor dem Transkriptionsantiterminator eine RNA-Sequenz gefunden, die für ein Leitpeptid kodiert, das zwei aufeinander folgende Tryptophanreste aufweist (Landick et al., 1996). In dem Fall, in dem ausreichend Tryptophan-beladene tRNA^{Trp} vorhanden ist, wird das Leitpeptid zügig translatiert. Die zügige Translation des Leitpeptids begünstigt die Ausbildung des Transkriptionsterminators und die Transkription des *trp*-Operons wird vorzeitig abgebrochen. Besteht jedoch ein Mangel an tRNA^{Trp}, pausiert das Ribosoms beim Ablesen der beiden Tryptophan-Kodons in der Leitsequenz. Das Pausieren des Ribosoms begünstigt die Ausbildung des Transkriptionsantiterminators und die Transkription schreitet fort.

Dieser Mechanismus, dem der zeitgleiche Ablauf von Transkription und Translation in Prokaryoten zu Grunde liegt, wird als Transkriptionsattenuation bezeichnet und ist ein weit verbreiteter Genregulationsmechanismus. Durch ihn wird eine Ribosom-vermittelte Aktivierung bzw. Inhibierung des Transkriptionsabbruchs abhängig vom Beladungszustand einer spezifischen tRNA-Spezies ermöglicht.

Protein-vermittelte Genregulation

Ein weiterer Genregulationsmechanismus, bezieht die Bindung von Proteinen an spezifische RNA-Sequenzen in der Leitregion bzw. an die SD-Sequenz der mRNA ein.

In einem transkriptionsregulierten Prozess konkurriert im 5'-UTR des *trp*-Operons aus *B.subtilis* die Ausbildung eines Transkriptionsterminators mit der Ausbildung eines Transkriptionsantiterminators. Das RNA-bindende *trp RNA-binding Attenuation Protein* (TRAP) wird durch Bindung von Tryptophan aktiviert und bindet in diesem aktivierten Zustand an den Transkriptionsantiterminator. Dabei bindet TRAP eine spezifische RNA-Sequenz des Transkriptionsantiterminators an seine Peripherie und unterbindet dadurch dessen Ausbildung. TRAP besteht aus elf identischen Untereinheiten, von denen jede ein Tryptophanmolekül binden kann (Henkin und Yanofsky, 2002). Somit ist TRAP ein Sensor für Tryptophan, der bei einem Tryptophan-Überschuss durch Tryptophanbindung aktiviert wird und die Expression des *trp*-Operons auf der Ebene der Transkription negativ beeinflusst.

Ein ähnlicher Mechanismus zur Genregulation wird für das *bgl*-Operon aus *E.coli* beobachtet, dessen Genprodukte am Metabolismus von β -Glycosiden beteiligt sind. Im Gegensatz zum *trp*-Operon aus *B.subtilis* ist hier in der Leitregion der mRNA die Ausbildung eines intrinsischen Transkriptionsterminators über die Ausbildung eines Transkriptionsantiterminators begünstigt. Die Ausbildung des Transkriptionsantiterminators geschieht nur in Gegenwart von Zuckern. Bei ausreichenden Zuckerkonzentrationen dephosphoryliert BglF, eine Phosphotransferase bzw. einen Zuckertransporter, das RNA-bindende Protein BglG und phosphoryliert den Zucker. Das dephosphorylierte und so aktivierte BglG bindet an die Leitregion der mRNA und stabilisiert die Antiterminatorstruktur (Henkin und Yanofsky, 2002). Somit wird bei hohen Zuckerkonzentrationen das mRNA-bindende Protein BglG durch Dephosphorylierung aktiviert, was die Expression des *bgl*-Operons begünstigt.

Es wurden auch Mechanismen entdeckt, in denen TRAP die Initiation der Translation reguliert. Hierbei bindet TRAP in seiner Tryptophan-gebundenen Form an die *trpE* mRNA und stabilisiert in ihr eine Struktur, in der die SD-Sequenz maskiert ist, wodurch die Expression des nachfolgenden Gens unterdrückt ist (Babitzke, 2004). Auf ähnliche Weise werden mehrere Operons in *B.subtilis* unterschiedlich stark reguliert. Somit ist TRAP in der Lage, in seinem aktivierten Zustand eine differenzierte, genspezifische, regulatorische Antwort zu induzieren.

RNA-vermittelte Genregulation

In den vorangegangenen Beispielen haben stets Proteine bzw. das Ribosom als Sensor für Signale gedient und dementsprechend die Genexpression positiv bzw. negativ beeinflusst. Im Folgenden sollen Mechanismen beschrieben werden, in denen der Effektor eine *trans*-agierende RNA, ein physikalischer Reiz oder ein Metabolit ist und keine Proteine involviert sind (mit der Ausnahme der kurz beschriebenen RNA-Interferenz). Das Hauptaugenmerk liegt hierbei auf dem Mechanismus, in dem der Effektor ein Metabolit ist, der direkt an die mRNA bindet. Dieses Metabolit-bindende, genregulatorisch wirkende RNA-Segment wird als Riboswitch bezeichnet.

RNA-vermittelte Genregulation durch *trans*-agierende RNA

In Gram-positiven Bakterien wurden in der Leitregion vor vielen Genen, die an Aminosäurestoffwechselwegen beteiligt sind, hoch konservierte Bereiche gefunden. Diese hoch konservierten Bereiche, auch T-Box genannt, können direkt unbeladene tRNA-Moleküle einer gewissen Spezies binden und somit im Gegensatz zur Transkriptionsattenuation ohne Mitwirkung des Ribosoms den Beladungszustand dieser tRNA registrieren. Die spezifische Bindung von unbeladenen tRNA Molekülen führt auch hier zur Verschiebung des strukturellen Gleichgewichts zwischen einem Transkriptionsterminator und einem Transkriptionsantiterminator. In Abwesenheit von unbeladener tRNA liegt dieses Gleichgewicht auf der Seite des Transkriptionsterminators. Bei Anwesenheit von unbeladener tRNA bindet diese an den Transkriptionsantiterminator und stabilisiert die Antiterminatorstruktur. Somit dient unbeladene tRNA als ein Transkriptionsantiterminationssignal (Grundy und Henkin, 1993).

Es werden immer mehr Beispiele bekannt, in denen kleine, nicht-kodierende RNAs (ncRNA) die Genexpression regulieren. Dieses Phänomen wird sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten beobachtet und beeinflusst die Struktur, die Translation und die Stabilität der Ziel-RNA. In *E.coli* wurde eine ncRNA gefunden, die sich sowohl positiv als auch negativ auf die Expression von Genen auswirken kann. Diese DsrA-RNA entfaltet ihre Wirkung auf der Ebene der Translationsinitiation, wo sie im Falle der *hms*-mRNA die Translationsinitiationsregion maskiert und dadurch reprimierend wirkt. Im Falle der *rpoS*-mRNA führt die DsrA-RNA dazu, dass die SD-Sequenz für das Ribosom zugänglich ist (Lease und Belfort, 2000). Das Ausmaß der DsrA-RNA-vermittelten Genregulation des *hms*- und des *rpoS*-Gens ist sehr weitreichend, da sowohl das H-NS-Protein als auch das RpoS-Protein globale, bakterielle Transkriptionsregulatoren darstellen. Durch DNA-Kondensation unterdrückt H-NS die

Transkription von vielen, unabhängigen Genen (Atlung und Ingmer, 1997). RpoS ist ein bakterieller Sigmafaktor, auch σ^S (*starvation sigma factor*) genannt, der die Transkription bestimmter Gene induziert, die als Antwort auf einen Mangelzustand die stationäre Phase einleiten. (Loewen und Hengge-Aronis, 1994).

Bei der in Eukaryoten beobachteten RNA-Interferenz (RNAi) erkennen ncRNAs bestimmte Sequenzen in der mRNA und bilden RNA-Duplexe aus, was weniger die RNA-Struktur beeinflusst, als ein spezifisches Abbausignal für diese mRNA durch einen Proteinkomplex (*RNA induced silencing complex*, RISC) darstellt und dadurch die Genexpression unterdrückt. Die ncRNAs können entweder durch das Genom der Zelle selbst kodiert werden (*micro RNA*, miRNA) oder auch zellfremd sein (*short interfering RNA*, siRNA).

RNA-Thermometer

Auch Umweltsignale können sich direkt auf die RNA-Struktur auswirken. So wurde in manchen Organismen eine RNA-Struktur entdeckt, die temperaturabhängig die Bindung des Ribosoms an die Translationsinitiationsregion unterbindet. Bei normalen Wachstumsbedingungen wird die SD-Sequenz durch eine doppelhelikale Struktur maskiert. Bei erhöhter Temperatur schmilzt diese Struktur auf und die SD-Sequenz ist zugänglich für das Ribosom, was sich positiv auf die Genexpression der nachfolgenden Gene auswirkt. Somit fungiert dieses mRNA-Segment als ein Temperatursensor und beeinflusst die Genregulation auf der Ebene der Translationsinitiation. Solche Strukturen wurden unter anderem vor dem *rpoH*-Gen aus *E.coli* (Morita et al., 1999), das einen Hitzeschock-spezifischen Sigmafaktor kodiert, dem *prfA*-Gen aus *L.monocytogenes* (Johansson et al., 2002), das für ein Schlüsselprotein der Pathogenese kodiert, und vor dem *agsA*-Gen aus *Salmonella* (Waldminghaus et al., 2007), das für ein kleines Hitzeschockprotein kodiert, gefunden.

Metabolit-vermittelte Genregulation

In den letzten fünf Jahren wurde ein neuer Mechanismus der Genregulation entdeckt, der auch auf strukturellen Veränderungen in der Leitregion von verschiedenen mRNAs basiert, sich aber wesentlich von den oben beschriebenen Mechanismen unterscheidet. Es konnte gezeigt werden, dass durch Bindung von Metaboliten an spezifische bakterielle mRNAs die Genexpression moduliert wird. Hierbei bindet der Metabolit ohne die Beteiligung jeglicher Proteinfaktoren direkt an eine strukturierte Region im 5'-UTR der mRNA - den Riboswitch - und induziert eine Änderung der RNA-Sekundärstruktur. Diese Konformationsänderung im 5'-UTR führt zur Modulation der Expression des nachfolgenden Gens. Dabei kann die

genregulierende Wirkung entweder durch die Beeinflussung der Transkription, der Translation oder der RNA-Prozessierung erreicht werden. Es wurden Riboswitchklassen identifiziert, die spezifisch Vitamin B₁₂ (Adenosylcobalamin, AdoCbl) (Nahvi et al., 2002; Nou und Kadner, 2000), Flavinmononukleotid (FMN) (Mironov et al., 2002; Winkler et al., 2002b), Thiaminpyrophosphat (TPP) (Winkler et al., 2002a), die Purinbasen Guanin (Mandal et al., 2003) und Adenin (Mandal und Breaker, 2004), S-Adenosylmethionin (SAM) (Epshtein et al., 2003; McDaniel et al., 2003; Winkler et al., 2003), Lysin (Sudarsan et al., 2003b), Glycin (Mandal et al., 2004), Glucosamin-6-phosphat (GlcN6P) (Winkler et al., 2004), den Queosin-Vorläufer preQ1 (Roth et al., 2007) und Mg²⁺ (Cromie et al., 2006; Dann et al., 2007) binden (Abbildung 1.2). Alle Riboswitchklassen haben gemeinsam, dass durch Metabolitbindung an den Riboswitch diejenigen Gene reguliert werden, die an der Biosynthese und/oder dem Transport des jeweiligen gebundenen Metaboliten beteiligt sind. Somit wird auch von Riboswitchen der elegante Mechanismus der Rückkopplung zur Regulation fundamentaler Stoffwechselwege verwendet.

Die Metabolit-bindende Region der Riboswitche, die so genannte Aptamerdomäne, weist einen sehr hohen Grad an Primär- und Sekundärstrukturkonservierung zwischen unterschiedlichen Organismen auf und ist eine modulare, unabhängige RNA-Domäne (Abbildung 1.2). Der restliche Teil des Riboswitches liegt meist stromabwärts zur Aptamerdomäne und wird als Expressionsplattform bezeichnet. Die Expressionsplattform kann, abhängig davon, ob ein Metabolit an die Aptamerdomäne gebunden ist oder nicht, Basenpaarungen mit Bereichen der Aptamerdomäne eingehen. In den meisten Fällen finden diese Basenpaarungen zwischen der Expressionsplattform und der Aptamerdomäne im Metabolit-ungebundenen Zustand statt und führen zur Aktivierung der Genexpression. Umgekehrt werden im Ligand-gebundenen Zustand diese Basenpaarungen verhindert, was meistens zur Hemmung der Genexpression führt. (Abbildung 1.4). Ob sich der Regulationsmechanismus auf die Transkription oder die Translation auswirkt, ist abhängig von der Sekundärstruktur, die die Expressionsplattform im Metabolit-gebundenen bzw. – ungebundenen Zustand annimmt. Generell wird der gleiche Mechanismus verwendet, wie er zuvor für andere Genregulationsmechanismen beobachtet wird, die auch auf strukturellen Veränderungen in der mRNA basieren und sich auf die Transkription bzw. die Translation des Gens auswirken. So wird häufig beobachtet, dass die Expressionsplattform Sequenzen aufweist, die einen Transkriptionsterminator und einen Transkriptionsantiterminator ausbilden können, wobei die beiden Sekundärstrukturen sich jedoch gegenseitig ausschließen. Ein anderes häufig auftretendes Motiv ist eine Sekundärstruktur, durch die je nach Metabolitbindungszustand die SD-Sequenz in eine einzelsträngige Form überführt oder maskiert wird. Wenn die SD-Sequenz durch Ausbildung einer Sekundärstruktur maskiert wird, kann die SD-Sequenz nicht vom Ribosom erkannt werden. Auf diese Weise kann durch Riboswitche der vorzeitige Transkriptionsabbruch oder die Translationsinitiation reguliert

werden. Die Expressionsplattform zeigt im Gegensatz zur Aptamerdomäne keine besondere Konservierung ihrer Primärstruktur. So können sich die Sequenzen der Expressionsplattformen in derselben Riboswitchklasse stark unterscheiden, auch wenn der von ihnen hervorgerufene Regulationsmechanismus sich ähnelt. Andererseits kann der von Vertretern einer Riboswitchklasse hervorgerufene Regulationsmechanismus sich unterscheiden, wie es unter anderem für den TPP-Riboswitch gezeigt werden konnte. Hier wurden Beispiele gefunden, bei denen die hoch konservierte Aptamerdomäne des TPP-Riboswitches in Abhängigkeit von der jeweiligen Expressionsplattform entweder den vorzeitigen Transkriptionsabbruch oder die Translationsinitiation oder das Spleißen einer mRNA reguliert (Sudarsan et al., 2003a).

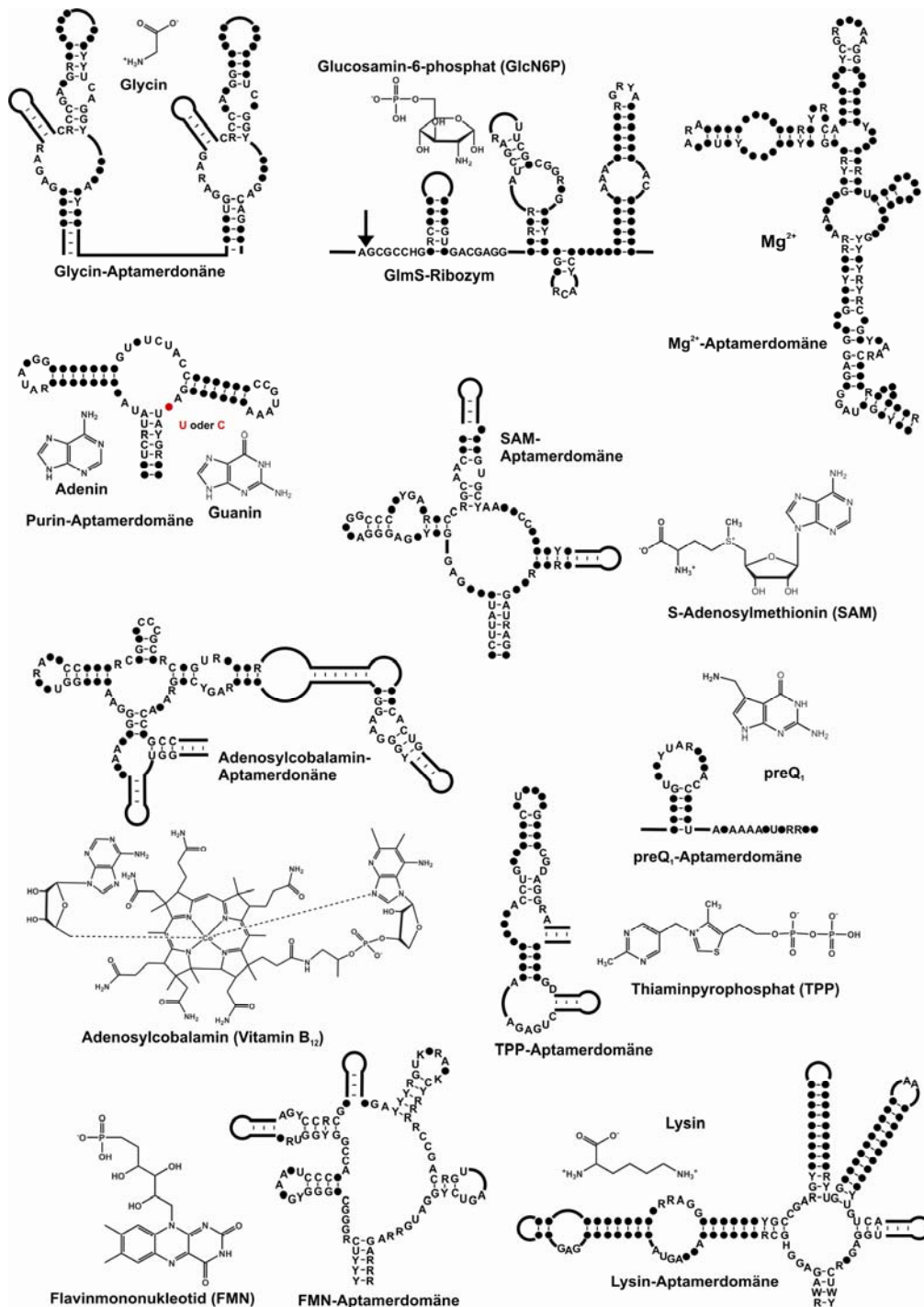


Abbildung 1.2

Bekannte Riboswitch-Aptamerdomänen. Die Konsensussequenz und die Sekundärstruktur der verschiedenen Riboswitch-Aptamerdomänen mit ihrem jeweiligen, biologisch relevanten Metaboliten sind dargestellt. Nukleotide, die in >90% der gefundenen Sequenzen konserviert sind, sind dargestellt. D steht für ein A, G oder U; H steht für A, C oder U; K steht für G oder U; R steht für A oder G; W steht für A oder U und Y steht für C oder U. Punkte stehen für Positionen mit variabler Sequenz, kleine Striche stellen Basenpaarungen dar und dicke Linien stellen Regionen mit variabler Nukleotidsequenz und Länge dar. In der Purin-Aptamerdomäne ist durch einen roten Punkt die Position markiert, bei der im Guanin-Riboswitch ein C und im Adenin-Riboswitch ein U auftritt. Im glmS-Ribozym ist die Stelle, an der die mRNA durch GlcN6P-Bindung spezifisch gespalten wird, durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Verbreitung von Riboswitchelementen

Riboswitche, die über Metabolit-induzierte Sekundärstrukturänderungen der mRNA die Genexpression regulieren, kommen in Bakterien erstaunlich häufig vor. In *B.subtilis* sind mehr Genregulationssysteme bekannt, die nach der Initiation der Transkription agieren und keine Proteine involvieren, als solche, bei denen Proteine beteiligt sind. So werden ca. 2.2% des Genoms von *B.subtilis* nach der Transkriptionsinitiation durch Metabolit-induzierte Riboswitche reguliert und nur ca. 1.1% durch Protein-vermittelte Prozesse (Winkler, 2005). Neben den bislang elf bekannten Riboswitchklassen (Abbildung 1.2) wurden weitere Riboswitchkandidaten gefunden, für die jedoch in den meisten Fällen der regulierende Metabolit noch unbekannt ist. Insgesamt stellen somit die Riboswitche ein komplexes, genregulatorisches Element dar und lassen vermuten, dass die möglichen Funktionen, die RNA-Moleküle in biologischen Vorgängen übernehmen können, noch längst nicht vollständig bekannt sind. Allein die Komplexität der beschriebenen Riboswitche unterstreicht die möglichen Fähigkeiten von RNA-Molekülen.

Entdeckung von Riboswitchelementen

Nou und Kadner konnten 2000 zu erst einen klaren Nachweis für die Wechselwirkung des Metaboliten Adenosylcobalamin (Vitamin B₁₂) und der *btuB*-mRNA aus *E.coli* erbringen. Sie zeigten, dass durch die Bindung des Metaboliten an die RNA die Bindung des Ribosoms an die SD-Sequenz unterbunden wird (Nou und Kadner, 2000). Durch weitere Untersuchungen wurde gezeigt, dass dieser konservierte Adenosylcobalamin-bindende Bereich der mRNA, die sogenannte B₁₂-Box, einen Teil einer größeren Einheit darstellt, dem Adenosylcobalamin-Riboswitch, der vor einigen bakteriellen Genen gefunden wurde, die an der Biosynthese und dem Transport von Cobalamin beteiligt sind (Vitreschak et al., 2003) und dass die Bindung des Metaboliten an dieses Element strukturelle Veränderungen in der mRNA mit sich bringt (Nahvi et al., 2002). Zeitgleich konnten Miranda-Rios et al. durch ähnliche Studien zeigen, dass die Bindung von TPP an den 5'-UTR der *thiC*-mRNA aus *Rhizobium etli* über einen posttranskriptionell regulierenden Schritt die Genexpression beeinflusst (Miranda-Rios et al., 2001) und dass auch hier eine konservierte Sequenz beteiligt ist, die in unterschiedlichsten Bakterien aufgefunden wird (Winkler et al., 2002a). Der TPP- und der Adenosylcobalamin-Riboswitch waren somit die ersten bekannten Riboswitchklassen, von denen innerhalb kürzester Zeit neun weitere, insbesondere durch die Gruppe um R. Breaker, beschrieben werden konnten.

Dass es sich bei den Riboswitch-Aptamerdomänen um konservierte Domänen handelt, konnte computerbasiert durch modifizierte *Basic Local Alignment Search Tools Nucleotide* (BLASTN)-

Suchen festgestellt werden, bei denen in den Bereichen zwischen Genen von Mikroorganismen nach Sequenzen gesucht wurde, die ähnliche Sequenzen besitzen und ähnliche Sekundärstrukturen ausbilden können. Auf diese Weise wurden auch die weiteren Riboswitchkandidaten identifiziert, für die die regulierenden Metabolite heute noch unbekannt sind. Das Auffinden dieser Riboswitchkandidaten geschah durch die Suche nach dem gemeinsamen Auftreten spezifischer Riboswitchcharakteristika, nämlich ihrer phylogenetisch konservierten Primär- und Sekundärstruktur, ihrer Lokalisation im 5'-UTR, ihr Vorkommen vor ähnlichen Genen und das Auftreten von entweder einem Transkriptionsterminator oder einer Sequenz, die die SD-Sequenz maskieren kann. Im Gegensatz zu der computerbasierten Suche nach den konservierten Aptamerdomänen wurde in Sequenzdatenbanken auch nach den Charakteristika von Expressionsplattformen gesucht, was bekannte und weitere, unbekannte Riboswitches identifizierte. Suchkriterien waren hierbei das Auftreten von vermeintlichen Transkriptionsterninoren in Zusammenhang mit einem möglichen Antiterminator in seiner näheren Umgebung (Abreu-Goodger und Merino, 2005; Barrick et al., 2004).

Die direkte Wechselwirkung von Metaboliten mit den so entdeckten Riboswitch-RNAs wurde über biochemische und biophysikalische Methoden wie *in-line Probing*, Gleichgewichtsdialyse und Fluoreszenzlöschung nachgewiesen (Tabelle 1). *In-line Probing* ist die am häufigsten angewendete Methode und basiert auf der spontanen Spaltung von Phosphodiesterbindungen, wobei die Spaltungsgeschwindigkeit von der Konformation und der Flexibilität der RNA abhängig ist. Da die Beweglichkeit der Phosphodiesterbindung von basengepaarten Nukleotiden eingeschränkt ist, kann die optimale Konformation für eine Transesterifizierung nicht eingenommen werden, was sich in einer relativ niedrigen Spaltungsrate der Phosphodiesterbindung niederschlägt. Im Gegensatz dazu ist die Phosphodiesterbindung von einzelsträngigen Nukleotiden flexibler, so dass die optimale Konformation für die Bindungsspaltung, in der die 2'-OH-Gruppe auf einer Linie (*in-line*) mit dem Phosphorzentrum und der Sauerstoffabgangsgruppe stehen, eingenommen werden kann, was sich in einer hohen Spaltungsrate der Phosphodiesterbindung widerspiegelt. Durch *in-line Probing* Experimente der Riboswitch-RNA in Abwesenheit und Anwesenheit seines Metaboliten können Ligand-induzierte konformationelle Änderungen der RNA aufgedeckt werden, die durch Veränderungen im Spaltungsmuster der RNA sichtbar werden. Somit kann durch *in-line Probing* sowohl die Metabolitbindung als auch die mit ihr einhergehende konformationelle Änderung der RNA auf der Nukleotidebene untersucht werden. Das Ausmaß der Spaltung eines bestimmten Restes der RNA in Abhängigkeit von der Metabolitkonzentration lässt die Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) für die Wechselwirkung des Metaboliten mit der RNA zu.

Durch die Gleichgewichtsdialyse können die so erhaltenen Gleichgewichtsdissoziationskonstanten für die Wechselwirkung eines Metaboliten mit einer RNA bestätigt werden. Bei der

Gleichgewichtsdialyse sind zwei Kammern durch eine semipermeable Membran getrennt. In eine der beiden Kammern wird eine Riboswitch-RNA Lösung gegeben, in die andere der radioaktiv markierte Ligand. Die semipermeable Membran hält die RNA auf Grund ihres hohen Molekulargewichts zurück, während sie den radioaktiv markierten Liganden mit kleinem Molekulargewicht frei passieren lässt. Nun diffundiert der Ligand in die Kammer der RNA und bindet an die RNA bis sich ein Gleichgewicht aus freiem und gebundenem Ligand eingestellt hat. Im Gleichgewicht ist die Konzentration des freien Liganden in beiden Kammern identisch, die gesamte Ligandkonzentration ist jedoch in der RNA-Kammer höher aufgrund des an die RNA gebundenen Liganden. Durch Messung der Radioaktivität in beiden Kammern kann die K_D des Liganden an die RNA berechnet werden. Diese Methode gibt jedoch im Gegensatz zu *in-line Probing* keinerlei Aufschluss über Ligand-induzierte konformationelle Änderungen der RNA.

Voraussetzung für Fluoreszenzlöschungsexperimente ist ein fluoreszierender Ligand, was bei dem Adenin-Riboswitch mit dem Adeninanalogon 2-Aminopurin und bei dem FMN-Riboswitch mit FMN gegeben ist. Durch Bindung des Liganden an die Riboswitch-RNA nimmt seine Fluoreszenz ab, wodurch die Gleichgewichtsdissoziationskonstante bestimmt werden kann. Durch zeitaufgelöste Messungen können auch die Assoziations- und Dissoziationskonstanten ermittelt werden. Somit kann man aus Fluoreszenzlöschungsexperimenten thermodynamische und kinetische Größen bestimmen, man erhält jedoch keine Informationen über konformationelle Änderungen in der RNA.

Methoden	Informationsgehalt	Anmerkung
<i>in-line Probing</i>	<ul style="list-style-type: none"> • K_D • konformationelle Änderung der RNA 	<ul style="list-style-type: none"> • Standardmethode zum Nachweis der Wechselwirkung • nukleotidspezifische Konformationelle Änderung
Gleichgewichtsdialyse	<ul style="list-style-type: none"> • K_D 	<ul style="list-style-type: none"> • außer K_D geringer Informationsgehalt
Fluoreszenzlöschung	<ul style="list-style-type: none"> • K_D und weitere thermodynamische und kinetische Größen 	<ul style="list-style-type: none"> • Voraussetzung ist fluoreszierender Ligand • zeitaufgelöste Messung für kinetische Größen

Tabelle 1

Häufig angewendete Methoden zur Bestimmung der Gleichgewichtsbindungskonstante (K_D) von Metaboliten an Riboswitch-RNAs

Anhand dieser biochemischen und biophysikalischen Experimente konnte die Affinität und Spezifität eines jeden Riboswitches zu seinen spezifischen Metaboliten und deren Analoga bestimmt werden.

Affinitäten und Spezifitäten

Die beobachteten Riboswitch-Metabolit-Wechselwirkungen haben eine Bindungsaffinität von 5 nM bis 30 μ M (SAM bzw. Glycin) und sind somit vergleichbar mit der Stärke der Wechselwirkung zwischen kleinen Molekülen und Proteinen. Jedoch unterscheidet sich in vielen Fällen die im thermodynamischen Gleichgewicht bestimmte Bindungsaffinität des Metaboliten an die Riboswitch-RNA von der Metabolitkonzentration, die benötigt wird, um *in vitro* eine genregulatorische Antwort, d.h. einen Transkriptionsabbruch, zu beobachten. Das kann durch eine kinetisch kontrollierte Bindung des Metaboliten an die RNA begründet sein, worauf an späterer Stelle eingegangen wird. Trotz einer K_D von 5 nM von SAM an die Aptamerdomäne des SAM-Riboswitches wurde für den SAM-Riboswitch *in vitro* der Transkriptionsabbruch erst durch SAM-Konzentrationen im niedrig mikromolaren Bereich hervorgerufen (McDaniel et al., 2003).

Die zur Modulation der Genexpression führende Metabolitkonzentration stellt einen kritischen Parameter für die biologische Funktion von Riboswitchen dar. Sie muss für eine adäquate Genregulation im gleichen Bereich mit der freien intrazellulären Konzentration des Metaboliten liegen. In *B.subtilis* wurde die intrazelluläre Gesamtkonzentration von SAM mit 80 – 400 μ M bestimmt (Wabiko et al., 1988). Die freie SAM-Konzentration sollte demnach niedriger sein und somit im Bereich der *in vitro* zum Transkriptionsabbruch führenden Konzentration liegen, da SAM in der Zelle zu einem großen Anteil an andere zellulären Komponenten gebunden vorliegt. Ein anderes Beispiel ist der Lysin-Riboswitch, der *in vitro* bei einer Lysin-Konzentration von ca. 3 mM zum Transkriptionsabbruch führt (Grundy et al., 2003). Diese Konzentration entspricht der intrazellulären Lysinkonzentration von 2 – 4 mM (Tempest et al., 1970). Für den SAM-Riboswitch konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre freie SAM-Konzentration mit der zum Transkriptionsabbruch führenden SAM-Konzentration gekoppelt ist, denn die Überexpression bzw. Mutation einer SAM-Synthase führte zum Verlust der genregulatorischen Wirkung des SAM-Riboswitches (McDaniel et al., 2003; McDaniel et al., 2006).

Sowohl für den TPP- als auch für den SAM-Riboswitch konnte ein Unterschied in der Gleichgewichtsbindungsaffinität des Metaboliten an die isolierte Aptamerdomäne im Gegensatz zum gesamten Riboswitch, bestehend aus der Aptamerdomäne und der Expressionsplattform, gezeigt werden. Die Bindungsaffinität ist für die isolierte Aptamerdomäne 20 – 50 Mal so hoch wie für den gesamten Riboswitch (Winkler et al., 2002a; Winkler et al., 2003). Es wird angenommen, dass die gesamte Riboswitch-RNA unterschiedliche, unter anderem nicht bindungskompetente Konformationen einnimmt, wodurch die Bindungsaffinität abnimmt und dass sich eventuell die Affinität des Metaboliten an die RNA mit fortschreitender Transkription ändert.

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der biologischen Funktion von Riboswitchen ist die Diskriminierung des natürlich relevanten Liganden zu strukturell eng verwandten Liganden, die ebenso in der Zelle vorkommen. Der SAM-Riboswitch unterscheidet präzise zwischen seinem eigentlichen Liganden SAM und S-Adenosylhomocystein (SAH), das entsteht, wenn SAM im Zuge einer Methylierungsreaktion seine Methylgruppe auf ein anderes Molekül transferiert (Abbildung 1.3).

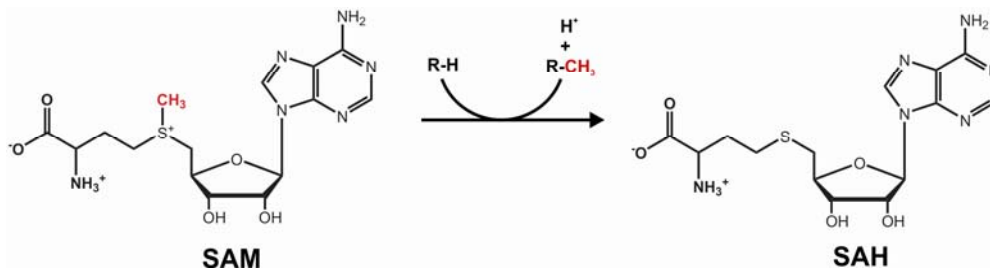


Abbildung 1.3

Transfer einer Methylgruppe durch SAM. SAM kann in einer Methylierungsreaktion die rot gefärbte Methylgruppe auf ein Akzeptormolekül (R-H) übertragen. Dabei entsteht SAH.

So bindet der SAM-Riboswitch SAM 100-fach stärker als SAH, obwohl die beiden Metabolite sich lediglich in einer einzigen Methylgruppe unterscheiden (Winkler et al., 2003). Auch der Lysin-Riboswitch ist ein gutes Beispiel für die hohe Ligandspezifität von Riboswitchen. Er bindet spezifisch das L-Enantiomer und nicht das D-Enantiomer von Lysin (Sudarsan et al., 2003b).

Die Bestimmung der Bindungsaffinitäten der Metabolite und ihrer Analoga an Riboswitch-RNA zeigte weiterhin, dass dephosphorylierte Analoga der natürlichen Metaboliten viel schlechter an ihre spezifische Riboswitch-RNA binden. Dies ist erstaunlich, da das RNA-Molekül ein Polyanion darstellt. So bindet der TPP-Riboswitch am stärksten TPP (zwei Phosphatgruppen) mit einer K_D von 600 nM, Thiaminmonophosphat (TMP, eine Phosphatgruppe) fünffach schlechter mit einer K_D von 3 μ M und am schlechtesten Thiamin (keine Phosphatgruppe) mit einer K_D von 50 μ M (Winkler et al., 2002a). Eine ähnliche Tendenz wurde für den FMN-Riboswitch berichtet, der FMN (eine Phosphatgruppe) 1000-fach stärker als Riboflavin (keine Phosphatgruppe) bindet (Winkler et al., 2002b) und das glmS-Ribozym, das GlcN6P 100-fach stärker als Glucosamin bindet (Winkler et al., 2004).

Die Rolle der Kinetik in der Riboswitch-vermittelten Genregulation

Vielfach wurde festgestellt, dass die Bindungsaffinität von Metaboliten an ihre jeweilige Riboswitch-RNA mitunter einige Größenordnungen unter der Konzentration liegt, die zur

halbmaximalen Transkriptionstermination in *in vitro* Transkriptionsversuchen benötigt wird (siehe Absatz Affinitäten und Spezifitäten). Dieser Unterschied könnte durch unterschiedliche Metabolitbindungsaffinitäten für Transkriptionsintermediate mit unterschiedlichen Nukleotidlängen an ihrem wachsenden 3'-Ende begründet sein. Für den *ribD* FMN-Riboswitch aus *B.subtilis* konnte jedoch gezeigt werden, dass durch die hohe Geschwindigkeit der RNA-Polymerase der Transkriptionsabbruchpunkt erreicht wird, noch bevor sich ein thermodynamisches Gleichgewicht für die RNA-Metabolit-Wechselwirkung einstellen konnte. Demnach scheint es, dass dieser FMN-Riboswitch und vermutlich weitere Riboswitchklassen kinetisch regulierte Schalter sind, die nur durch Metabolitkonzentrationen, die weit über den im Gleichgewicht gemessenen K_D -Werten für die Riboswitch-RNAs liegen, kontrolliert werden. Dabei unterstützend wirken von der RNA-Polymerase abgelesenen Sequenzen, die auftreten, nachdem die Aptamerdomäne transkribiert wurde und bevor der Transkriptionsabbruchpunkt erreicht wird. Diese Sequenzen veranlassen die transkribierende RNA-Polymerase zum Pausieren und werden als RNA-Polymerase-Ruhestellen bezeichnet. Das Pausieren der RNA-Polymerase an der zwischen der Aptamerdomäne und dem Transkriptionsabbruchpunkt gelegene RNA-Polymerase Ruhestelle im *ribD* FMN-Riboswitch, unterdrückt die Ausbildung sowohl des Transkriptionsantiterminators als auch des Transkriptionsterminators und hat eine Halbwertszeit von ~1 min (Wickiser et al., 2005b). In dieser Zeit, in der noch keine genregulatorische Entscheidung getroffen werden kann, aber die Metabolit-bindende Aptamerdomäne schon vollständig ausgebildet ist, wird dem Metaboliten FMN Zeit zur Assoziation mit der RNA gegeben. Die Bestimmung der Assoziationskonstante k_{on} von FMN an diese RNA zeigt, dass ohne das Vorhandensein von RNA-Polymerase-Ruhestellen der Punkt für eine genregulatorische Entscheidung erreicht werden würde, bevor FMN die Möglichkeit gehabt hätte, an die RNA zu binden. Weiterhin zeigen Messungen der Dissoziationskonstante k_{off} , dass FMN mit einer Zeitkonstante von ungefähr 10 min von der RNA weg diffundiert, was wahrscheinlich die Lebenszeit der mRNA übersteigt (Wickiser et al., 2005b). Somit wurde für den *ribD* FMN-Riboswitch aus *B.subtilis* gezeigt, dass er kinetisch und nicht thermodynamisch reguliert wird. Für den *pbuE* Adenin-Riboswitch aus *B.subtilis* konnte gezeigt werden, dass dieser Riboswitch kinetisch und thermodynamisch kontrolliert werden kann, abhängig von weiteren Komponenten, die sich auf die Transkriptionsgeschwindigkeit auswirken (Wickiser et al., 2005a). Eine dieser Komponenten ist z.B. NusA, ein RNA-bindendes Protein, das die Halbwertszeit von RNA-Polymerase-Ruhestellen erhöhen kann (Pan et al., 1999), wodurch während der Transkription die Transkriptionsgeschwindigkeit herabgesetzt wird.

Riboswitch-RNA Strukturen und Metaboliterkennung

Die erste hochaufgelöste Struktur einer Riboswitch-Aptamerdomäne in Komplex mit seinem gebundenen Metaboliten wurde erst 2004 berichtet. Hierbei handelte es sich um die Röntgenstruktur der Aptamerdomäne des Guanin-bindenden Riboswitches im Komplex mit dem im Purinstoffwechsel auftretenden Metaboliten Hypoxanthin (Batey et al., 2004) (Abbildung 1.4). In den darauf folgenden Jahren wurden weitere Riboswitche in Komplex mit ihren zugehörigen Liganden und zum Teil auch deren Analoga erfolgreich kristallisiert, so dass zur Zeit die Strukturen des Guanin- (Batey et al., 2004; Serganov et al., 2004), Adenin- (Serganov et al., 2004) (Abbildung 1.4), TPP- (Edwards und Ferre-D'Amare, 2006; Serganov et al., 2006; Thore et al., 2006), glmS- (Klein und Ferre-D'Amare, 2006), SAM- (Montange und Batey, 2006) und Mg^{2+} (Dann et al., 2007) -bindenden Riboswitches bekannt sind.

Die Strukturen sämtlicher heute bekannten Riboswitch-Aptamerdomänen sind auf Grund der engen Anordnung helikaler Elemente sehr kompakt und werden durch komplexe Tertiärstrukturelemente stabilisiert (Abbildung 1.4). So wird die globale Faltung der Riboswitch-Aptamerdomänen durch viele zum Teil weitreichende kanonische und nicht-kanonische Basenpaarungen, die an Pseudoknoten beteiligt sind, stabilisiert. Durch die Stabilisierung der globalen Struktur der Riboswitch-RNA kann eine Ligandbindungstasche geformt werden, in der der gebundene Ligand von der RNA beinahe vollständig umschlossen ist und fast alle seine funktionellen Gruppen Wechselwirkungen mit der RNA eingehen. Anhand der beobachteten intermolekularen Wechselwirkungen zwischen der RNA und dem gebundenen Metabolit konnten vielfach die biochemisch bestimmten Bindungsaffinitäten von verschiedenen Analoga auf struktureller Ebene erklärt werden.

Purin-bindende Riboswitche

Die Klasse der Purin-bindenden Riboswitche stellt nach dem preQ1-bindenden Riboswitch die zweitkleinste Riboswitchklasse dar und bindet spezifisch die Purinbasen Adenin und Guanin. Vertreter der Purin-bindenden Riboswitche wurden in unterschiedlichen Proteobakterien gefunden, wo sie die Genexpression entweder durch vorzeitigen Transkriptionsabbruch oder durch Maskierung der SD-Sequenz regulieren. Die Aptamerdomänen der Purin-bindenden Riboswitche haben eine Länge von maximal 80 Nukleotiden und bestehen aus drei Helices, die über eine Drei-Wege-Kreuzung miteinander verbunden sind. Die Helices II und III favorisieren eine Länge von je sechs bis sieben Basenpaaren und erlauben das Auftreten von ein bis zwei Basenfehlpaarungen. Sie werden jeweils von einer sieben Nukleotide langen Schlaufe an ihrem apikalen Ende begrenzt. Diese apikalen Schleifen II und III besitzen abschnittsweise komplementäre Sequenzen, was zusammen mit der konservierten Länge der

Helices II und III die Ausbildung eines Pseudoknotens ermöglicht (Abbildung 1.4 und Abbildung 3.2). Die apikalen Schleifen, die zentrale Drei-Wege-Kreuzung und der ihr zugewandte Teil von Helix I weisen >90% phylogenetische Konservierung auf (Mandal et al., 2003; Mandal und Breaker, 2004) (Abbildung 1.2).

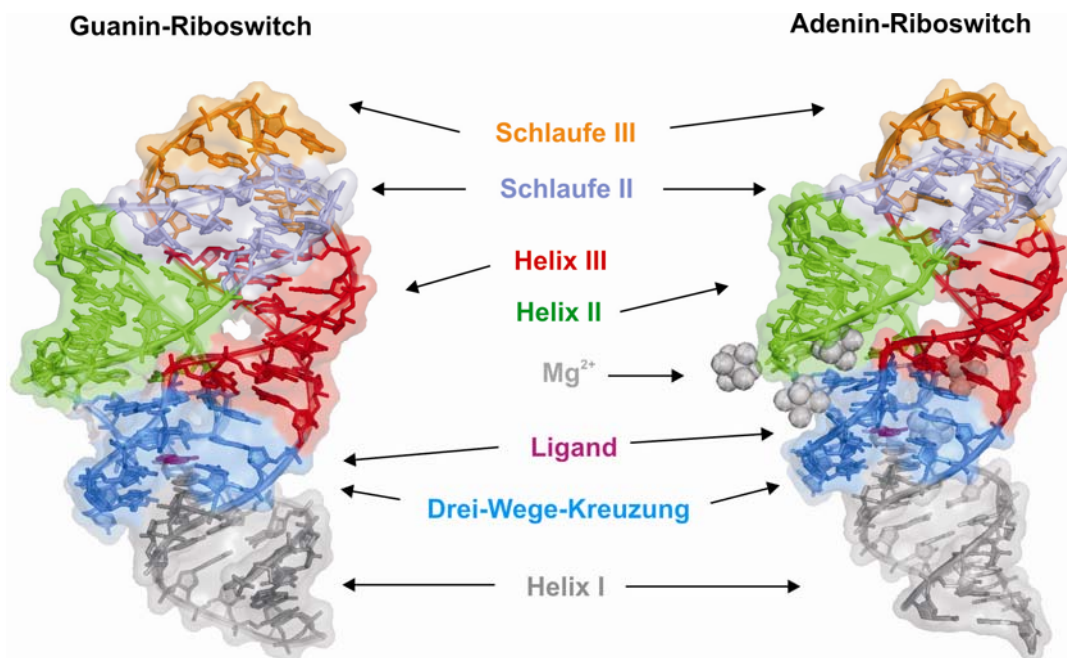


Abbildung 1.4

Röntgenstrukturen der Aptamerdomänen der Purin-bindenden Riboswitch-RNAs. Die Aptamerdomäne des Guanin-bindenden Riboswitches in Komplex mit Hypoxanthin (Batey et al., 2004) ist links und die Aptamerdomäne des Adenin-bindenden Riboswitches in Komplex mit Adenin (Serganov et al., 2004) ist rechts dargestellt. Beide Purin-bindende Riboswitch-Aptamerdomänen in Komplex mit ihrem jeweiligen Liganden bilden eine kompakte Tertiärstruktur aus, in der die Helices II und III parallel zueinander angeordnet sind und über eine Schleifen-Schleifen-Wechselwirkung miteinander verbunden sind. Der Ligand bindet an die Drei-Wege-Kreuzung und wird fast vollständig von der RNA umgeben.

Der Guanin-bindende Riboswitch und der Adenin-bindende Riboswitch weisen die gleiche Konserviertheit in der Primärstruktur und eine identische Sekundärstruktur auf, unterscheiden sich aber stets in einem Nukleotid in der Drei-Wege-Kreuzung. Hier tragen die Vertreter des Guanin-bindenden Riboswitches ein Cytidin an Position 74, wohingegen die Vertreter des Adenin-bindenden Riboswitches hier stets ein Uridin tragen (Abbildung 1.2 und Abbildung 3.2).

Durch biochemische Experimente konnte gezeigt werden, dass die Aptamerdomäne des *xpt-pbuX* Guanin-bindenden Riboswitches aus *B.subtilis* Guanin mit einer Affinität von 5 nM und das ebenfalls im Purinstoffwechsel vorkommende und sich nur in einer Aminogruppe unterscheidende Hypoxanthin mit 50 nM bindet, jedoch keine Wechselwirkung mit Adenin zeigt (Mandal et al., 2003) (Tabelle 5). Für diesen Guanin-bindenden Riboswitch wurde in der

stromabwärts gelegenen Expressionsplattform ein Transkriptionsterminator gefunden, was darauf hindeutet, dass dieser Riboswitch durch vorzeitigen Transkriptionsabbruch die Genexpression beeinflusst. Es wurde postuliert, dass die Bindung von Guanin an die Aptamerdomäne die Helix I stabilisiert, somit sich der in der stromabwärts gelegenen Expressionsplattform lokalisierte Transkriptionsterminator ausbildet und zum Guanin-vermittelten vorzeitigen Transkriptionsabbruch führt. In Abwesenheit von Guanin kann das 3'-Ende von Helix I mit dem 5'-Ende des Transkriptionsterminators einen Antiterminator ausbilden, was die Ausbildung des Transkriptionsterminators unterbindet, so dass die Transkription fortschreitet (Abbildung 1.5). Das von diesem Guanin-bindenden Riboswitch regulierte *xpt-pbuX* Operon aus *B.subtilis* kodiert für eine Xanthin-Phosphoryltransferase und eine Xanthin-spezifische Purinpermease, deren Genregulation durch Bindung der Purinbase Guanin im Zuge eines Rückkopplungsmechanismus verständlich ist.

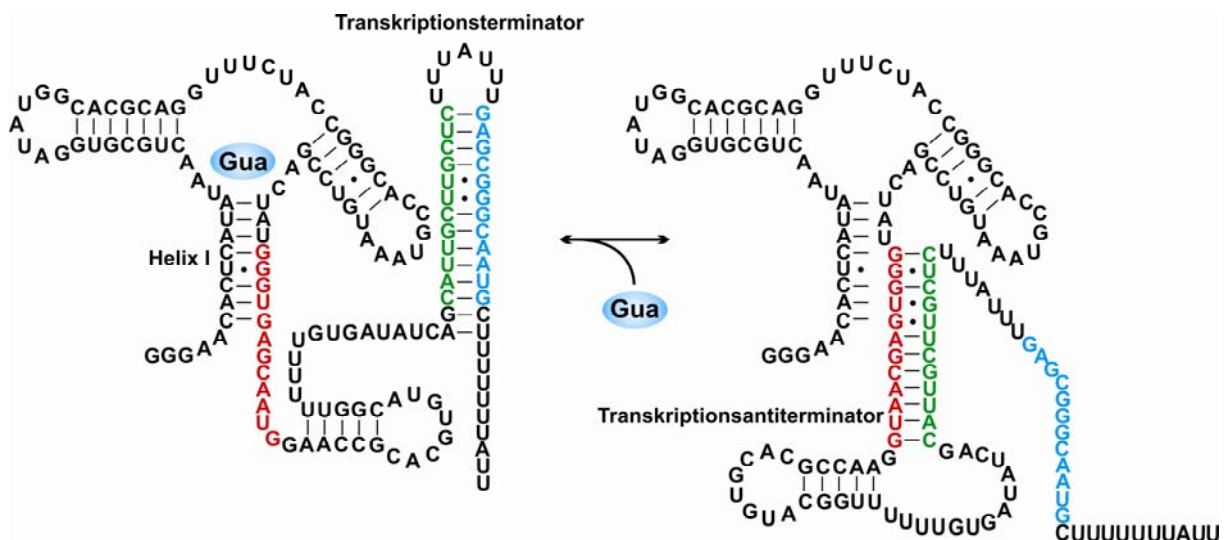


Abbildung 1.5

Genregulatorische Wirkung des *xpt-pbuX* Guanin-Riboswitches aus *B.subtilis* durch Transkriptionsabbruch. Die Bindung von Guanin an die Aptamerdomäne stabilisiert Helix I, wodurch der Transkriptionsterminator (grün/blau) ausgebildet wird, der zum vorzeitigen Transkriptionsabbruch führt. In Abwesenheit von Guanin bildet sich der Transkriptionsantiterminator (rot/grün) aus, durch den die Ausbildung des Transkriptionsterminators unterbunden wird.

Die Aptamerdomäne des *pbuE* Adenin-bindenden Riboswitches aus *B.subtilis* bindet Adenin mit einer Affinität von 300 nM, 2,6-Diaminopurin (2,6-DAP) mit einer Affinität von 10 nM und Guanin mit $>10 \mu\text{M}$ (Mandal und Breaker, 2004) (Tabelle 5). In der Expressionsplattform dieses Adenin-bindenden Riboswitches wurde ebenfalls ein Transkriptionsterminator gefunden. Dies ist in Übereinstimmung mit der Tendenz, dass Riboswitche aus Gram-positiven Organismen die Genexpression durch vorzeitigen Transkriptionsabbruch regulieren (Winkler und Breaker, 2003). Wenn dieser Transkriptionsterminator ausgebildet ist, umfasst sein 5'-Ende Nukleotide

des 3'-Endes von Helix III und I, was die gleichzeitige Ausbildung der Aptamerdomäne und des Transkriptionsterminators unmöglich macht. Somit bildet sich der Transkriptionsterminator nur aus, wenn die Aptamerdomäne zerstört ist. Folglich führt die Bindung von Adenin zur Stabilisierung der Aptamerdomäne und unterbindet die Ausbildung des Transkriptionsterminators (Abbildung 1.6). Damit stellt der *pbuE* Adenin-bindende Riboswitch eine Ausnahme dar, denn er ist einer von wenigen bekannten Riboswitchen, der in seiner Ligand-gebundenen Form die Genexpression aktiviert. Dieser Riboswitch reguliert in *B.subtilis* das *pbuE* Operon, das für eine Purin-Effluxpumpe kodiert. Darum ist es sinnvoll, dass die Genexpression dieser Purin-Effluxpumpe bei erhöhten Konzentrationen von freiem Adenin in der Zelle aktiviert wird.

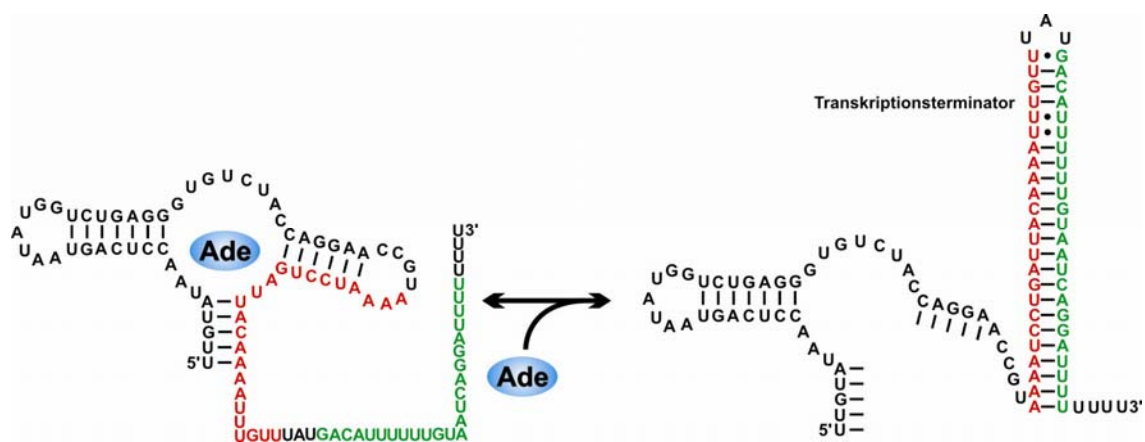


Abbildung 1.6

Genregulatorische Wirkung des *pbuE* Adenin-Riboswitches aus *B.subtilis* durch Transkriptionsabbruch. Die Bindung von Adenin stabilisiert die Aptamerdomäne, so dass der Transkriptionsterminator nicht ausgebildet werden kann. In Abwesenheit von Adenin bildet sich der Transkriptionsterminator aus, zerstört damit die Aptamerdomäne und macht Adeninbindung an sie unmöglich.

In vitro Experimente zeigen, dass eine C74U Mutante des Guanin-bindenden Riboswitches dessen Spezifität von Guanin zu Adenin ändert. Ebenso zeigt eine U74C Mutante des Adenin-bindenden Riboswitches *in vitro* nun Spezifität für Guanin und nicht mehr für Adenin (Mandal und Breaker, 2004). Diese Beobachtung zusammen mit der jeweiligen Sequenzkonservierung an Position 74 des Guanin- bzw. Adenin-bindenden Riboswitches führte zu der Annahme, dass das Nukleotid an Position 74 für die Spezifität des jeweiligen Purin-bindenden Riboswitches verantwortlich ist. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Guanin an den Guanin-bindenden Riboswitch über die Ausbildung eines intermolekularen Watson-Crick Basenpaars mit dem Cytidin in Position 74 bindet und dass Adenin an das Uridin des Adenin-bindenden Riboswitch ebenso unter Ausbildung eines intermolekularen Watson-Crick Basenpaars bindet (Mandal und Breaker, 2004).

Neben den in dieser Arbeit durchgeführten NMR-Experimenten zum molekularen Bindungsmechanismus des Guanin- bzw. Adenin-bindenden Riboswitches an seinen jeweiligen Metaboliten (Noeske et al., 2005) wurden Ende 2004 die Röntgenstrukturen dieser beiden Komplexe publiziert (Batey et al., 2004; Serganov et al., 2004). Mit Hilfe dieser Daten konnte die Ausbildung eines intermolekularen Watson-Crick Basenpaars zwischen dem jeweiligen Metaboliten und dem angesprochenen Nukleotid in Position 74 der Riboswitch-RNA direkt gezeigt werden, wie es in Kapitel 3 beschrieben wird.

Die Röntgenstrukturen der Aptamerdomänen der Guanin- bzw. Adenin-bindenden Riboswitches in Komplex mit ihren natürlichen Metaboliten zeigten, dass die Tertiärstrukturen der Aptamerdomänen der beiden Purin-bindenden Riboswitches nahezu identisch sind. Die RNA bildet eine Struktur aus, die an eine Stimmgabel erinnert, in der Helix I den Stiel und Helix II und III die Zinken darstellen. Die Helices II und III sind parallel angeordnet und durch fünf weitreichende Basenpaarungen von Nukleotiden der Schlaufen II und III miteinander verankert (Abbildung 1.4). Zwei dieser Basenpaare sind kanonische G:C Watson-Crick Basenpaare und werden durch die Nukleotide G38:C60 und G37:C61 gebildet. Die Nukleotide U34:A65, A33:A66 und A35:A64 bilden zusätzlich drei nicht-kanonische Basenpaare aus. Die Basenpaare G37:C61 und U34:A65 sowie G38:C60 und A33:A66 bilden je ein Basenquartett aus und tragen so durch weitere Wasserstoffbrückenbindungen zur Stabilisierung der gebildeten Schlaufen-Schlaufen Wechselwirkung bei. Die Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen Wechselwirkung ist essentiell für die Purinbindung, denn Mutationen der Schlaufen II und III, die eine Wechselwirkung verhindern, führen zum Verlust der Purinbindungsfähigkeit der Purin-bindenden Riboswitch-RNA (Batey et al., 2004; Lemay et al., 2006).

Die in der zentralen Drei-Wege-Kreuzung lokalisierte Purinbindungstasche wird durch Nukleotide der Segmente J1-2, J2-3 und J3-1 ausgebildet und weist zwei Basentripel oberhalb und zwei weitere Basentripel unterhalb der Purinbindungsstelle auf. Die oberhalb der Bindungstasche gelegenen Basentripel bestehen aus A23·G46:C53 und dem wasservermittelten A73·A52:U22 und werden durch Nukleotide aus J1-2, J2-3 und J3-1 gebildet. Die Basentripel unterhalb der Purinbindungsstelle bestehen aus C50·U75:A21 und U49·A76:U20 und werden durch Nukleotide von J2-3 und den beiden apikalen Basenpaaren von Helix I ausgebildet. Auf diese Weise bildet die RNA eine Bindungstasche für den Purinliganden aus, die dessen Oberfläche zu 97,8% umgibt (Batey et al., 2004). Keine zuvor charakterisierte RNA-Ligand Wechselwirkung zeigt eine Liganderkennung von diesem Ausmaß.

TPP-bindender Riboswitch

Der TPP-bindende Riboswitch stellt die einzige Riboswitchklasse dar, die bislang in allen drei Domänen des Lebens gefunden werden konnte. So wurden Vertreter dieser Riboswitchklasse

bei den Bakterien in allen fünf Proteobakterienklassen und in unterschiedlichen Cyanobakterien gefunden, aber auch in Archaeen und bei den Eukaryoten in einigen Pilzen und Pflanzen, wie *Oryza* und *Arabidopsis* (Cheah et al., 2007; Kubodera et al., 2003; Sudarsan et al., 2003a; Winkler et al., 2002a). Demnach ist es wahrscheinlich, dass die ersten Vertreter des TPP-Riboswitches bereits vor mehreren Milliarden Jahren entstanden sind, bevor sich die drei Domänen des Lebens trennten. Vertreter des TPP-Riboswitches wurden im 5'-UTR von Bakterien gefunden, wo sie die Genexpression über vorzeitigen Transkriptionsabbruch bzw. Maskierung der SD-Sequenz regulieren, aber auch in Introns von Pilzgenen, wo sie den mRNA-Spleißprozess regulieren (Cheah et al., 2007) und im 3'-UTR von pflanzlichen mRNAs, wo sie wahrscheinlich die mRNA-Stabilität beeinflussen (Sudarsan et al., 2003a).

Der *thiM* TPP-Riboswitch aus dem Gram-negativen Bakterium *E.coli* reguliert die Genexpression auf der Ebene der Translationsinitiation. Im Metabolit-freien Zustand bildet die Anti-SD-Sequenz der Expressionsplattform Basenpaarungen mit der Aptamerdomäne aus, wodurch die SD-Sequenz einzelsträngig vorliegt und vom Ribosom erkannt werden kann, so dass die Translation der mRNA abläuft. In der TPP-gebundenen Form kann die Anti-SD-Sequenz keine Wechselwirkung mit der Aptamerdomäne eingehen und bildet somit eine helikale Struktur mit der SD-Sequenz aus, wodurch diese maskiert wird und die Initiation der Translation unterdrückt wird (Abbildung 1.7). Auf diese Weise wird die Expression des *thiMD* Operons beeinflusst, dessen Genprodukte ThiM und ThiD an der Biosynthese von TPP durch Aufnahme und Phosphorylierung von TPP-Vorläuferverbindungen aus dem Kulturmedium beteiligt sind (Begley et al., 1999).

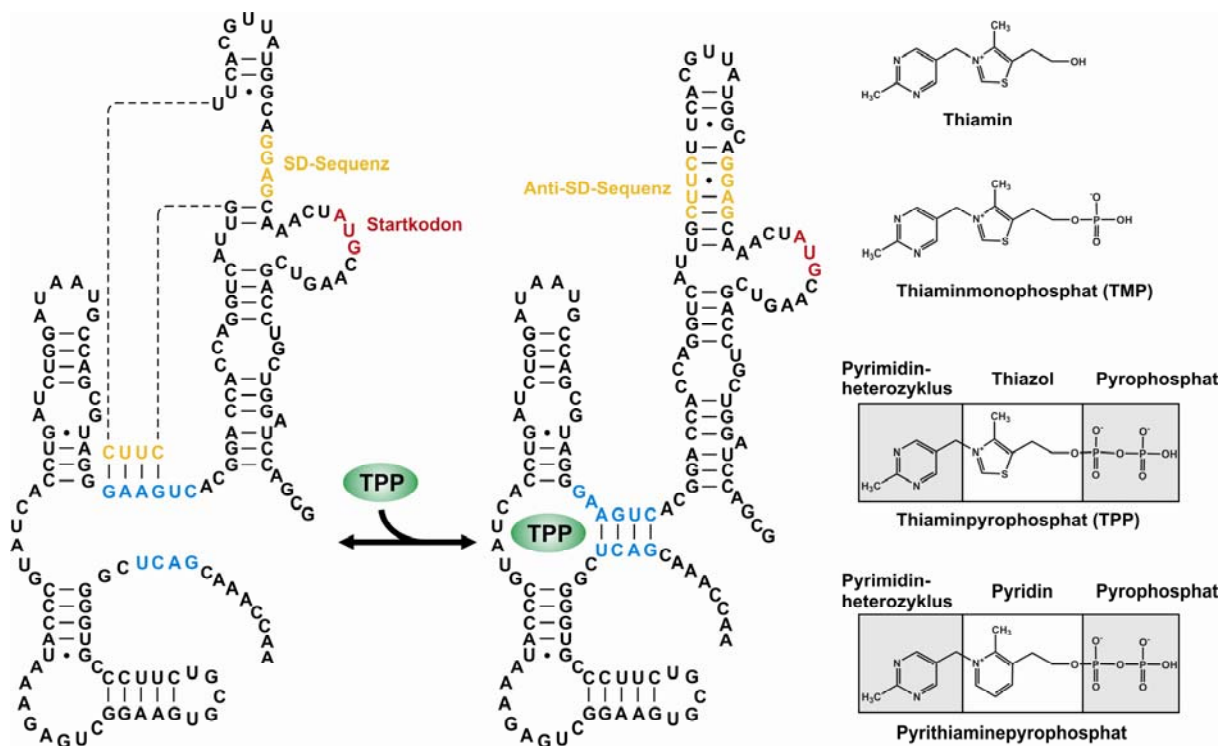


Abbildung 1.7

Genregulatorische Wirkung des *thiM* TPP-Riboswitches aus *E.coli* durch Inhibierung der Translationsinitiation. Im TPP-ungebundenen Zustand bildet ein Teil der Expressionsplattform (Anti-SD-Sequenz) mit Bereichen der Aptamerdomäne Basenpaarungen aus, wodurch die SD-Sequenz für das Ribosom zugänglich ist und die Translation initiiert werden kann. Im TPP-gebundenen Zustand maskiert die Anti-SD-Sequenz die SD-Sequenz, wodurch die Initiation der Translation unterbunden ist. Chemische Struktur von Thiamin, Thiaminmonophosphat, Thiaminpyrophosphat und des Antimikrobikums Pyrithiaminepyrophosphat.

Durch biochemische Untersuchungen konnten die Affinitäten dieses Riboswitches für die Metaboliten Thiamin (50 μ M), TMP (3 μ M) und TPP (600 nM) festgestellt werden (Winkler et al., 2002a). Interessanterweise nimmt die Affinität der Metaboliten mit steigender Anzahl an negativ geladenen Phosphatgruppen zu, was ungewöhnlich erscheint, da das RNA-Molekül ein Polyanion ist. Diese Beobachtung wird durch biochemische (Yamauchi et al., 2005) und die in dieser Arbeit beschriebenen NMR-spektroskopischen (Noeske et al., 2006) Ergebnisse erklärt, die eine Mg^{2+} -Abhängigkeit der Ligandbindung an den TPP-Riboswitch demonstrieren. Außerdem findet man in den 2006 publizierten Röntgenstrukturen der Aptamerdomäne des TPP-bindenden Riboswitches gebunden an TPP, dass in *A.thaliana* ein (Thore et al., 2006) und in *E.coli* zwei (Serganov et al., 2006) Mg^{2+} -Ionen, die an der Metabolitbindung beteiligt sind.

Der *thiM* TPP-Riboswitch aus *E.coli* in Komplex mit TPP bildet zwei parallel zueinander angeordnete helikale Elemente aus (P2, P3, J2/3 und P4, P5, J4/5, Schlaufe V), die durch ein

Scharnier (P1, J2/4) verbunden sind. Neben dem Scharnier geht das Ende des einen helikalen Arms (Schlaufe V) mit einem Bereich des zweiten helikalen Arms (P3) Basenpaarungen ein und stabilisiert somit die globale Struktur der RNA und bildet die Metabolitbindungstasche aus, die zwischen den beiden helikalen Armen liegt (Abbildung 1.8). TPP, das aus einem Pyrimidinheterozyklus, einem Thiazolring und einer Pyrophosphateinheit besteht, bindet in einer gestreckten Konformation zwischen die beiden helikalen Arme und verbrückt diese dadurch. Dabei bildet der Pyrimidinheterozyklus Stapelwechselwirkungen mit zwei Guanosinen und Wasserstoffbrückenbindungen mit einem weiteren Guanosin und einem Zuckerrest aus J2/3 und P2 der RNA aus. Die Pyrophosphateinheit bindet an verschiedene Guanosin- und einen Cytidinrest aus J4/5 im anderen helikalen Arm durch direkte und Mg^{2+} -vermittelte Wasserstoffbrückenbindungen. Der Thiazolring des TPP wird nicht von der RNA erkannt, wodurch die Wirkungsweise des Antimikrobikums Pyrithiaminepyrophosphat, das statt des Thiazolrings einen Pyridinring trägt, erklärt werden kann (Serganov et al., 2006). Pyrithiaminpyrophosphat wird somit in ähnlicher Weise wie TPP an den TPP-Riboswitch binden, da der Pyridinring nicht erkannt wird, und somit die Genexpression der am TPP-Stoffwechsel beteiligten Gene unterdrücken.

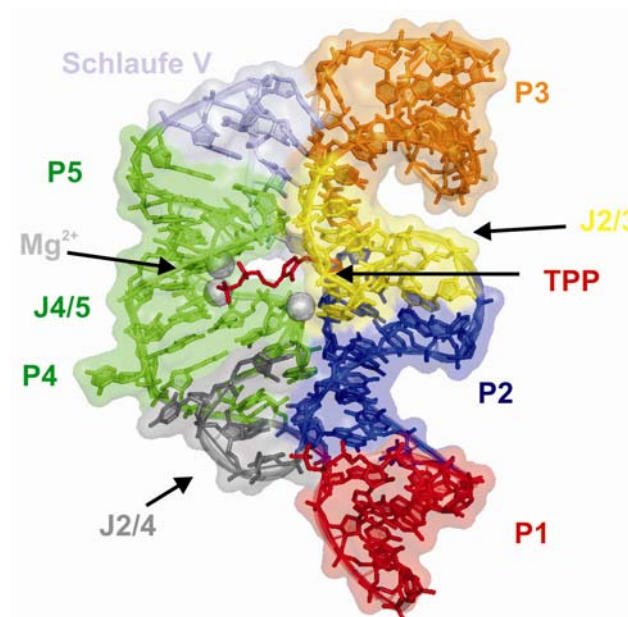
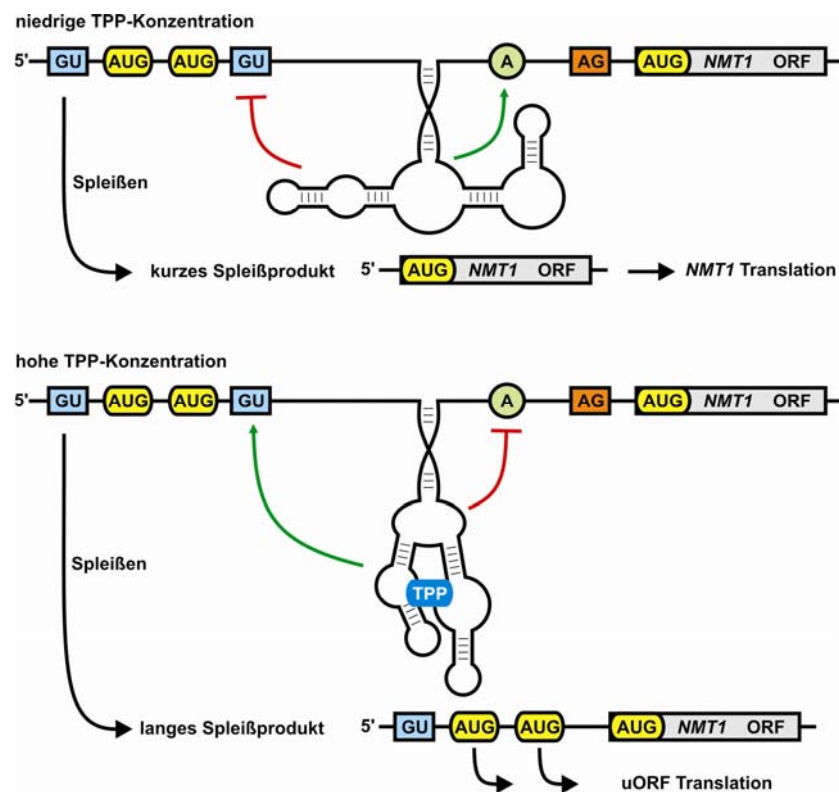


Abbildung 1.8

Röntgenstruktur des *thiM* TPP-Riboswitches aus *E.coli* im Komplex mit TPP (Serganov et al., 2006). Die RNA nimmt eine kompakte Tertiärstruktur ein. Die beiden helikalen Elemente bestehend aus P2, J2/3 und P3 bzw. P4, P4/5, P5 und Schlaufe V werden durch das gebundene TPP verbrückt. TPP bindet in einer gestreckten Konformation. Die Erkennung des Pyrophosphatrestes von J4/5 wird durch zwei Mg^{2+} -Ionen vermittelt.

Kontrolle des alternativen RNA-Spleißens durch einen TPP-Riboswitch

Im filamentösen Pilz *Neurospora crassa* wurden in den Introns verschiedener Gene Vertreter der TPP-bindenden Aptamerdomänen gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass Bindung von TPP an diese TPP-Aptamerdomänen zu konformationellen Änderungen führt, die einen alternativen Spleißprozess kontrollieren und dadurch die Expression des jeweiligen Gens beeinflussen. Die Expression des *NMT1*-Gens, das am Thiaminstoffwechsel beteiligt ist, wird in Abwesenheit von TPP stimuliert (Abbildung 1.9). Die *NMT1* pre-mRNA besitzt zwei 5'-Spleißstellen, zwischen denen zwei weitere Startkodons (AUG) liegen. In der TPP-freien Form verdeckt ein Teil der TPP-Aptamerdomäne die zweite 5'-Spleißstelle und dirigiert so die Verzweigungsstelle (A) zur ersten 5'-Spleißstelle, wodurch die beiden zusätzlichen Startkodons entfernt werden. Die so gespleißte mRNA führt zur effektiven Translation des *NMT1* Proteins (Abbildung 1.9, oben). Bei höheren TPP-Konzentrationen bindet TPP an die TPP-Aptamerdomäne, wodurch die zweite 5'-Spleißstelle zugänglich wird, aber die Verzweigungsstelle nicht mehr so flexibel ist, was die Spleißeffizienz herabsetzt. Falls ein Spleißvorgang stattfindet, wird die Verzweigungsstelle an die zweite 5'-Spleißstelle dirigiert. Dadurch wird in jedem Fall eine mRNA zurück gelassen, die mehrere stromaufwärts gelegene offene Leseraster (*upstream open reading frame*, uORF) aufweist (Cheah et al., 2007) (Abbildung 1.9, unten). Das Auftreten von uORFs führt bei der Translation zur Konkurrenz zwischen der Translation der unterschiedlichen uORFs und dem eigentlichen ORF, wodurch die Expression des nachfolgenden Gens *NMT1* stark herabgesetzt wird (Vilela und McCarthy, 2003).

**Abbildung 1.9**

Vorgeschlagerener Mechanismus des TPP-Riboswitch vermittelten alternativen Spleißensprozesses des *NMT1*-Gens aus *N.crassa*. Hierbei werden Schlüsselemente des Spleißvorgangs je nach TPP-Bindungszustand des TPP-Riboswitches aktiviert (grüner Pfeil) oder inhibiert (rote Linie). GU: 5'-Spleißstelle; A: Verzweigungsstelle; AG: 3'-Spleißstelle. Abbildung in Anlehnung an (Cheah et al., 2007).

Die Daten von Cheah et al. zeigen eindrucksvoll, wie Riboswitche die Spleißeffizienz und die Wahl der Spleißstellen modulieren können.

Kontrolle der RNA-Prozessierung durch das *glmS*-Ribozym

Ein neu entdeckter Riboswitch im 5'-UTR des *glmS*-Gens von einigen Gram-positiven Bakterien reguliert dessen Expression auf der Ebene der mRNA-Stabilität. Das *glmS*-Gene kodiert für eine Glucosamin-6-phosphat-Synthetase, die Fructose-6-Phosphat zu Glucosamin-6-phosphat (GlcN6P) umwandelt. GlcN6P ist ein wichtiger Vorläufer für die bakterielle Zellwandbiosynthese. Die Bindung von GlcN6P an den *glmS*-Riboswitch stimuliert nicht, wie in anderen Riboswitchklassen beobachtet, eine konformationelle Änderung der RNA, sondern führt zur Selbstspaltung der RNA. Somit handelt es sich hierbei weniger um einen Riboswitch als vielmehr um ein neues, Metabolit-bindendes, natürliches Ribozym. Durch die GlcN6P-induzierte katalytische Aktivität wird die mRNA in einer Metallion-abhängigen Reaktion stromaufwärts zur GlcN6P-Bindungsstelle gespalten (Abbildung 1.2), was sich auf die

Expression des *glmS*-Gens negativ auswirkt. Die Spaltungsrate der RNA ist in Gegenwart von GlcN6P 1000-fach erhöht und wird nicht durch verwandte Metaboliten wie Glucose-6-Phosphat oder Glucosamin induziert (Winkler et al., 2004). Die genaue Grundlage der Hemmung der Genexpression, die durch die Spaltung der RNA hervorgerufen wird, ist noch unklar. Es wird aber spekuliert, dass die verkürzte RNA leichter von RNasen erkannt wird und folglich schneller abgebaut wird. Aus kristallographischen Untersuchungen des *glmS*-Ribozyms geht hervor, dass die RNA eine starre vorgeformte Bindungstasche ausbildet und im Laufe der Spaltungsreaktion seine Konformation nur unwesentlich ändert. Auch konnte gezeigt werden, dass die Aminogruppe des gebundenen GlcN6P an einer Säure-Base-Reaktion teilnimmt, die zur Spaltung einer bestimmten Phosphodiesterbindung führt. Das für die katalytische Aktivität essentielle Metallion ist an der Bindung der Phosphatgruppe des GlcN6P beteiligt, nicht jedoch in den Spaltungsmechanismus involviert (Klein und Ferre-D'Amare, 2006).

Tandemriboswitche

Es konnte gezeigt werden, dass die Kontrolle der Genexpression durch ein Riboswitchelement in der 5'-UTR einen verbreiteten Mechanismus darstellt. Anscheinend ist die RNA-basierte Genregulation durch ein einzelnes Riboswitchelement aber nicht immer ausreichend, da vor manchen bakteriellen Genen mitunter auch zwei Riboswitchelemente in einer Tandem-Anordnung gefunden wurden. Dabei ist das häufigste Motiv die Aneinanderreihung von zwei vollständigen Riboswitchen (Aptamerdomäne mit Expressionsplattform). Solche Anordnungen wurden unter anderem für Vertreter der TPP- bzw. der Adenosylcobalamin-Riboswitchklassen beschrieben. Die Aneinanderreihung von zwei gleichen Riboswitchen führt zu einer stärkeren Antwort auf Metabolitkonzentrationsänderungen, als es ein einzelner Riboswitch bewerkstelligen könnte (Sudarsan et al., 2006).

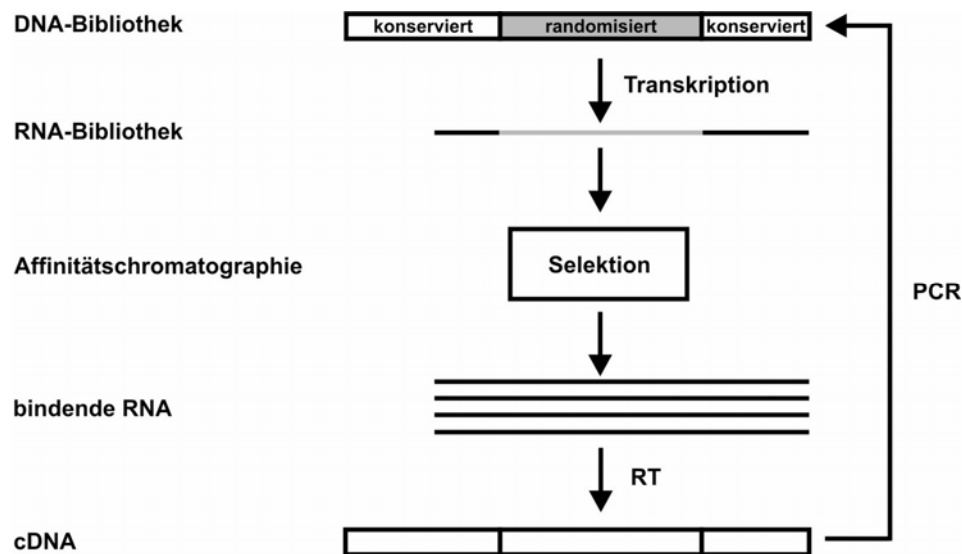
Des Weiteren wurde in *B. clausii* in der 5'-UTR des *metE*-Gens eine Aneinanderreihung eines vollständigen SAM-Riboswitches gefolgt von einem Adenosylcobalamin-Riboswitch gefunden. Beide Riboswitche tragen einen Transkriptionsterminator in der Expressionsplattform und agieren somit durch vorzeitigen Transkriptionsabbruch. Es konnte gezeigt werden, dass beide Riboswitche unabhängig voneinander wirken, denn die Bindung eines Metaboliten an einen der beiden Riboswitche beeinflusst nicht die Bindung des anderen Metaboliten an den anderen der beiden Riboswitche, so dass sie, wendet man Begrifflichkeiten der Informatik an, nach Boolescher Logik als so genannte NICHT-ODER (NOR)-Gatter agieren. Der Grund für das Auftreten von zwei verschiedenen Riboswitch-Klassen im 5'-UTR der *metE*-mRNA ist folgender: MetE und MethH katalysieren unabhängig von einander die Umwandlung von Homocystein zu Methionin, das dann durch MetK zu SAM umgewandelt

wird. Die Expression dieser drei Enzyme wird in der Anwesenheit von SAM über einen SAM-bindenden Riboswitch durch vorzeitigen Transkriptionsabbruch unterdrückt. In Gegenwart von Adenosylcobalamin sollte jedoch nur die Expression von MetE unterdrückt werden, da MetH mit dem Adenosylcobalaminderivat Methylcobalamin als Kofaktor effizienter die Umwandlung von Homocystein zu Methionin durchführt (Sudarsan et al., 2006).

Im Gegensatz dazu weisen viele Glycin-Riboswitche zwei hintereinander geschaltete Glycin-bindende Aptamerdomänen auf, die nur durch ein kurzes Verbindungsstück voneinander getrennt sind (Abbildung 1.2). Diese Tandem Glycin-Riboswitche regulieren die Expression von Proteinen, die am Glycinabbau beteiligt sind, und gehören neben dem Adenin-Riboswitch zu den wenigen Riboswitchen, die im Zuge der Metabolitbindung die Genexpression des nachfolgenden Gens positiv beeinflussen. Beide der Aptamerdomänen binden Glycin, jedoch führt die Bindung von Glycin an eine der Aptamerdomäne zu einer kooperativen Affinitätserhöhung um das 1000 fache für die Bindung von Glycin an die zweite Aptamerdomäne. Eine einzelne Glycin-Aptamerdomäne bindet Glycin mit einem Hill-Koeffizienten von 0,97 und die Tandem Glycin-Aptamerdomänen binden Glycin mit einem Hill-Koeffizienten von 1,64. Dies zeigt, dass die Glycin-Bindung an den Glycin-bindenden Riboswitch kooperativ ist (Mandal et al., 2004). Durch die kooperative Ligandbindung kann der Glycin-Riboswitch viel sensitiver auf Metabolitkonzentrationsänderungen reagieren, als einfache, einzeln auftretende Riboswitche. Durch diesen Mechanismus kann die Zelle bei erhöhten Glycinkonzentrationen beinahe digital die Expression von Glycin-abbauenden Enzymen aktivieren und bei fallenden Glycinkonzentrationen die Expression dieser Enzyme schlagartig ausschalten.

1.3 SELEX-Aptamere

Neben den über Milliarden von Jahren in der Natur evolutiv entstandenen Riboswitchen sind auch durch SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*)-Verfahren erhaltene RNA-Moleküle bekannt, die mit hoher Affinität und Spezifität kleine Moleküle binden (Ellington und Szostak, 1990; Joyce, 1989; Klug und Famulok, 1994). Diese SELEX-Aptamere binden genau wie Riboswitch niedermolekulare Liganden mit dem Unterschied, dass sie durch *in vitro* Evolution entstanden sind. Es gibt verschiedene Klassen von SELEX-Aptameren, die unterschiedliche Liganden (Famulok, 1999) wie z.B. Nukleotide, Aminosäuren, aromatische Farbstoffe, Coenzyme und Aminoglycoside binden. Im Zuge der *in vitro* Evolution werden RNA-Moleküle aus einer Bibliothek mit 10^{14} – 10^{16} unterschiedlichen Sequenzen selektioniert, was eine beträchtliche Komplexität darstellt in Anbetracht dessen, dass eine Maus nur 10^9 – 10^{11} verschiedene Antikörper generieren kann (Famulok und Faulhammer, 1994). Der Ausgangspunkt ist eine Bibliothek von DNA-Oligonukleotiden, die neben einem zentralen Bereich mit randomisierter Sequenz von zwei konservierten Bereichen flankiert ist. Diese konservierten Bereiche enthalten neben Bindungsstellen für die in der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaktion*, PCR) eingesetzten Primer einen T7-RNA-Polymerasepromotor. In einem iterativen Prozess werden die RNA-Moleküle, die am stärksten an einen bestimmten Liganden binden, selektioniert und amplifiziert. Hierbei erfolgt die Selektion und Aufreinigung der bindenden RNA-Moleküle oft durch Affinitätschromatographie, bei der der jeweilige Ligand auf dem Säulenmaterial immobilisiert ist. Bindungskompetente RNA wird von dem exponierten Liganden zurückgehalten und durch eine Lösung mit freiem Liganden eluiert. Die eluierte RNA wird durch reverse Transkription (RT)-PCR in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, die in einem erneuten PCR-Schritt amplifiziert wird (Abbildung 1.10). Durch erfolgreiche Selektions- und Amplifikationszyklen werden so RNA-Moleküle exponentiell amplifiziert, die spezifisch einen bestimmten Liganden binden. Am Ende erhält man einige wenige RNA-Moleküle, die hochaffin an einen Liganden binden, aus deren Sequenz eine Konsensussequenz für das RNA-Aptamer abgeleitet wird.

**Abbildung 1.10**

SELEX. Ausgangspunkt ist eine DNA-Bibliothek, die einen randomisierten Bereich besitzt, der von konservierten Bereichen flankiert ist. Die konservierten Bereiche tragen neben den für die PCR benötigten Primerbindungsstellen einen T7-RNA-Polymerasepromotor. Die durch Transkription erhaltene RNA-Bibliothek wird über eine Affinitätschromatographie selektioniert und man erhält bindungskompetente RNA, die in einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben wird. Die cDNA wird durch PCR amplifiziert und einem neuen Selektionszyklus unterworfen. RT: Reverse Transkription; PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion; cDNA: komplementäre DNA

Die so generierten SELEX-Aptamere können ihre Liganden mit Affinitäten im nanomolaren Bereich binden (Hermann und Patel, 2000). Es wurde jedoch festgestellt, dass die Affinität mit der Komplexität des Aptamers korreliert ist. Die Komplexität steigt zum einen mit der Länge und der Anzahl der Schlaufen und der Anzahl der Helices in der Sekundärstruktur der RNA und zum anderen mit steigender Konserviertheit von Nukleotiden. Auch wurde beobachtet, dass eine hochaffine Bindung an planare und polare Liganden weniger Komplexität des Aptamers erfordert, als Bindung mit vergleichbarer Affinität an einen flexiblen, nicht polaren Liganden (Carothers et al., 2004). SELEX-Aptamere sind mit 30 – 50 Nukleotiden generell kleiner und auch strukturell nicht so komplex wie ihre natürlich vorkommenden Verwandten. Der Grund dafür ist, dass die SELEX-Aptamere allein auf Ligandbindung selektioniert wurden, wohingegen Riboswitche neben der Ligandbindung auch noch genregulatorische Funktionen übernehmen müssen.

Strukturelle Untersuchungen von SELEX-Aptameren haben Mitte der 90er Jahre enorm zum Verständnis von RNA-Strukturen und der Wechselwirkung von RNA mit niedermolekularen Liganden beigetragen. Die Strukturen boten Einblick in die Grundlagen der molekularen Erkennung von Liganden durch RNA und ihr Potential, zwischen nahe verwandten Liganden zu unterscheiden (Hermann und Patel, 2000). Die Ligandbindungstasche wird oft durch nicht-

kanonische Basenpaare gebildet, in die der Ligand über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen und durch Wasserstoffbrückenbindungen bindet. Wie es für einige Riboswitche gezeigt werden konnte und für andere postuliert ist, so liegen auch die Ligandbindungsregionen der SELEX-Aptamere in der Ligand-ungebundenen Form unstrukturiert vor. Durch die Ligandbindung wird eine komplexe RNA-Architektur aufgebaut, in der der gebundene Ligand einen integralen Bestandteil darstellt (Hermann und Patel, 2000). Allerdings werden allgemein die Liganden in den SELEX-Aptameren nicht so umfassend in die RNA-Struktur eingebettet, wie es für Riboswitch-Ligand-Komplexe beobachtet wurde. SELEX-Aptamere bilden nicht mit allen funktionellen Gruppen des Liganden Wechselwirkungen aus, wohingegen natürliche Aptamerdomänen den gebundenen Liganden in einer Tasche beinahe vollständig umgeben. So erkennt man in den Strukturen der ATP (Dieckmann et al., 1996)-, GTP (Carothers et al., 2006)- und FMN (Fan et al., 1996)-Aptamere, dass die Phosphatgruppen nicht direkt von der RNA erkannt werden, sondern ins Lösungsmittel hinaus ragen. Dies erklärt auch, warum diese Aptamere die jeweiligen phosphorylierten Liganden mit vergleichbarer Affinität binden, wie deren dephosphorylierte Analoga.

Im Gegensatz dazu ist jedoch ein weiteres ATP-SELEX-Aptamer bekannt, das Mg^{2+} -abhängig ATP ca. 1000-fach stärker als AMP bindet, so dass in diesem Fall eine spezifische Mg^{2+} -vermittelte Erkennung der β - und γ -Phosphatgruppen postuliert wurde (Sazani et al., 2004). Auch ist ein cAMP-SELEX-Aptamer bekannt, in dem die Phosphatgruppe zwar nicht direkt, jedoch die Form des Phosphoriboserestes erkannt wird, und das keine Abweichungen toleriert (Koizumi und Breaker, 2000).

In alle bekannte Riboswitchen, die Metaboliten mit einer Phosphatgruppe binden, wird der Phosphatrest spezifisch erkannt. So wurde die spezifische Erkennung der Phosphatgruppe von FMN postuliert (Mironov et al., 2002; Winkler et al., 2002b) und die von TPP (Serganov et al., 2006; Thore et al., 2006) und GlcN6P (Klein und Ferre-D'Amare, 2006) bewiesen und ein Affinitätsverlust für die dephosphorylierten Analoga beobachtet.

Bisweilen zeigen aber auch die SELEX-Aptamere einen hohen Grad an Spezifität, wie im Fall des Theophyllin-Aptamers, das an seinen Liganden Theophyllin 10000-mal stärker als an Koffein bindet, welches sich lediglich in einer Methylgruppe unterscheidet (Jenison et al., 1994).

Die Theophyllin-, ATP- und GTP-Aptamere, die alle purinbasierte Liganden erkennen, weisen alle unterschiedliche Erkennungsmechanismen für den Purinrest ihres Liganden auf. Theophyllin wird über seine Hoogsteen-Seite von einem Cytidin (Zimmermann et al., 1997) und GTP über seine Hoogsteen-Seite von einem Guanosin der RNA erkannt (Carothers et al., 2006). ATP wird über seine Watson-Crick-Seite von der kleinen Furchen-Seite eines Guanosins der RNA erkannt (Dieckmann et al., 1996; Jiang et al., 1996). Somit erkennen alle SELEX-Aptamere ihren jeweiligen Purinliganden auf eine andere Weise und zusätzlich anders, als es

für den Erkennungsmechanismus von Purinliganden an Riboswitch-RNAs gefunden wurde (Batey et al., 2004; Noeske et al., 2005; Serganov et al., 2004)¹.

Xanthin-SELEX-Aptamer

1998 wurde ein weiteres SELEX-Aptamer beschrieben, das spezifisch die Purinbasen Guanin, Hypoxanthin und Xanthin mit einer Affinität im unteren mikromolaren Bereich bindet (Kiga et al., 1998). Die Konsensussequenz für dieses Xanthin-Aptamer hat eine Länge von 10 Nucleotiden und bildet eine interne Schlaufe aus. Die so gebildete Sekundärstruktur des Xanthin-Aptamers beinhaltet auch 9 Nucleotide, die in der SELEX-Prozedur als Primer-Bindungsstelle dienten und somit nicht evolutiv selektioniert wurden. Zwei von diesen 9 Nucleotiden, CG, liegen einzelständig gegenüber der internen Schlaufe vor (Abbildung 1.11) und sind somit wahrscheinlich an der Ausbildung der Bindungstasche beteiligt.

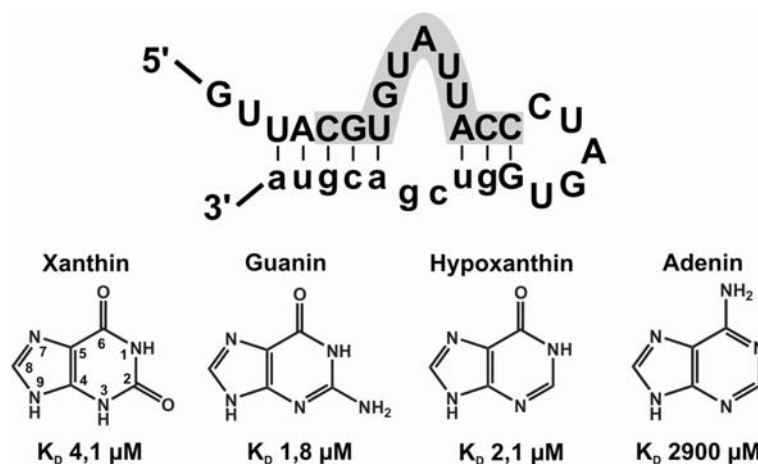


Abbildung 1.11

Xanthin-SELEX-Aptamer. Gezeigt ist die Sekundärstruktur des durch SELEX selektionierten Xanthin-Aptamers. Die Konsensussequenz ist grau hinterlegt und die Nucleotide, die aus der konservierten PCR-Primer-Region stammen, sind in kleinen Buchstaben dargestellt. Verschiedene Purinliganden mit ihren jeweiligen Bindungsaffinitäten sind aufgeführt und das Nummerierungsschema von Purinen ist am Beispiel von Xanthin dargestellt (Kiga et al., 1998).

Ein molekularer Bindungsmechanismus von einem Purinliganden an das Xanthin-Aptamer ist bislang noch nicht bekannt. Anhand von biochemischen Experimenten wird jedoch postuliert, dass das N1H1 und das N7 des Purinliganden direkt von der RNA erkannt werden und dass die Carbonylgruppe an Position 6 wichtig für den Erkennungsmechanismus ist, da Adenin nicht erkannt wird (K_D 2900 μM). Da das Xanthin-Aptamer nicht zwischen Guanin und Xanthin unterscheiden kann und 3-Methylxanthin mit ähnlicher Affinität wie Xanthin

¹ Reihenfolge folgt dem Datum der Einreichung der Manuskripte

gebunden wird, wird angenommen, dass sowohl die Position 2 als auch 3 des Purinliganden nicht spezifisch erkannt werden. Für die Position 9 ist lediglich bekannt, dass ein Riboserest, wie er in Guanosin auftritt, die Affinität ca. 100-fach herabsetzt (Kiga et al., 1998). Diese biochemischen Daten deuten darauf hin, dass auch in diesem Fall der Erkennungsmechanismus des artifiziellen Aptamers für den Liganden anders ist, als für den natürlich vorkommenden Hypoxanthin-bindenden Guanin-Riboswitch.

MATERIAL UND METHODEN

wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) erworben. Die Sequenzen der DNA-Matrizen werden durch Sequenzierung von SRD (Oberursel) nach dem Sanger-Verfahren auf ihre Richtigkeit überprüft.

Auf diese Art werden Plasmide hergestellt, die für folgende RNA-Konstrukte kodieren: G-Switch-wt, G-Switch, G-Switch-G37A/C61U, G-Switch-9-165, G-Switch-25-72, A-Switch-wt, A-Switch, TPP-Switch und X-Aptamer.

Diese Plasmide werden in *E.coli* DH5 α Zellen transformiert und aus den Bakterienkulturen isoliert. Dazu werden die transformierten Zellen auf ampicillinhaltigen (0,1 mg/ml) LB-Agar-Platten ausgestrichen und einzelne Klone zur Animpfung von 50 ml LB-Vorkulturen (0,1 mg/ml Ampicillin) verwendet. Die Vorkulturen werden bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von ~ 0,4 wachsen gelassen und dann durch Zentrifugation (5000 g, 5 min) geerntet. Das Zellpellet wird mit LB-Medium gewaschen und anschließend suspendiert und zum Animpfen von zwei 1 L ampicillinhaltigen (0,1 mg/ml) Hauptkulturen verwendet. Die Hauptkulturen werden bei 37°C ca. 16 h geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 1,8 – 2,1 erreicht wird. Die Zellen werden bei 6000 g, 7 min zentrifugiert und die Plasmide aus dem erhaltenen Zellpellet werden mit einem Mega-Prep-Kit von Qiagen (Hilden) isoliert. DNA-Konzentrationen werden UV-photometrisch bei 260 nm bestimmt unter der Annahme, dass 1 OD₂₆₀ ~55 μ g doppelsträngiger DNA entspricht (Sambrock et al., 1989).

Die isolierten Plasmide werden mit 120 Einheiten des Restriktionsenzym SmaI (New England Biolab, Frankfurt am Main) pro mg doppelsträngiger DNA linearisiert. Lediglich das für die G-Switch-9-165-RNA kodierende Plasmidkonstrukt wird mit 120 Einheiten des Restriktionsenzym BamHI pro mg doppelsträngiger DNA linearisiert. Mit einem 2%igen Agarosegel wird die Vollständigkeit der Linearisierung überprüft. Die DNA wird durch Phenol/Choroform-Extraktion mit Rotiphorese (Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol, Roth, Karlsruhe) aufgereinigt und Phenolreste werden durch Chloroformextraktion entfernt. Die DNA wird mit Isopropanol gefällt, in H₂O aufgenommen und konnte nun als Matrize in der *in vitro* Transkription eingesetzt werden.

Für die *in vitro* Transkription der G-Switch-9-134-RNA wird das PCR-Produkt als DNA-Matrize eingesetzt. Hierzu wird das PCR-Produkt lediglich mit dem PCR-Reinigungs-Kit von Qiagen (Hilden) gereinigt.

RNA-Synthese durch *in vitro* Transkription

Die für die *in vitro* Transkription benötigte T7-RNA-Polymerase wurde durch Matthias Görlach (IMB, Jena) bzw. Elke Stinal zur Verfügung gestellt.

Die Ausbeuten der RNA-Synthese durch *in vitro* Transkription werden zunächst optimiert, indem Testtranskriptionen im 50 μ l Maßstab angesetzt werden und ihr Verlauf und ihre

Ausbeuten per denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und analytischer HPLC bestimmt werden. Hierbei werden die Konzentrationen von Magnesiumionen, DNA-Templat und Nukleotidtriphosphaten (rNTP) optimiert (Tabelle 2). Die prozentuale Zusammensetzung der unterschiedlichen Nukleotidtriphosphate in der *in vitro* Transkription wird dem Vorkommen des jeweiligen Nukleotids in der herzustellenden RNA angepasst. Zur Herstellung von selektiv markierten RNA-Proben werden die unmarkierten Nukleotidtriphosphate gegenüber dem markierten Nukleotidtriphosphat in einem 1,2 fachen molaren Überschuss eingesetzt. Unmarkierte Nukleotidtriphosphate werden von Sigma, ¹⁵N, ¹³C-markierte Nukleotidtriphosphate werden von Silantes bezogen.

feste Bedingungen	
200 mM	Tris/Glutamat Puffer pH 8,1
2 mM	Spermidin
20 mM	Dithiothreitol
0,07 mg/ml	T7-Polymerase
variable Bedingungen	
5-40 mM	Magnesiumacetat
1,2-5 mM	für jedes rNTP
10-200 nM	DNA-Matrize

Tabelle 2

Optimierung der RNA *in vitro* Transkription. Die festen Bedingungen bleiben in allen *in vitro* Transkriptionen unverändert, wohingegen die variablen Bedingungen für jede RNA-Synthese erneut bestimmt werden.

Präparative *in vitro* Transkriptionen werden in 10–45 ml Ansätzen bei Bedingungen, die in den analytischen Ansätzen größtmögliche Ausbeuten erzielen, durchgeführt. Vor der Aufreinigung der RNA wird der bei der *in vitro* Transkription sich bildende Magnesiumphosphat-Niederschlag abzentrifugiert (8500 g, 4°C, 20 min). In den Fällen, in denen ein PCR-Produkt als DNA-Matrize eingesetzt wird, wird der abzentrifugierte Transkriptionsansatz mit 70 Einheiten DNase (RNase frei, Roche Diagnostics, Mannheim) pro ml Transkriptionsansatz 1 h bei Raumtemperatur versetzt.

RNA Aufreinigung

Die weitere Aufreinigung der RNA erfolgt über säulenchromatographische Verfahren. Zunächst werden auf einer DEAE-Sepharose FF-Anionenaustauschersäule (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) die DNA-Matrize und die T7-Polymerase von dem Reaktionsgemisch abgetrennt. Für einen 40 ml Transkriptionsansatz werden ca. 12 ml Säulenmaterial benötigt. Die Säule wird mit 5 Säulenvolumen 0,1 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,5) äquilibriert, bevor der Überstand der Transkriptionsreaktion aufgetragen wird. Die an das Säulenmaterial bindende RNA wird mit einem Stufengradienten von je 5 Säulenvolumen Natriumacetatlösungen der Konzentrationen 0,6 M, 1 M, 2 M und 3 M (pH 5,5) eluiert und fraktioniert aufgefangen. Die gesammelten Fraktionen werden photometrisch bei 260 nm auf ihren RNA-Gehalt hin überprüft und durch denaturierende PAGE analysiert. Fraktionen, die die gewünschte RNA enthalten, werden vereinigt. Durch Zugabe des 20 fachen Volumens Ethanol wird die RNA über Nacht bei -20°C präzipitiert. Das RNA-Pellet wird durch Zentrifugation (25 min, 9000 g, 4°C) abgetrennt und anschließend in Wasser gelöst, so dass eine RNA-Konzentration von ~150 OD₂₆₀/ml eingestellt wird.

Die weitere Aufreinigung erfolgt durch eine Ionenpaar-*reversed-phase*-Chromatographie (Pingoud et al., 1989) über eine präparative C₁₈-HPLC-Säule (Vydac-RP18, 10x250 mm, 300 Å, 5 µm) bei 60°C. Pro Lauf werden bis zu 100 OD₂₆₀ RNA aufgetragen. Für die Auftrennung der Reaktionsprodukte wird ein Acetonitril-Gradient verwendet, der durch folgende zwei Puffer erzeugt wird:

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

Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Flussrate [ml/min]
0	100	0	5
5	59	41	5
30	55	45	5
35	0	100	5
40	0	100	5
42	100	0	5
55	100	0	5

Tabelle 3

Lösungsmittelgradient für die präparative Aufreinigung der G-Switch-RNA mit einer C₁₈-HPLC-Säule.

Die RNA-haltigen Fraktionen werden durch ihre UV-Absorption bei 260 nm detektiert, aufgefangen und gefriergetrocknet. Im angegebenen Lösungsmittelgradienten hat die G-Switch-RNA eine Retentionszeit von 24 min.

Die RNA-haltigen gefriergetrockneten Fraktionen werden über ein Centricon YM-10 (Millipore, Billerica, USA) entsalzt. Schließlich wird die RNA auf eine Konzentration von 20-50 mg/ml aufkonzentriert. Um restliches Tetrabutylammoniumhydrogensulfat abzutrennen, wird die RNA mit dem fünffachen Volumen einer 2%igen (w/v) LiClO₄-Lösung in Aceton über Nacht bei -20°C gefällt. Die gefällte RNA wird durch Zentrifugation (9000 g, 25 min, 4°C) pelletiert und in ~1 ml ddH₂O aufgenommen.

RNA-Faltung

Die RNA wird nach der Synthese und Aufreinigung in eine homogene, monomere Konformation gefaltet. Dazu wird die in ddH₂O gelöste RNA folgendem Faltungsprotokoll unterzogen:

5 min bei 95°C

1:10 Verdünnung mit eiskaltem ddH₂O

1 Stunde auf Eis

Die Faltung wird durch native PAGE analysiert. Als Referenz dient eine RNA-Probe vor der Faltung.

RNA-Sequenzen

RNA	Sequenz	Synthese
G-Switch	GGG ACU CAU AUA ACU GCG UGG AUA UGG CAC GCA GGU UUC UAC CGG GCA CCG UAA AUG UCC GAC UAU GGG UCC C	enzym.
G-Switch-wt	GGG ACU CAU AUA AUC GCG UGG AUA UGG CAC GCA AGU UUC UAC CGG GCA CCG UAA AUG UCC GAC UAU GGG UCC C	enzym.
G-Switch-G37A/C61U	GGG ACU CAU AUA ACU GCG UGG AUA UAG CAC GCA GGU UUC UAC CGG GCA CUG UAA AUG UCC GAC UAU GGG UCC C	enzym.
G-Switch-25-72-wt	GGG CGU GGA UAU GGC ACG CCC GUU UCU ACG GGG CAC CGU AAA UGU CCC	enzym.
G-Switch-25-72- modifiziert	CUG CGU GGA UAU GGC ACG CAG UUU CCC CGG GCA CCG UAA AUG UCC G	chem.
G-Switch-25-45	CUG CGU GGA UAU GGC ACG CAG	chem.
G-Switch-9-165	GG AAC ACU CAU AUA ACU GCG UGG AUA UGG CAC GCA GGU UUC UAC CGG GCA CCG UAA AUG UCC GAC UAU GGG UGA GCA AUG GAA CCG CAC GUG UAC GGU UUU UUG UGA UAU CAG CAU UGC UUG CUC UUU AUU UGA GCG GGC AAU GCU UUA AAG GAU C	enzym.
G-Switch-9-134	GG AAC ACU CAU AUA ACU GCG UGG AUA UGG CAC GCA GGU UUC UAC CGG GCA CCG UAA AUG UCC GAC UAU GGG UGA GCA AUG GAA CCG CAC GUG UAC GGU UUU UUG UGA UAU CAG CAU UGC UUG CUC	enzym.
Modell-Terminator- RNA	AGC AUU GCU UGC UCU UUA UUU GAG CGG GCA AUG CU	chem.
Modell-Antiterminator- RNA	GGG UGA GCA AUG UUC GCA UUG CUU GCU C	chem.
Helix I+Antiterminator- RNA	CAC UCA UAC UUC GGU AUG GGU GAG CAA UGU UCG CAU UGC UUG CUC	chem.
A-Switch-wt	GGG CUU GUA UAA CCU CAA UAA UAU GGU UUG AGG GUG UCU ACC AGG AAC CGU AAA AUC CUG AUU ACA AGC CC	enzym.
A-Switch	GGG CUU GUA UAA CCU CAG UAA UAU GGU CUG AGG GUG UCU ACC AGG AAC CGU AAA AUC CUG AUU ACA AGC CC	enzym.
TPP-Switch	GGG ACU CGG GGU GCC CUU CUG CGU GAA GGC UGA GAA AUA CCC GUA UCA CCU GAU CUG GAU AAU GCC AGC GUA GGG AAG UCC C	enzym.

X-Aptamer	GGC ACG UGU AUU ACC CCU AGU GGG UCG ACG UGU C	chem.
X-Aptamer-M1	GGC ACG UGU AUU ACC CUU CGG GGU CGA CGU GUC	enzym.
X-Aptamer-M2	GGC ACG CGU AUU ACC CUU CGG GGU CGG CGU GUC	chem.
X-Aptamer-M3	GGC ACG UGU AUU ACC CUU CGG GGU UGA CGU GUC	chem.
X-Aptamer-M4	GGC ACG UGU AUA CCC UUC GGG GUC GAC GUG UC	chem.

Tabelle 4

Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten RNA-Konstrukte. Die Sequenz ist von 5' nach 3' angegeben. enzym.: enzymatisch, chem.: chemisch

2.2 Gelelektrophoretische Methoden

Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der Größe und Menge von DNA-Fragmenten werden 0,8-2%ige (w/v) Agarosegelelektrophoresen durchgeführt. Die DNA-Proben mit einem Volumen bis 20 μl werden mit 5 μl Auftragspuffer (0,1% Bromphenolblau in 50%iger Glycerinlösung) versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat pH 7,5, 1 mM EDTA) als Laufpuffer bei einer Spannung von 120 V. Die DNA wird durch eine Ethidiumbromid-Färbelösung (0,5 $\mu\text{g/ml}$ in Wasser) gefärbt und ist nun unter UV-Licht sichtbar. Mit einem Marker, der definierte Mengen verschiedener DNA-Fragmente enthält, kann über die Intensität der Banden Rückschlüsse auf die Konzentration der aufgetragenen DNA gezogen werden.

Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zu analytischen Zwecken wurde die RNA unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch mit einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Hierzu werden 15%ige denaturierende Gele (8 M Harnstoff in TBE-Puffer) der Größe 111mm x 70 mm x 0,75 mm eingesetzt. Die RNA-Proben ($\sim 0,02$ OD₂₆₀ bis 7 μl) werden mit 20 μl Auftragspuffer (99% Formamid, 0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylencyanol FF) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen werden. Die Auftrennung der RNA erfolgt bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA in 1x TBE (134 mM Tris, 45 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA) als Laufpuffer. Die RNA wird in einer Ethidiumbromidlösung angefärbt und ist nun unter UV-Licht sichtbar.

Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Analyse der RNA-Faltung werden Polyacrylamidgelelektrophoresen unter nativen Bedingungen durchgeführt. Die RNA-Proben ($\sim 0,05$ OD bis 22 μl) werden mit 3,5 μl Auftragspuffer (99% Glycerin, 0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylencyanol FF) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Es werden 10%ige Gele (50 mM Tris-Acetat, 100 mM Natriumacetat, pH 8,0) verwendet, an die in einem Laufpuffer (50 mM Tris-Acetat, 100 mM Natriumacetat, pH 8,0) eine Leistung P ($P=U \cdot I$) von max. 3 Watt unter Wasserkühlung angelegt wird. Die RNA

wird in einer Ethidiumbromidlösung angefärbt und ist nun unter UV-Licht bei 340 nm sichtbar.

2.3 UV-Spektroskopie

UV-spektroskopische Methoden werden angewendet, um DNA-, RNA- und Purinligand-Konzentrationen zu bestimmen. Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren basiert auf der Absorption ihres Purin- bzw. Pyrimidinnukleobasenteils bei 260 nm.

Die Messungen werden an einem Varian UV-Spektrometer Cary 50 durchgeführt. Folgende Einstellungen gelten für sämtliche Messungen:

Wellenlängenbereich	300-200 nm
Messgeschwindigkeit	300 nm/min
Bandbreite	1 nm
Datenintervall	0,5 nm

Für die Berechnung von DNA-Konzentrationen wird die Annahme gemacht, dass 1 OD₂₆₀ ~55 µg entspricht (Sambrock et al., 1989).

Zur Bestimmung von RNA-Konzentrationen wird für jede RNA ein individueller molarer Extinktionskoeffizient aus der Anzahl einer jeden Nukleotidsorte berechnet. Dazu werden folgende molare Extinktionen verwendet:

Guanosin	10 400 l*mol ⁻¹ *cm ⁻¹
Cytidin	6 500 l*mol ⁻¹ *cm ⁻¹
Adenosin	10 400 l*mol ⁻¹ *cm ⁻¹
Uridin	9 100 l*mol ⁻¹ *cm ⁻¹

So erhält man für die G-Switch-RNA einen molaren Extinktionskoeffizienten von 663 000 l*mol⁻¹*cm⁻¹.

Für die Konzentrationsbestimmung von verschiedenen Purinliganden werden folgende molare Extinktionskoeffizienten verwendet:

Guanin	10 700 l*mol ⁻¹ *cm ⁻¹ bei 243 nm (Fasman, 1975)
Adenin	13 400 l*mol ⁻¹ *cm ⁻¹ bei 261 nm (Fasman, 1975)
Hypoxanthin	11 220 l*mol ⁻¹ *cm ⁻¹ bei 254 nm (Schulman und Buchanan, 1951)
2,6-Diaminopurin	10 200 l*mol ⁻¹ *cm ⁻¹ bei 278 nm (Gilbert et al., 2007)

2.4 NMR-Spektroskopie

Probenvorbereitung

Die aufgereinigte RNA wird mittels Centricon Mikrokonzentratoren (Amicon) in NMR-Puffer (25 mM Kaliumphosphat, 50 mM Kaliumchlorid, pH 6,2) umgepuffert und anschließend per nativer PAGE auf eine homogene, monomere Konformation überprüft. NMR-Experimente werden ausschließlich in DEPC behandelten Shigemi NMR-Röhrchen mit 0,1-1 mM RNA-Konzentrationen in 90% H₂O/10% D₂O durchgeführt. Sämtliche Titrationen von Liganden, mit Ausnahme von Guanin, und Metallsalzlösungen werden direkt im NMR-Röhrchen durch Zugabe von Aliquots aus konzentrierten Stocklösungen durchgeführt. Guanin kann aufgrund der schlechten Löslichkeit in wässriger Lösung nicht zur RNA titriert werden. Deshalb werden RNA-Guanin-Komplexe durch Mischung von einer 25 µM Guaninlösung in NMR-Puffer und einer 20 µM RNA-Lösung in NMR-Puffer und anschließender Aufkonzentrierung auf 800-900 µM mit Centricon Mikrokonzentratoren (Amicon) hergestellt.

Kationtitrationen und Mg²⁺-Bindungsaffinitäten

Die RNA wird im NMR-Röhrchen mit Mg²⁺, Mn²⁺ und Co(NH₃)₆³⁺ durch Zugabe von Aliquots aus 125 mM oder 500 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂ oder 100 mM Co(NH₃)₆Cl₃ Lösungen titriert. Die Gleichgewichtsbindungskonstante von Mg²⁺ an die RNA wird durch die chemische Verschiebungsänderung von 0,15 ppm in ¹H und 0,35 ppm in ¹⁵N der Iminoresonanz von G37 bestimmt. Chemische Verschiebungsänderungen (CSP) werden durch die Formel $\sqrt{((\Delta_H)^2 + (\Delta_N/5)^2)}/2$ bestimmt und mit dem Quotient aus [Mg²⁺]/[RNA] korreliert. Mit SigmaPlot9.0 wird eine lineare Regression an Hand der folgenden Gleichung durchgeführt:

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

in der $f(x)$ die chemische Verschiebungsänderung bei dem korrespondierenden Quotienten $x = [\text{Mg}^{2+}]/[\text{RNA}]$ darstellt. a und b sind die Regressionsparameter, wo a der Quotient aus der Dissoziationskonstante (K_D) und [RNA] ist und b die chemische Verschiebungsänderung für unendliche Mg²⁺-Konzentrationen (Kang et al., 2003).

Aufnahme und Auswertung von NMR Experimenten

Alle ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -editierten NMR Experimente werden an AV900, AV800, AV700 und AV600 Bruker NMR-Spektrometern ausgestattet mit 5 mm HCN-TXI-Cryoprobenköpfen und z-Gradienten aufgenommen. ^{31}P Experimente werden an einem AV300 mit BBO-Probenkopf und z-Gradient aufgenommen.

Generell wird die GARP-Sequenz (Shaka et al., 1987) zur ^{15}N -Breitbandentkopplung angewendet, zur Unterdrückung des Wassersignals wird die Watergate-Technik (Liu et al., 1998) angewendet. NMR-Daten werden mit X-WIN NMR3.5 und TopSpin1.3 und 2.0 aufgenommen und prozessiert und mit XEASY (Bartels et al., 1995) analysiert.

Eindimensionale NMR-Spektren

In eindimensionalen NMR-Spektren von RNA ist vorrangig der Bereich der Iminoprotonresonanzen von Interesse. Diese Signale kommen in einem Bereich von 10-15 ppm zur Resonanz. Zur Aufnahme der Spektren wird das Pulsprogramm hs11echo für unmarkierte RNA-Moleküle und hs11echo.dec für ^{15}N -markierte RNA-Moleküle mit *jump-return* Wasserunterdrückung bei Temperaturen zwischen 5°C und 40°C verwendet (Sklenar und Bax, 1987). Alternativ erfolgt die Unterdrückung des Wassersignals nach der Watergate-Technik (Liu et al., 1998) oder durch *excitation sculpting* (Hwang und Shaka, 1995). Allgemein werden die Spektren mit 2048 Punkten und 16-128 Scans aufgenommen.

$^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren

Mit ^{15}N -markierter RNA werden $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) aufgenommen. $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von RNA-Molekülen sind interessant, da man in ihnen Iminoprotonen detektieren kann, die durch Basenpaarung oder Wechselwirkung mit dem Liganden vor dem Austausch mit dem Lösungsmittel Wasser geschützt sind. Folglich erscheint für jedes basengepaarte oder ligandgeschützte Guanosin bzw. Guanin und jedes basengepaarte oder ligandgeschützte Uridin bzw. Uracil ein charakteristisches Signal, wobei die Guanosine bzw. Guanin von den Uridinen bzw. Uracil klar auf Grund ihrer ^{15}N -chemische Verschiebung unterschieden werden können.

$^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren (Mori et al., 1995) werden in einem Temperaturbereich von 5°C bis 40°C aufgenommen. Die Stickstoffträgerfrequenz wird dabei auf 155 ppm eingestellt und liegt somit zwischen den Stickstoffresonanzfrequenzen der Guanosin/Guanin N1- und der

Uridin/Uracil-N3-Stickstoffkerne. $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren werden allgemein mit 2048 Punkten in der ^1H - und 128-192 Punkten in der ^{15}N -Dimension und 16-128 Scans aufgenommen.

2D- $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY-Spektren

Das $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY-Experiment (*Nuclear Overhauser und Exchange Spectroscopy*) basiert auf dem Kern-Overhauser-Effekt zwischen ^1H -Kernspins, der durch den Raum wirkt und dessen Stärke in erster Näherung proportional zu $1/r^6$ ist, wobei r der Abstand zwischen den beteiligten Kernen ist. Die Korrelation ist daher von dem räumlichen (Wüthrich, 1986) Abstand der Protonen abhängig, wobei der Magnetisierungstransfer nur bei einem Abstand von weniger als 5 Å beobachtet wird. Aus einem $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY-Experiment können über Iminoprotonkreuzsignale Informationen über die Basenpaarungen eines RNA-Moleküls bezogen werden. So ist es möglich, die sequenzielle Abfolge von Basenpaaren in einem Duplexstrang zu bestimmen. Es können aber auch G:U-Basenpaare durch die charakteristischen intercatenare Kreuzsignale ihrer Iminoprotonen (10-12 ppm) ausgemacht werden.

Die $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY-Experimente werden mit einer modifizierten Standardpulssequenz aufgenommen, in der die Wasserunterdrückung nach der Watergate-Technik (Liu et al., 1998) durchgeführt wird. In der indirekten Dimension wird die Protonenträgerfrequenz auf die Mitte der zu detektierenden Signale gesetzt, was gewöhnlich einer chemischen Verschiebung von ~ 8 ppm entspricht. Die Mischzeit beträgt 30 ms für RNA-Moleküle mit mehr als 100 Nukleotiden, 80 ms für RNA-Moleküle mit 70-85 Nukleotiden und 100-120 ms für RNA-Moleküle mit 25-45 Nukleotiden (Piotto et al., 1992). Es werden allgemein 2048 Punkte in der direkten Dimension und 640-880 Punkte in der indirekten Dimension mit 80-128 Scans aufgenommen.

^{15}N -editierte NOESY-HSQC-Spektren

In den hier verwendeten ^{15}N -editierten NOESY-HSQC-Spektren (Wijmenga und van Buuren, 1998) werden NOEs von Iminoprotonen zu sämtlichen Protonen in der näheren Umgebung beobachtet. Dies ist besonders hilfreich zur Iminoprotonresonanz-Zuordnung von größeren RNA-Molekülen, da dadurch Iminoresonanzen, die aufgrund ihrer Protonen-chemischen Verschiebung bei der gleichen chemischen Verschiebung zur Resonanz kommen, durch ihre ^{15}N -chemische Verschiebung aufgetrennt werden können.

Die $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY-Experimente werden mit einer modifizierten Standardpulssequenz aufgenommen, in der die Wasserunterdrückung nach der Watergate-Technik (Liu et al., 1998) durchgeführt wird. Die Protonenträgerfrequenz wird in der indirekten Protonendimension auf ca. 8,5 ppm und während der Aquisition auf die Mitte des Wassersignals gesetzt. In t_1 und t_3 wird die GARP-Sequenz (Shaka et al., 1987) zur ^{15}N -Breitbandentkopplung eingesetzt, wobei die ^{15}N -Trägerfrequenz normalerweise bei ca. 117 ppm zwischen den Imino- und den Aminoresonanzfrequenzen liegt. Für den INEPT-Schritt wird in der ^{15}N -Dimension die Stickstoffträgerfrequenz auf die Mitte der Iminoresonanzfrequenzen gesetzt. Mischzeiten werden wie im 2D-NOESY gewählt. Es werden allgemein 2048 Punkte in der direkten Dimension, 224 Punkte in t_1 und 64 Punkte in t_2 mit 8 Scans aufgenommen.

2D-HNN-COSY-Spektren

In einem 2D-HNN-COSY-Experiment wird die ^2hJ -Kopplung über eine Wasserstoffbrücke der Art N-H \cdots N beobachtet (Dingley und Grzesiek, 1998; Wöhnert et al., 1999). Diese Wasserstoffbrücken kommen in den Watson-Crick-Basenpaarungen, aber auch in nicht-kanonischen Basenpaarungen vor.

Die 2D-HNN-COSY-Experimente werden nach (Dingley und Grzesiek, 1998) ohne Verwendung der TROSY-Sequenz durchgeführt. Die Protonenträgerfrequenz wird auf das Wassersignal gesetzt und die Stickstoffträgerfrequenz wird im INEPT-Schritt auf die Mitte der Iminoresonanzen gesetzt. Für den NN-COSY Transfer wird die Stickstoffträgerfrequenz zwischen die Resonanzen der Guanosine/Guanine und Uridine/Uracile und die Resonanzen der Cytidine/Cytosine und Adenosine/Adenine gesetzt (ca. 195 ppm). Der rechteckige 180° -Puls während des NN-COSY Schrittes wird durch einen 2 ms langen adiabatischen Pulse ersetzt. Für den NN-COSY Schritt wird eine Mischzeit von 10 ms für die Purin-Riboswitch Aptamerdomänen und von 15 ms für kleinere RNAs gewählt. Es werden generell 2048 Punkte in der ^1H - und 256 Punkte in der ^{15}N -Dimension mit 512 Scans aufgezeichnet.

H(N)CO-Spektren

H(N)CO-Experimente, angewendet auf RNA-Moleküle, können Aufschluss über nicht-kanonische Basenpaare anhand der ^{13}C -chemischen Verschiebung der C2- und C4-Atome der Uridine und der C6-Atome der Guanosine geben.

Für das H(N)CO Experiment wird eine modifizierte Proteinstandardpulssequenz verwendet (Muhandiram und Kay, 1994). Das Experiment wird als pseudo-3D Experiment

aufgenommen, da die ^{15}N chemische Verschiebung nicht evolviert wird. Die Protonenträgerfrequenz wird auf das Wassersignal, die Kohlenstoffträgerfrequenz wird auf ca. 147 ppm und die Stickstoffträgerfrequenz wird auf ca. 155 ppm gesetzt. Während t_1 und t_2 wird in ^1H entkoppelt und während der Akquisition wird in ^{15}N entkoppelt. Es werden generell 2048 Punkten in t_3 , 1 Punkt in t_2 und 80 Punkten in t_1 aufgenommen.

ERGEBNISSE

3.1 Riboswitch-RNA-Synthese und Aufreinigung

Eine Voraussetzung für die Untersuchung von Biomolekülen mittels multidimensionaler NMR-Spektroskopie ist die Bereitstellung des Biomoleküls in ^{13}C und ^{15}N isotopenmarkierter Form. Nur diese Isotope sind im Gegensatz zu den natürlich auftretenden Isotopen NMR-aktiv. Außerdem werden für die NMR-Spektroskopie im Gegensatz zu anderen spektroskopischen Methoden sehr große Mengen des Biomoleküls benötigt, was die Synthese des Biomoleküls im Milligrammmaßstab voraussetzt.

Um den Bindungsmechanismus des Purinliganden, konformationelle Änderungen in der RNA und Metallion-Bindungsstellen in den Purin-Riboswitch-RNAs zu untersuchen, wurden verschiedene RNA-Proben mit unterschiedlichem Isotopenmarkierungsmuster im Milligrammmaßstab synthetisiert. Der Ablauf der RNA-Synthese soll hier am Beispiel der so genannten G-Switch-RNA (Abbildung 3.2) beschrieben werden und ist für alle anderen durch *in vitro* Transkription hergestellte RNA-Proben ähnlich.

Linearisierte Plasmid DNA als Matrize für die *in vitro* Transkription wurde wie in Kapitel 2 beschrieben hergestellt. Abhängig von der Präparation und der Plasmid DNA wurden zwischen 3 und 8 mg Plasmid DNA aus einer 2 l *E.coli* Kultur erhalten.

Die Ausbeuten der *in vitro* Transkription wurden im analytischen Maßstab optimiert und waren stark abhängig von dem eingesetzten DNA-Templat und den Nukleotiden. Die Optima für Parameter wie Magnesiumkonzentration (10-30 mM Magnesiumacetat), DNA-Templatkonzentration (15-75 nM) und NTP-Konzentration (2-4 mM je Nukleotid) variierten stark. Präparative Ansätze wurden unter den optimierten Bedingungen bei 37°C ausgeführt, wobei die Laufzeit der Transkriptionsreaktion 5-6 h betrug. Die Aufreinigung der RNA erfolgte wie in Kapitel 2 beschrieben. Mit dem angewendeten HPLC-Verfahren konnten effektiv Reste von NTPs und DNA von der RNA getrennt werden. Generell kann es vorkommen, dass bei der *in vitro* Transkription durch T7-RNA-Polymerase am 3'-Ende der synthetisierten RNA ein bis zwei willkürliche Nukleotide, die nicht durch das DNA-Templat kodiert werden, angehängt werden (Milligan et al., 1987). Diese RNA-Nebenprodukte mit der Länge n+1 und n+2 zum Hauptprodukt können bei RNAs mit einer Gesamtgröße von >50 Nukleotiden nicht mehr eindeutig durch Gelelektrophorese oder HPLC nachgewiesen werden. Bei den in dieser Arbeit synthetisierten RNAs gab es keine Hinweise über das Auftreten dieser Nebenprodukte. Nach der Aufreinigung wurden RNA Ausbeuten von 7-20 mg, abhängig von der jeweiligen RNA, aus einem 30 ml Transkriptionsansatz erzielt.

Die aufgereinigte RNA wurde, wie in Kapitel 2 beschrieben, in eine monomere Konformation gefaltet und der Faltungszustand der RNA wurde durch native Gelelektrophorese überprüft. Alternative Faltungszustände zur monomeren Konformation wurden toleriert, solange sie weniger als ein Zehntel der monomeren Hauptkonformation ausmachten, was durch native Gelelektrophorese bestimmt wurde (Abbildung 3.1).



Abbildung 3.1

Native Gelelektrophorese zur Überprüfung des Faltungszustandes. Ungefaltete G-Switch-RNA (Bahn 1) und nach dem beschriebenen Faltungsprotokoll gefaltete G-Switch-RNA (Bahn 2). Die gefaltete G-Switch-RNA weist nur das gewünschte Monomer auf, wohingegen in der ungefalteten RNA (Bahn 1) auch Dimere und Oligomere beobachtet werden.

3.2 Ligandbindung an die Purin-bindenden-Riboswitch Aptamerdomänen

Entwicklung eines Modellsystems für die Guanin- und Adenin-Riboswitch-Aptamerdomänen

Die Aptamerdomäne des *xpt-pbuX* Guanin-bindenden Riboswitches aus *B.subtilis* besitzt in Helix II an der Position 26:44 eine C:A Basenfehlpaarung, die keine kanonische Basenpaarung ausbilden kann (Abbildung 3.2). Diese Basenfehlpaarung ist von der zentralen Drei-Wege-Kreuzung durch ein U25:A45 Basenpaar getrennt. Da es bei NMR-spektroskopischen Untersuchungen von großer Wichtigkeit ist, dass das studierte System in einer homogenen Konformation vorliegt und die beschriebene C26:A44 Basenfehlpaarung durch ihre Nähe zu der zentralen Drei-Wege-Kreuzung theoretisch auch alternative Basenpaarungen eingehen kann und somit sich Sekundärstrukturen ausbilden könnten, die von der vorhergesagten Sekundärstruktur abweichen, wurde in diesem Bereich eine Mutation vorgenommen. Ein Sequenzvergleich von sämtlichen bekannten Guanin-bindenden Riboswitchen aus Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien zeigte zunächst, dass die Sequenz der Helix II nicht konserviert ist (Abbildung 1.2) und dass ca. 1/3 der Sequenzen an der Position des A:C und des benachbarten A:U Basenpaars entweder zwei Watson-Crick Basenpaare oder ein Watson-Crick und ein G:U Basenpaar tragen (Anhang 1). Um Helix II bestmöglich zu stabilisieren und dennoch dem Wildtyp möglichst ähnlich zu bleiben, wurde die C26:A44 Basenfehlpaarung zu einem U:A und das die Drei-Wege-Kreuzung flankierende U25:A45 in Helix II zu einem C25:G45 Basenpaar mutiert. Diese Mutante wird im Folgenden als G-Switch-RNA (Abbildung 3.2) bezeichnet, wohingegen die native Sequenz der Aptamerdomäne des *xpt-pbuX* Guanin-bindenden Riboswitches als G-Switch-wt-RNA bezeichnet wird (Anhang 1).

Die Aptamerdomäne des *pbuE* Adenin-bindenden Riboswitches aus *B.subtilis* trägt am apikalen Ende der Helix II an der Position 31:39 ein U:U Basenpaar gefolgt von zwei Watson-Crick A:U Basenpaaren (A30:U40 und A29:U41). Diese Aneinanderreihung von U:U und A:U Basenpaaren am Ende einer Helix ist instabil, so dass auch hier aus ähnlichen Beweggründen wie bei der G-Switch-RNA eine stabilisierende Mutation eingefügt wurde. Dazu wurde das A30:U40 Basenpaar durch ein G30:C40 Basenpaar ersetzt. Diese Mutante wird im Folgenden als A-Switch-RNA bezeichnet und mit ihr wurden die Ligandbindungsstudien durchgeführt. Die native Sequenz wird hingegen als A-Switch-wt-RNA bezeichnet (Abbildung 3.2).

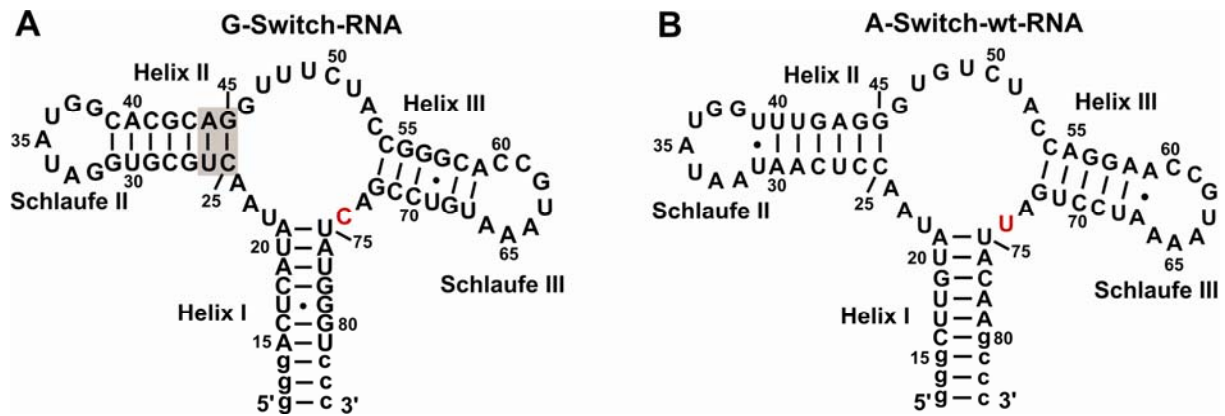


Abbildung 3.2

Aptamerdomänen der Purin-bindenden Riboswitche. (A) Die Aptamerdomäne des Guanin-bindenden Riboswitches aus *B. Subtilis* (G-Switch-wt-RNA) trägt eine stabilisierende Mutation in Helix II, die grau hinterlegt ist (G-Switch-RNA). (B) Die Aptamerdomäne des Adenin-bindenden Riboswitches aus *B. subtilis* (A-Switch-wt-RNA). Alle Guanin-bindenden Riboswitche tragen an Position 74 in der Ligandbindenden Drei-Wege-Kreuzung ein Cytidin, alle Adenin-bindenden Riboswitche tragen hier ein Uridin (rot hervorgehoben). Die Helices und Schleifen sind beschriftet.

Desweiteren wurden bei sämtlichen Konstrukten von Aptamerdomänen der Purin-bindenden Riboswitchen am 5'-Terminus und am 3'-Terminus der RNA nicht-native Sequenzen von drei Guanosinnukleotiden und drei Cytidinnukleotiden eingefügt, um die Helix I der RNA zu stabilisieren und eine effektive Transkription zu gewährleisten. Die 3'-terminale Sequenz von drei Cytidinnukleotiden wurde weiterhin benötigt, um das DNA-Templat für die *in vitro* Transkription mit dem Restriktionsenzym *SmaI* mit der Schnittstelle 5'-CCC | GGG-3' zu linearisieren und dadurch den Abbruch der RNA-Synthese spezifisch nach dieser Sequenz herbeizuführen.

Die Affinität der G-Switch-wt-RNA und der A-Switch-wt-RNA für verschiedene Liganden wurde biochemisch mittels *in-line Probing* Versuchen untersucht (Mandal et al., 2003; Mandal und Breaker, 2004) (siehe Einleitung). In Tabelle 5 werden die in dieser Arbeit verwendeten Liganden sowie ihre Konstitution und ihre Affinität für die G-Switch-wt- und/oder die A-Switch-wt-RNA aufgelistet.

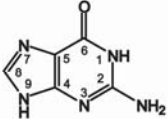
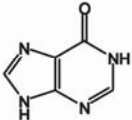
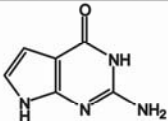
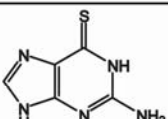
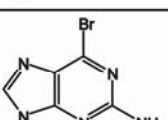
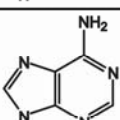
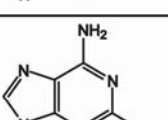
Ligand	Konstitution	K_D [μ M]	
		G-Switch-wt-RNA	A-Switch-wt-RNA
Guanin		0,005	>10
Hypoxanthin		0,05	n.a.
7-Deazaguanin		1	n.a.
6-Thioguanin		1	n.a.
6-Bromo-2-aminopurin		0,5	n.a.
Adenin		>300	0,3
2,6-Diaminopurin		10	0,01

Tabelle 5

Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Liganden, ihrer chemischen Struktur und ihrer K_D für die G-Switch-wt- und/oder die A-Switch-wt-RNA. Die K_D -Werte wurden biochemisch mittels *in-line Probing* Versuchen bestimmt (Mandal et al., 2003; Mandal und Breaker, 2004). Das Numerierungsschema von Purinen ist exemplarisch am Beispiel von Guanin aufgeführt. n.a.: nicht angegeben

Bindungsmechanismus von Guanin bzw. Adenin an ihre jeweilige Riboswitch-RNA

Anhand von Sequenzvergleichen konnte festgestellt werden, dass alle Guanin-bindenden Riboswitche an Position 74 ein Cytosin tragen, wohingegen alle Adenin-bindenden Riboswitche an dieser Position ein Uridin tragen (Abbildung 1.2). Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass das C74 des Guanin-bindenden Riboswitches mit dem Liganden Guanin

ein intermolekulares Watson-Crick Basenpaar ausbildet genauso wie das U74 des Adenin-bindenden Riboswitches mit dem Liganden Adenin (Mandal et al., 2003; Mandal und Breaker, 2004). Weiterhin stellte sich die Frage, wie die chemisch sehr unterschiedlichen Liganden Guanin und Adenin (Tabelle 5) mit so hoher Affinität von ihrer jeweiligen Riboswitch-RNA gebunden werden können, die sich in der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung lediglich in zwei Nukleotiden unterscheidet. Die Purin-Riboswitch unterscheiden sich im Nukleotide in Position 74, für das vermutet wird, dass es ein intermolekulares Basenpaar mit dem gebundenen Liganden ausbildet. Das andere Nukleotid, in dem sie sich unterscheiden, befindet sich an Position 48, die jedoch weniger als 90% Konservierung zwischen unterschiedlichen Guanin- bzw. Adenin-bindenden Riboswitch-RNAs aufweist. Eine Beteiligung dieses Nukleotids an der Ligandbindung erscheint daher eher unwahrscheinlich. Demnach ist zu vermuten, dass die Ligandbindungstasche im Guanin- bzw. Adenin-bindenden Riboswitch bis auf das Nukleotid, das wahrscheinlich an der intermolekularen Basenpaarung beteiligt ist (C74 in G-Switch-wt-RNA und U74 in A-Switch-wt RNA), identisch ist. Im Folgenden werden die Ergebnisse dargestellt, die zur Beantwortung dieser Fragestellungen führten.

Bindung von Guanine an die G-Switch-RNA

Die Zugabe von stöchiometrischen Mengen Guanin zur G-Switch-RNA führte in einem $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum des Bereichs der Iminogruppen zu neuen Resonanzen mit schmalen Linienbreiten. Neben neuen Resonanzen mit Protonen-chemischen Verschiebungen typisch für Watson-Crick Basenpaarungen traten auch Resonanzen mit chemischen Verschiebungen im Bereich von nicht-kanonischen Basenpaarungen (10-12 ppm in ^1H , 155-160 ppm in ^{15}N) auf (Abbildung 3.3 A). Neben den Imino-resonanzen der RNA wurden auch die N1H1 und N9H9 Imino-resonanzen des gebundenen Guanins detektiert, die in der freien Form des Liganden aufgrund des schnellen Austauschs mit Wasser nicht zu beobachten sind. All dies sind Indizien für die Ausbildung eines stabilen RNA-Ligand-Komplexes einhergehend mit der Ausbildung von Tertiärstrukturelementen.

Die Imino-resonanzen des gebundenen Liganden konnten durch ein $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum von unmarkierter G-Switch-RNA in Komplex mit $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markiertem Guanin zugeordnet werden (Abbildung 3.3 B). Daneben war es möglich, durch chemische Verschiebungsargumente und einer Kombination verschiedener NMR-Experimente wie einem $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Experiment, in dem der Polarisationstransfer auf $^1\text{J}_{\text{HN}}$ - und $^2\text{J}_{\text{HN}}$ skalare Kopplungen optimiert war, die Resonanzen des H8 und des N7, in einem $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC Experiment das C8 und in einem H(N)C Experiment die Resonanzen von C2, C6, C4 und C8 des gebundenen Guanins zuzuordnen (Anhang 2).

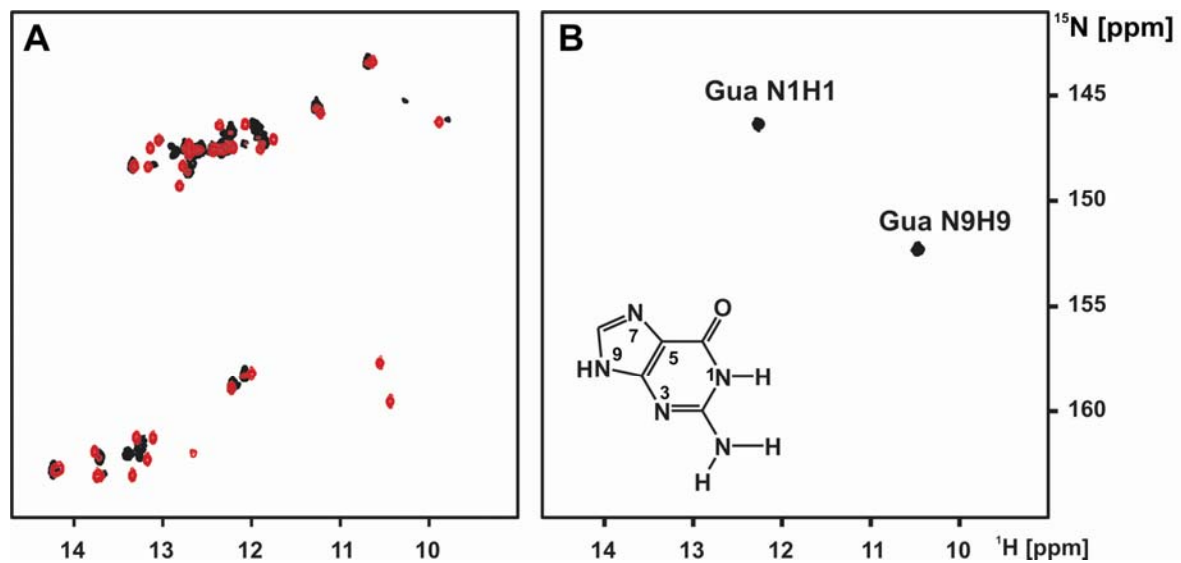


Abbildung 3.3

Bindung von Guanin an die Aptamerdomäne des Guanin-bindenden Riboswitches aus *B. subtilis*. (A) Überlagerung der Iminogruppen ¹H, ¹⁵N-HSQC Spektren der G-Switch-RNA in der freien (schwarz) und der Guanin-gebundenen (rot) Form. (B) Iminogruppen ¹H, ¹⁵N-HSQC Spektrum des Komplexes aus unmarkierter G-Switch-RNA gebunden mit ¹³C, ¹⁵N-markiertem Guanin. Das Numerierungsschema von Purinen ist schematisch am Beispiel von Guanin gezeigt.

Bindungsmechanismus von Guanin an die G-Switch-RNA

Die fehlende Lösungsmittelzugänglichkeit und die daraus resultierende Detektierbarkeit der Iminoresonanzen des gebundenen Guanins in Komplex mit der G-Switch-RNA deutet darauf hin, dass die Iminoprotonen des Guanins direkt an der Bindung zur RNA beteiligt sind. Die chemische Verschiebung der Guanin N1H1 Iminogruppe von 12,3 ppm in ¹H und 146,3 ppm in ¹⁵N liegt im Bereich der chemischen Verschiebung von G:C Watson-Crick Basenpaarungen in RNA (Abbildung 3.3 B). Ein 2D-HNN-COSY Spektrum der G-Switch-RNA, in der nur die Cytidine ¹⁵N-markiert waren, im Komplex mit dem ¹³C, ¹⁵N-markierten Liganden Guanin, zeigte eine einzige Korrelation zwischen der N1H1 Iminogruppe des gebundenen Guanins mit einem einzigen Stickstoff. Dieses Stickstoffsignal konnte aufgrund seiner chemischen Verschiebung von 197,3 ppm als N3 eines Cytosins identifiziert werden (Abbildung 3.4 A). Durch das verwendete Isotopenmarkierungsmuster der RNA und des gebundenen Liganden weisen diese Daten nach, dass das gebundene Guanin eine G:C Watson-Crick Basenpaarung mit einem Cytidin der RNA eingeht (Abbildung 3.4 B), entsprechend der zuvor aufgestellten Hypothese. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Aminogruppe des gebundenen Guanins an der Bindung beteiligt ist, da ihre beiden Protonen unterschiedliche chemische Verschiebungen aufweisen (8,3 und 6,5 ppm). Wäre die Aminogruppe nicht an der Bindung

beteiligt, könnte sie frei um die C6/N6-Einfachbindung rotieren. Dies würde zu einem gemittelten Signal für die beiden Protonen der N6-Aminogruppen führen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Guanin N1H1 Iminogruppe in einem NOESY Experiment NOEs zu den beiden Protonen der eigenen Aminogruppe und der des Cytidins zeigt, wie es für ein Watson-Crick G:C Basenpaar üblich ist (Abbildung 3.4 A, Bildeinschub).

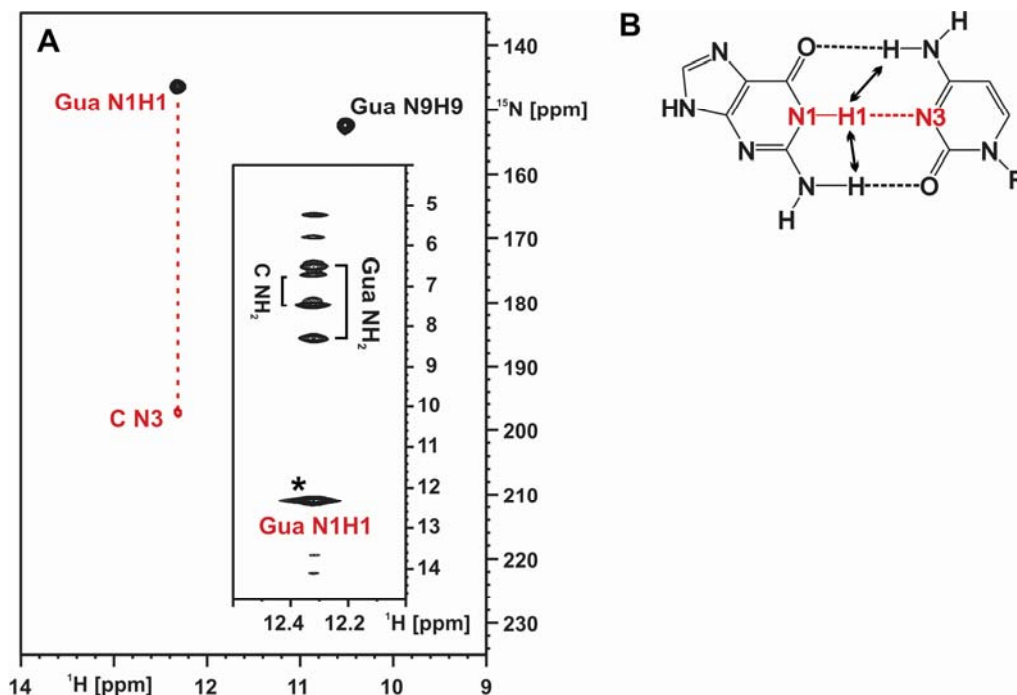


Abbildung 3.4

Guanin bindet an die G-Switch-RNA über eine Watson-Crick Basenpaarung. (A) 2D-HNN-COSY Spektrum der Iminoregion der G-Switch-RNA, die in allen Cytidinen ^{15}N -markiert ist, gebunden an $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markiertes Guanin. Die Korrelation zwischen der N1H1 Iminogruppe des gebundenen Guanins und des N3 eines Cytidins ist durch eine gestrichelte Linie hervorgehoben. Eingelassen ist der Streifen der N1H1 Iminogruppe des gebundenen Guanins aus einem ^{15}N -editierten NOESY Spektrum gezeigt. Das Diagonalsignal ist mit einem Stern gekennzeichnet. (B) Wasserstoffbrückenbindungsschema in einem Watson-Crick G:C Basenpaar mit der detektierten Wasserstoffbrückenbindung in rot gezeichnet. Die beobachteten NOE Kontakte zwischen verschiedenen Protonen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Um weitere intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen ausfindig zu machen, wurden 2D-HNN-COSY Experimente von ^{15}N -markierter G-Switch-RNA in Komplex mit $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markiertem Guanin oder unmarkiertem Guanin aufgenommen. Für den Komplex mit $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markiertem Guanin werden somit sämtliche intra- und intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen der Art N-H \cdots N detektiert (Abbildung 3.5 A), wohingegen für den Komplex mit unmarkiertem Guanin nur intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen der RNA detektiert werden (Abbildung 3.5 B). Der Vergleich der beiden HNN-COSY Spektren deckte eine Korrelation auf, die nur in dem Komplex mit $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markiertem Guanin zu

beobachten war. Sie spiegelt eine Wasserstoffbrückenbindung einer Uridin N3H3 Iminogruppe zu einem Stickstoff des Liganden wider, der aufgrund seiner chemischen Verschiebung von 157,9 ppm als N3 des Guanins identifiziert wurde. Demzufolge fungiert im Guanin-G-Switch-RNA-Komplex eine Uridin N3H3 Iminogruppe als Wasserstoffbrückendonator und das N3 des gebundenen Guanins als Wasserstoffbrückenakzeptor in einer intermolekularen Wasserstoffbrückenbindung (Abbildung 3.5 D). So eine Art von Wasserstoffbrückenbindung bringt die Iminogruppe des Uridins in die Nähe der Aminogruppe und der N9H9 Iminogruppe des gebundenen Guanins, was in einem 3D- ^1H , ^1H , ^{15}N -NOESY-HSQC Spektrum beobachtet werden konnte. Hier zeigte diese Uridin-Iminogruppe starke NOEs zu der Aminogruppe und der N9H9 Iminogruppe des gebundenen Guanins (Abbildung 3.5 C).

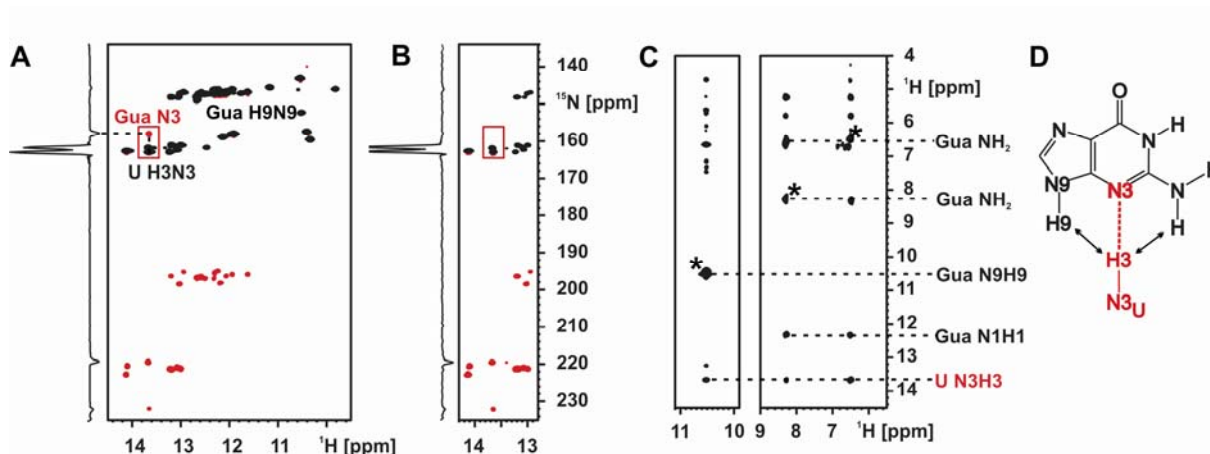


Abbildung 3.5

Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der N3/N9 Seite des gebundenen Guanins und der G-Switch-RNA (A) Iminoregion eines 2D-HNN-COSY Spektrums von ^{15}N -markierter-RNA in Komplex mit ^{13}C , ^{15}N -markiertem Guanin. Die Korrelation einer Uridin-Iminogruppe und dem N3 des gebundenen Guanins ist durch einen roten Kasten hervorgehoben. Die N9H9 Iminoresonanz des gebundenen Guanins ist gekennzeichnet. (B) HNN-COSY Spektrum von ^{15}N -markierter-RNA in Komplex mit unmarkiertem Guanin. Die Korrelation der Iminogruppe eines Uridins mit dem N3 des gebundenen Guanins, die in A beobachtet wurde, ist nicht nachweisbar. In A und B ist für beide 2D-HNN-COSY Spektren der eindimensionale Ausschnitt bei einer ^1H chemischen Verschiebung von 13,6 ppm gezeigt, um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der beiden Spektren zu verdeutlichen. (C) Streifen der N9H9 Iminogruppe und der Aminogruppe des gebundenen Guanins aus einem ^{15}N -editierten NOESY Spektrum mit der Zuordnung der intermolekularen NOEs zwischen dem Liganden und einer Uridin Iminogruppe der RNA. Die Diagonalsignale sind durch einen Stern gekennzeichnet. (D) Schema der Wasserstoffbrückenbindung zwischen einem Uridin der RNA und der N3/N9 Seite des gebundenen Guanins mit der nachgewiesenen Wasserstoffbrückenbindung in rot gezeichnet. Die Pfeile kennzeichnen die beobachteten NOE Kontakte.

Für die N9H9 Iminogruppe des gebundenen Guanins wurde keine Korrelation im 2D-HNN-COSY Spektrum gefunden (Abbildung 3.5 A). Diese Iminogruppe ist jedoch wie oben

beschrieben vom Austausch mit dem Lösungsmittel geschützt und ihre chemische Verschiebung lässt darauf schließen, dass sie an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die N9H9 Iminogruppe des gebundenen Guanins in eine Wasserstoffbrücke involviert ist, in der ein Sauerstoff und nicht ein Stickstoff als Wasserstoffbrückenakzeptor fungiert. Interessanterweise wird durch die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der N3H3 Iminogruppe des Uridins und dem N3 des gebundenen Guanins eine Carbonylgruppe des Uridins in die Nähe des N9H9 des gebundenen Guanins positioniert. Das lässt darauf schließen, dass entweder die C2- oder die C4-Carbonylgruppe des Uridins als Wasserstoffbrückenakzeptor für die N9H9 Iminogruppe des gebundenen Guanins fungieren könnte (siehe auch unten).

Auch für das N7 des gebundenen Guanins wurde keine Korrelation im 2D-HNN-COSY Spektrum beobachtet und es war auch nicht möglich, einen starken NOE vom H8 des gebundenen Liganden mit einer funktionellen Gruppe der RNA zu beobachten. Da 7-Deazaguanin auch an G-Switch-RNA bindet (siehe unten), wenn auch mit einer etwas geringeren Affinität (Mandal et al., 2003), wurden die Imino- und Aminoregionen in $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren der G-Switch-RNA in Komplex mit Guanin bzw. in Komplex mit 7-Deazaguanin verglichen. In 7-Deazaguanin ist das N7 durch eine CH-Gruppe ersetzt, was im Gegensatz zum N7 nicht als Wasserstoffbrückenakzeptor dienen kann. Demzufolge sollten mögliche Wasserstoffbrückendonoren wie NH- bzw. NH_2 -Gruppen der G-Switch-RNA in Komplex mit 7-Deazaguanin weniger stark vom Austausch mit dem Lösungsmittel geschützt sein. Folglich sollte die Linienbreite dieser Resonanzen stark zunehmen und sie sollten ihre chemische Verschiebung ändern oder diese Resonanzen sollten nicht mehr nachweisbar sein. Der Vergleich der $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren der Imino- und der Aminoregionen der G-Switch-RNA entweder gebunden an Guanin oder gebunden an 7-Deazaguanin zeigte die gleiche Anzahl an Resonanzen mit einer vergleichbaren Linienbreite (Abbildung 3.11 A). Einige wenige Imino-Resonanzen von Watson-Crick Basenpaaren änderten ihre chemische Verschiebung, aber blieben im Bereich der chemischen Verschiebung, die für Watson-Crick Basenpaare typisch ist. Demzufolge scheint der Austausch des N7 zu einer CH-Gruppe in 7-Deazaguanin keine Wasserstoffbrückenbindungen mit Imino- oder Aminogruppen der RNA als Wasserstoffbrückendonoren zu beeinflussen.

Bindungsmechanismus von Adenin an A-Switch-RNA

Die A-Switch-RNA, in der alle Uridine ^{15}N -markiert waren, zeigte in ihrem $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum nach der Zugabe von stöchiometrischen Mengen $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markierten Adenins Resonanzen mit schmaler Linienbreite und neue Resonanzen, die in ihrer freien Form nicht detektiert wurden. Eine Imino-Resonanz im $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum des Komplexes konnte

anhand der ^{13}C chemischen Verschiebungen seiner benachbarten Kohlenstoffatome in einem H(N)C Experiment als das N9H9 des gebundenen Adenins zugeordnet werden (Abbildung 3.7 A). Diese beiden Beobachtungen stehen für die Ausbildung eines stabilen RNA-Ligand-Komplexes im Einklang mit der für dieses System publizierte Dissoziationskonstante von 300 nM (Mandal und Breaker, 2004). In einem 2D-HNN-COSY Experiment der A-Switch-RNA, in der nur die Uridine ^{15}N -markiert waren, in Komplex mit $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markiertem Adenin konnten zwei Korrelationen von zwei verschiedenen N3H3 Iminogruppen der RNA mit zwei verschiedenen Stickstoffatomen des gebundenen Adenins beobachtet werden (Abbildung 3.6). Diese Stickstoffatome des gebundenen Adenins konnten aufgrund ihrer chemischen Verschiebung dem N1 und dem N3 zugeordnet werden. Demnach wurden so zwei intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen detektiert, wobei eine aus einer Watson-Crick Basenpaarung resultiert, in der eine Uridin N3H3 Iminogruppe als Wasserstoffbrückendonator und das Adenin N1 als Wasserstoffbrückenakzeptor dient. In der zweiten detektierten intermolekularen Wasserstoffbrückenbindung dient eine weitere Uridin N3H3 Iminogruppe als Wasserstoffbrückendonator und das N3 des gebundenen Adenins als Wasserstoffbrückenakzeptor. Beide Uridin-Iminogruppen weisen einen starken NOE zum H2 des gebundenen Adenins auf, die Iminogruppe, die eine Wasserstoffbrücke zum N3 des Adenins ausbildet, weist zusätzlich noch einen starken NOE zur N9H9 Iminogruppe des gebundenen Adenins auf (Abbildung 3.6 Bildeinschub). Somit wird im Adenin-bindenden Riboswitch, genau wie im Guanin-bindenden Riboswitch, das N3 des gebundenen Liganden von einem N3H3 eines Uridins der RNA erkannt. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der Hypothese, nach der die Ligandbindungstasche in beiden Riboswitchen identisch ist, mit der Ausnahme des Nukleotids an Position 74, das ein intermolekulares Watson-Crick Basenpaar mit dem gebundenen Liganden ausbildet.

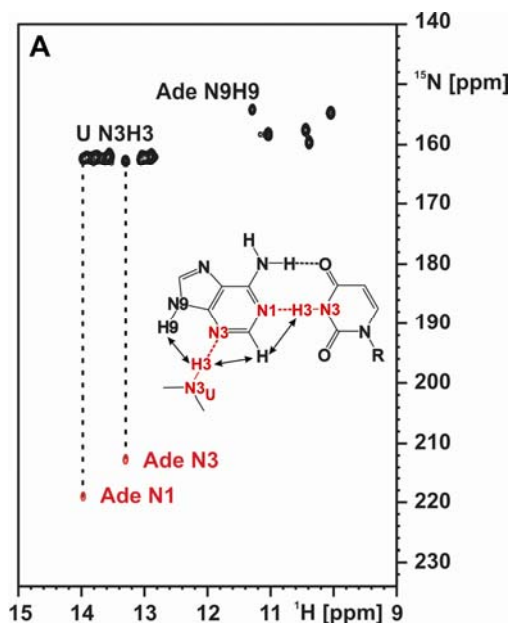


Abbildung 3.6

Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der A-Switch-RNA und gebundenem Adenin. Gezeigt ist die Iminogruppenregion eines 2D-HNN-COSY Spektrums der A-Switch-RNA, die in allen Uridinen ^{13}C , ^{15}N -markiert ist, in Komplex mit ^{13}C , ^{15}N -markiertem Adenin. Die Korrelationen zwischen den Iminogruppen zweier Uridine der RNA mit dem N1 und dem N3 des gebundenen Adenins sind durch gestrichelte Linien hervorgehoben. Wasserstoffbrückenbindungsschema zwischen der A-Switch-RNA und dem gebundenen Adenin, in dem die detektierten Wasserstoffbrückenbindungen rot eingezeichnet sind und die beobachteten NOE Kontakte durch Pfeile markiert sind.

Intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen des Typs $\text{N-H}\cdots\text{O}=\text{C}$

Die Beobachtung, dass die N9H9 Iminogruppe des gebundenen Adenins vom Austausch mit dem Lösungsmittel geschützt ist, aber keine Korrelation im 2D-HNN-COSY Experiment zeigt, deutete darauf hin, dass in diesem Fall ein Sauerstoffatom als Wasserstoffbrückenakzeptor fungiert. Da die N3H3 Iminogruppe eines Uridins der RNA wie oben gezeigt mit dem N3 des gebundenen Adenins eine Wasserstoffbrückenbindung ausbildet, ist es möglich, dass dadurch eine Carbonylgruppe dieses Uridins so positioniert wird, dass sie mit dem N9H9 des gebundenen Adenins eine Wasserstoffbrückenbindung ausbilden kann. Der direkte Nachweis einer Wasserstoffbrückenbindung, in der eine Carbonylgruppe als Wasserstoffbrückenakzeptor und eine Iminogruppe als Wasserstoffbrückendonator fungiert, ist nahezu unmöglich in einer RNA der Größe der A-Switch-RNA, da die korrespondierenden $^3\text{J}_{\text{NCO}}$ - und $^4\text{J}_{\text{NN}}$ -Kopplungskonstanten zu klein sind (Dingley et al., 2000; Liu et al., 2000). Allerdings ist bekannt (Fürting et al., 2003; Ohlenschläger et al., 2004), dass die ^{13}C -chemischen Verschiebungen der C2 und C4 Carbonylkohlenstoffatome Aufschluss darüber geben können, ob eine Carbonylgruppe an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist. In einem H(N)C

Experiment konnte gezeigt werden, dass die C2 und C4 chemischen Verschiebungen der beiden Uridine, die eine intermolekulare Wasserstoffbrückenbindung mit dem gebundenen Adenin eingehen, im Bereich der chemischen Verschiebung von C2 und C4 Atomen von Uridinen in kanonischen A:U Basenpaarungen liegen (Abbildung 3.7 A). In einem kanonischen A:U Basenpaar liegt das C4 des Uridins in einer Wasserstoffbrückenbindung vor, das C2 jedoch nicht. Demnach bildet das Uridin, das mit dem N1 des gebundenen Adenins eine Wasserstoffbrücke ausbildet, ein intermolekulares Watson-Crick-A:U Basenpaar aus. Für das andere Uridin kann demzufolge angenommen werden, dass seine C4 Carbonylgruppe eine intermolekulare Wasserstoffbrückenbindung mit dem N9H9 des gebundenen Adenins eingeht.

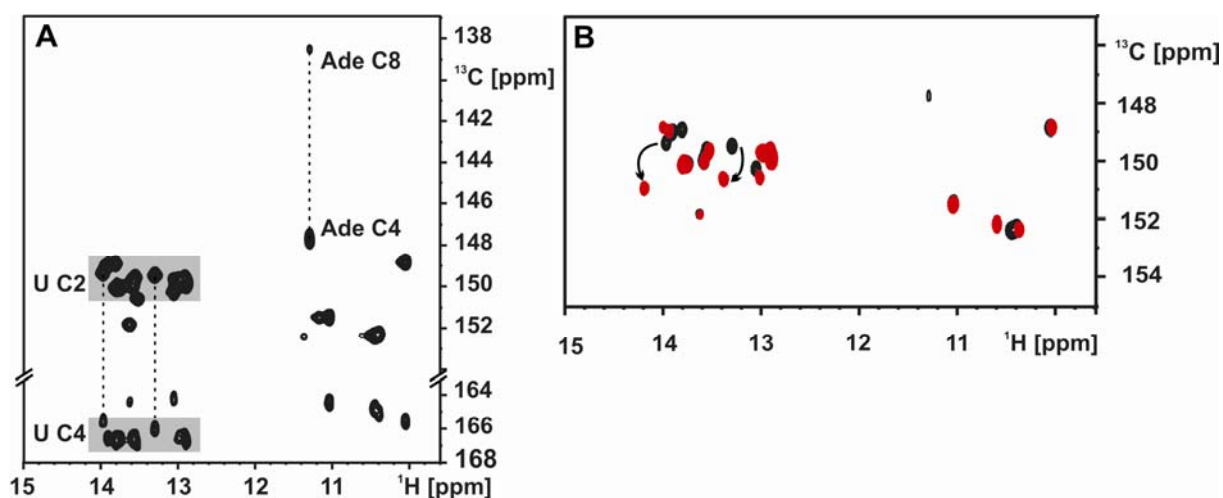


Abbildung 3.7

Carbonylkohlenstoff chemische Verschiebung geben Aufschluss über Wasserstoffbrückenbindungen. (A) 2D-H(N)C Spektrum der A-Switch-RNA, in der alle Uridine ^{13}C , ^{15}N -markiert sind, in Komplex mit ^{13}C , ^{15}N -markiertem Adenin. Der chemische Verschiebungsbereich der C2 und C4 Carbonylgruppen der Uridine in kanonischen Watson-Crick A:U Basenpaaren ist grau hinterlegt. Die beiden Uridine der RNA, die intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen mit dem gebundenen Adenin eingehen (gestrichelte Linie) haben C2 und C4 chemische Verschiebungen ähnlich derer von Uridinen in kanonischen A:U Basenpaarungen. Zusätzlich ist die Korrelation von der N9H9 Iminogruppe zu den C4 und C8 Kohlenstoffen des gebundenen Adenins verdeutlicht. (B) Überlagerung der C2 Carbonylregion eines 2D-H(N)C Spektrums der A-Switch-RNA, in der alle Uridine ^{13}C , ^{15}N -markiert sind, in Komplex mit Adenin (schwarz) oder 2,6-Diaminopurin (rot). Die C2 chemischen Verschiebungsänderungen der beiden Uridine, die an den intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind, bei den unterschiedlichen Liganden ist durch Pfeile gekennzeichnet.

Diese Annahme konnte durch den Einsatz des Adeninanalogs 2,6-Diaminopurin als Ligand bestätigt werden. In 2,6-Diaminopurin ist das Proton an der Position 2 in Adenin durch eine Aminogruppe ersetzt, wodurch 2,6-Diaminopurin potentiell zwei weitere intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen mit den C2 Carbonylgruppen der beiden Uridine eingehen

kann. In einem H(N)C Experiment der A-Switch-RNA in Komplex mit 2,6-Diaminopurin konnte gezeigt werden, dass die ^{13}C -chemische Verschiebungen der C2 Carbonylgruppen der beiden Uridine, die an den beiden intermolekularen Basenpaarungen beteiligt sind, zu höherem Feld verschoben sind, wohingegen die ^{13}C -chemischen Verschiebungen der C2 Carbonylgruppen aller weiteren Uridine in der A-Switch-RNA nahezu unverändert bleiben (Abbildung 3.7 B). Somit bilden im 2,6-Diaminopurin-A-Switch-RNA-Komplex die C2 Carbonylgruppen der beiden Uridine intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen aus, die im Adenin-A-Switch-RNA-Komplex nicht vorhanden waren. So wird die Schlussfolgerung bestätigt, nach der ein intermolekulares A:U Basenpaar vorliegt und die C4 Carbonylgruppe des zweiten Uridins eine Wasserstoffbrückenbindung mit der N9H9 Iminogruppe des gebundenen Adenins eingeht.

Für den Komplex aus Guanin mit G-Switch-RNA könnte sich ein ähnliches Muster von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Aminogruppe in Position 2 des gebundenen Guanins und der RNA ausbilden. Hierbei könnte die Aminogruppe des gebundenen Guanins mit den C2 Carbonylgruppen des Cytidins und des Uridins, die an der Ligandbindung beteiligt sind, Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Das H(N)C Spektrum der G-Switch-RNA in Komplex mit Guanin zeigt, dass die ^{13}C -chemische Verschiebung der C2 Carbonylgruppe des an der Ligandbindung beteiligten Uridins im Vergleich zu den restlichen Uridinen der RNA, die in kanonischen A:U Basenpaarungen vorliegen, tieffeld verschoben ist. Das belegt, dass die an der Ligandbindung beteiligte Uridin C2 Carbonylgruppe in der G-Switch-RNA eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Aminogruppe des gebundenen Guanins eingeht. Diese Schlussfolgerung wurde gestärkt durch Experimente mit dem Analogon Hypoxanthin (siehe auch: Bindung von Hypoxanthin an die G-Switch-RNA). Die ^{13}C -chemische Verschiebung der C4 Carbonylgruppe des an der Ligandbindung beteiligten Uridins liegt im Bereich der chemischen Verschiebung von C4 Carbonylgruppen von Uridinen in kanonischen A:U Basenpaaren (Abbildung 3.9 B). Somit geht auch hier die C4 Carbonylgruppe dieses Uridins eine Wasserstoffbrückenbindung mit der N9H9 Iminogruppe des gebundenen Guanins ein, wie es auch im Adenin-A-Switch-RNA-Komplex beobachtet wurde.

Durch die oben beschriebenen Experimente in Kombination mit selektiver Isotopenmarkierung der RNA und des gebundenen Liganden konnte gezeigt werden, dass die Purin-bindenden Riboswitch-RNAs ihren Liganden durch ein intermolekulares Basentripel binden. Hierbei wird Guanin von einem Cytidin der G-Switch-RNA und Adenin von einem Uridin der A-Switch-RNA über die Ausbildung eines intermolekularen Watson-Crick Basenpaares erkannt. Es ist äußerst wahrscheinlich, dass es sich hierbei um das C74 in der G-Switch-RNA und das U74 in der A-Switch-RNA handelt. Beide Riboswitch-RNAs erkennen die N3/N9 Seite des Liganden durch ein weiteres Uridin, dessen N3H3 Iminogruppe eine

Wasserstoffbrückenbindung mit dem N3 des gebundenen Liganden eingeht. Dadurch wird eine weitere intermolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen der C4 Carbonylgruppe dieses Uridins und der N9H9 Iminogruppe des gebundenen Liganden ausgebildet (Abbildung 3.8). Auch konnte gezeigt werden, dass das N7 des Liganden weder durch eine Imino- noch durch eine Aminogruppe der RNA spezifisch erkannt wird. Die Experimente zeigen eindeutig, dass die Ligandbindungstasche im Guanin- bzw. Adenin-bindenden Riboswitch bis auf das an der intermolekularen Watson-Crick Basenpaarung beteiligte Nukleotid der RNA identisch ist.

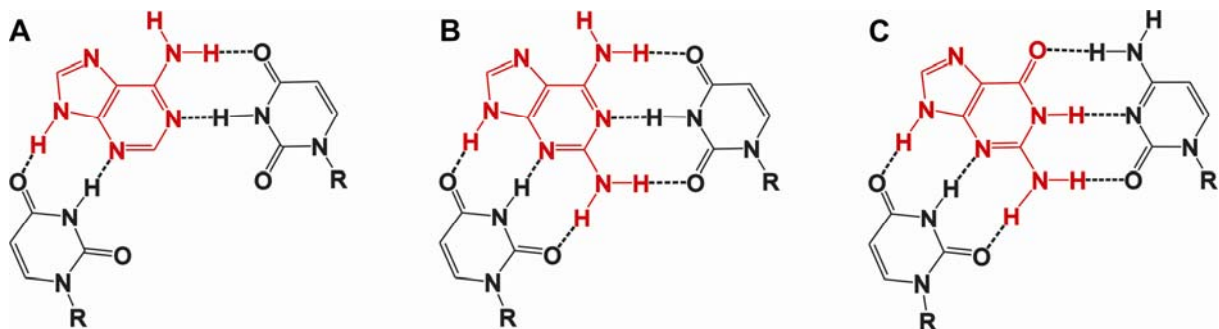


Abbildung 3.8

Die Purin-bindenden Riboswitche erkennen ihren Liganden durch Ausbildung eines intermolekularen Basentriple. (A) Intermolekulare Basenpaarungswechselwirkung zwischen Adenin (rot) und zwei Uridinen der Adenin-bindenden Riboswitch-RNA (schwarz). (B) Im Komplex mit 2,6-Diaminopurine (rot) werden zwei weitere Wasserstoffbrückenbindungen zur Adenin-bindenden Riboswitch-RNA (schwarz) ausgebildet. (C) Intermolekulare Basenpaarungswechselwirkung zwischen Guanin (rot) und einem Cytidin und einem Uridin der Guanin-bindenden Riboswitch-RNA (schwarz).

Kurz nachdem diese Experimente abgeschlossen wurden, wurden die Röntgenstrukturen der Hypoxanthin-G-Switch-RNA- (Batey et al., 2004) und der Guanin-G-Switch-RNA- bzw. der Adenin-A-Switch-RNA- (Serganov et al., 2004) Komplexe publiziert. Durch sie wurden die hier dargestellten unabhängig erzielten NMR-Daten über den Bindungsmodus des Purinliganden an die Purin-bindende Riboswitch-RNA eindeutig bestätigt.

Bindung von Analoga an die G-Switch-RNA und die A-Switch-RNA

Biochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass verschiedene Purinanaloga mit unterschiedlichen Affinitäten an die Aptamerdomänen der Guanin- und Adenin-bindenden Riboswitch-RNAs binden (Mandal et al., 2003; Mandal und Breaker, 2004). Die Analoga unterscheiden sich in ihren funktionellen Gruppen und besitzen somit unterschiedliche Wasserstoffbrückenbindungspotentiale. Es wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Analoga eingesetzt, um eine Aussage über den Beitrag der unterschiedlichen intermolekularen

Wasserstoffbrückenbindungen zur Bindungsaffinität des Liganden zu machen. In diesem Zuge wurde die Bindung von Hypoxanthin, 7-Deazaguanin und 6-Thioguanin an die G-Switch-RNA und von 6-Bromo-2-aminopurin an die A-Switch-RNA NMR-spektroskopisch untersucht (Tabelle 5).

Bindung von Hypoxanthin an die G-Switch-RNA

Die Zugabe von ^{13}C , ^{15}N -markiertem Hypoxanthin, das sich zu Guanin durch die Abwesenheit der Aminogruppe in Position 2 unterscheidet, zur G-Switch-RNA führte in der Iminoregion eines ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrums zum Auftreten von zahlreichen neuen Signalen mit schmaler Linienbreite. Weiterhin wurden Resonanzen der N1H1 und der N9H9 Iminogruppen des gebundenen Hypoxanthins detektiert (Abbildung 3.9 A) und in einem H(N)C Experiment eindeutig zugeordnet. Diese Signale sind in der freien Form des Hypoxanthins wegen ihres schnellen Austausches mit dem Lösungsmittel nicht detektierbar. Dies sind eindeutige Hinweise, dass Hypoxanthin an die G-Switch-RNA auch in Abwesenheit von Mg^{2+} bindet. Die Linienbreiten der Iminogruppenresonanzen des gebundenen Hypoxanthins und der RNA sind in Übereinstimmung mit der Ausbildung eines hochaffinen Komplexes, der sich im langsamen Austausch auf der NMR-Zeitskala befindet und demnach eine Dissoziationskonstante von $<1 \mu\text{M}$ besitzt (Tabelle 5).

Wie bereits für die G-Switch-RNA in Komplex mit Guanin gezeigt wurde (siehe oben) ist in einem 2D-HNN-COSY Spektrum der G-Switch-RNA in Komplex mit Hypoxanthin sowohl eine Korrelation der N1H1 Iminogruppe des gebundenen Hypoxanthins mit dem N3 eines Cytidins als auch die Korrelation der Iminogruppe eines Uridins der RNA mit dem N3 des gebundenen Hypoxanthins detektierbar (Abbildung 3.9 A). Die Detektierbarkeit der N9H9-Iminogruppe des gebundenen Hypoxanthins und die Abwesenheit einer Korrelation im 2D-HNN-COSY Spektrum deuten darauf hin, dass diese Iminogruppe eine Wasserstoffbrückenbindung mit einem Sauerstoff als Wasserstoffbrückenakzeptor ausbildet.

In einem H(N)C Experiment zeigt die chemische Verschiebung der C4 Carbonylgruppe des Uridins, dessen Iminogruppe eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem N3 des gebundenen Hypoxanthins eingeht, dass diese C4 Carbonylgruppe in einer Wasserstoffbrückenbindung vorliegt (Abbildung 3.9 B). Das erhärtet die Annahme, nach der diese Carbonylgruppe mit dem N9H9 des gebundenen Hypoxanthins eine Wasserstoffbrückenbindung eingeht.

Der Vergleich des H(N)C Spektrums der G-Switch-RNA in Komplex mit Hypoxanthin im Gegensatz zu Guanin zeigt, dass sich die ^{13}C -chemische Verschiebung der C2 Carbonylgruppe des an der Ligandbindung beteiligten Uridins hin zu niedrigeren ppm ändert, wohingegen die ^{13}C -chemischen Verschiebungen der C2 Carbonylgruppen aller weiteren Uridine in der G-Switch-RNA nahezu unverändert bleiben (Abbildung 3.9 B). Somit bildet die C2

Carbonylgruppe des Uridins im Hypoxanthin-G-Switch-RNA-Komplex keine Wasserstoffbrückenbindung aus, was jedoch für den Guanin-G-Switch-RNA-Komplex beobachtet wurde. Die C4 chemische Verschiebung der Carbonylgruppe dieses Uridins bleibt unverändert, wenn die RNA an Hypoxanthin statt an Guanin gebunden vorliegt.

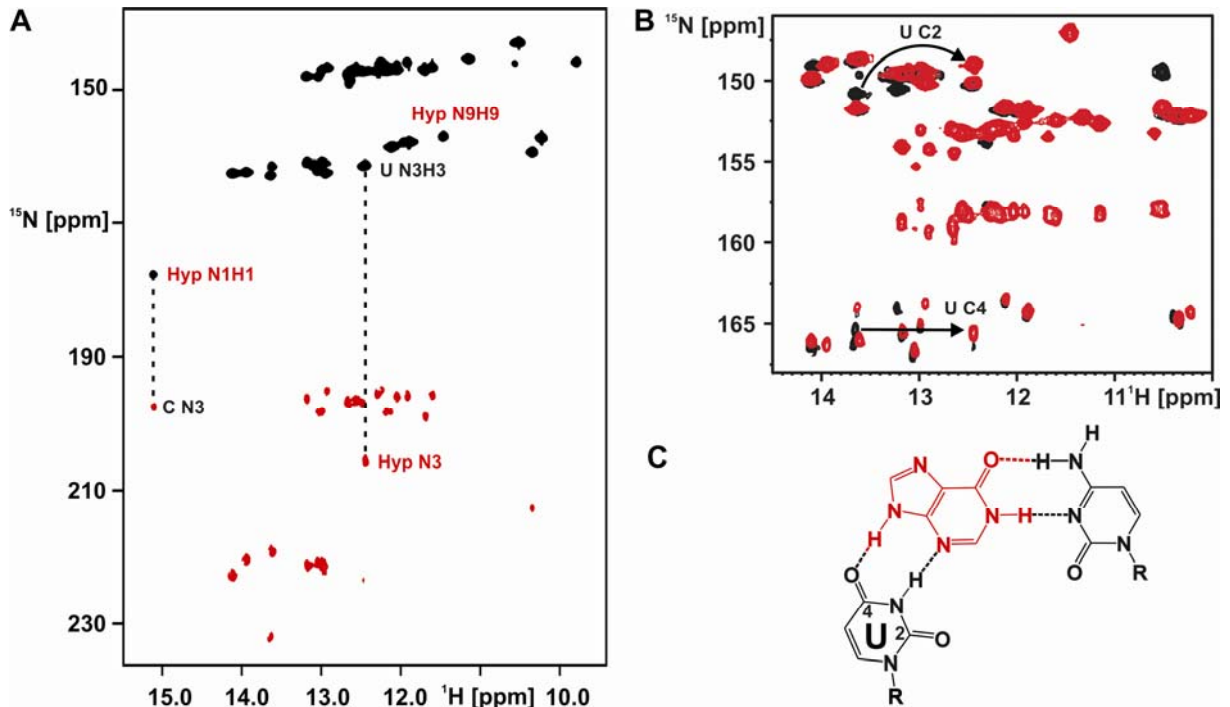


Abbildung 3.9

Bindungsmechanismus von Hypoxanthin an die G-Switch-RNA. (A) 2D-HNN-COSY Spektrum von ^{15}N -markierter G-Switch-RNA in Komplex mit $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markiertem Hypoxanthin. Sowohl die Korrelation der N1H1 Iminogruppe des gebundenen Hypoxanthins mit dem N3 eines Cytidins der RNA als auch die Korrelation der Iminogruppe eines Uridins mit dem N3 des gebundenen Hypoxanthins ist durch eine gestrichelte Linie hervorgehoben. Das N9H9 des gebundenen Hypoxanthins zeigt keine Korrelation. (B) Überlagerung der C2 und C4 Carbonylregion eines 2D-H(N)C Spektrums der G-Switch-RNA in Komplex mit Guanin (schwarz) oder Hypoxanthin (rot). Die G-Switch-RNA in Komplex mit Guanin ist in allen Uridinen $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markiert, wohingegen die G-Switch-RNA in Komplex mit Hypoxanthin komplett $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markiert ist, wodurch auch die C2 und C6 Resonanzen der Guanosine auftauchen, die hier nicht betrachtet werden. Die C2 und C4 chemischen Verschiebungsänderungen des Uridins, das an der Ligandbindung beteiligt ist, bei den unterschiedlichen Liganden, ist durch Pfeile gekennzeichnet. (C) Intermolekulare Basenpaarungswechselwirkung zwischen dem gebundenen Hypoxanthin (rot) und der G-Switch-RNA (schwarz). Das C2 und das C4 des Uridins sind markiert.

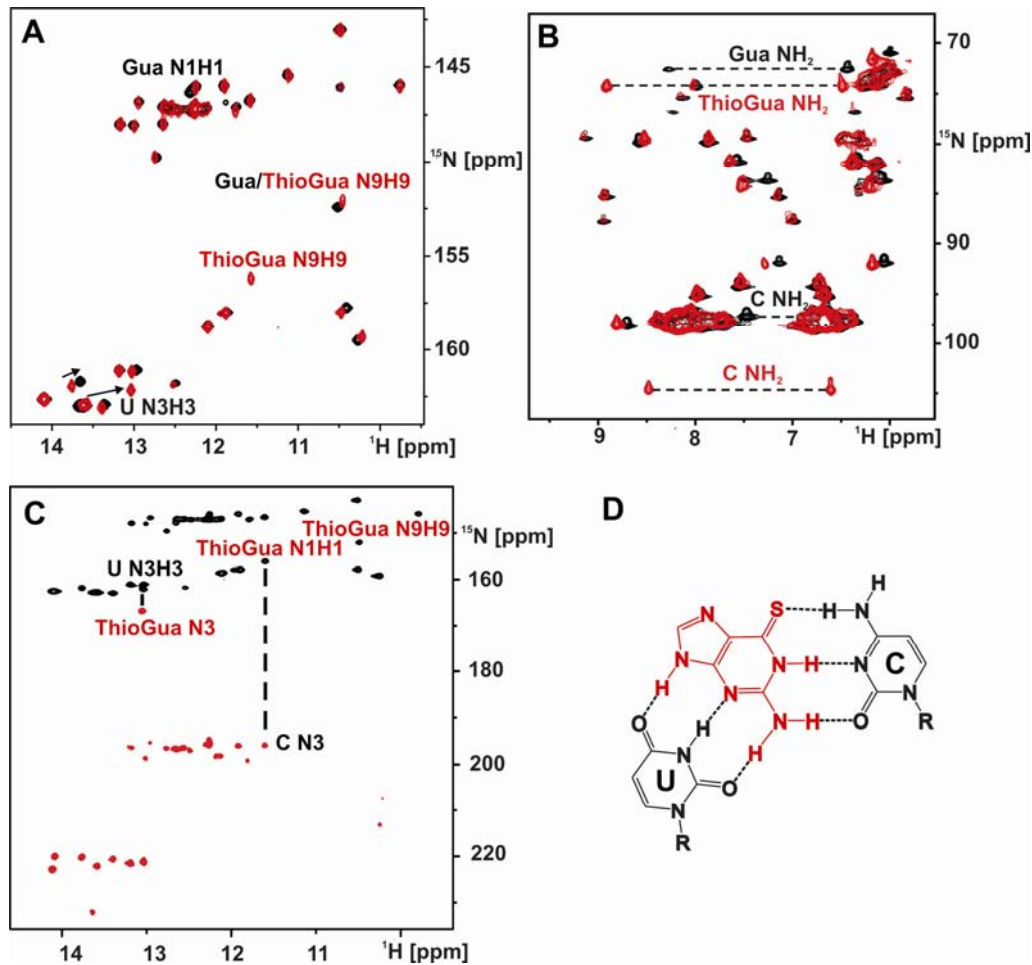
Diese Daten zeigen, dass Hypoxanthin ebenso wie Guanin eine Watson-Crick-Basenpaarung mit einem Cytidin der RNA eingeht und dass ein Uridin der RNA eine Basenpaarung mit der N3/N9-Seite des gebundenen Hypoxanthins eingeht (Abbildung 3.9 C). Da Hypoxanthin im Gegensatz zu Guanin an der Position 2 keine Aminogruppe trägt, werden im Hypoxanthin-RNA-Komplex zwei Wasserstoffbrückenbindungen weniger als im Guanin-RNA-Komplex ausgebildet (Vergleich mit Abbildung 3.8 C), was den Anstieg der Dissoziationskonstante von

5 auf 50 nM rechtfertigt (Mandal et al., 2003). Dieser Bindungsmechanismus ist in Übereinstimmung mit der von Batey et al. publizierten Röntgenstruktur des Komplexes (Batey et al., 2004) und ist analog zum Bindungsmechanismus im Guanin-RNA-Komplex. Aufgrund seiner besseren Löslichkeit im Gegensatz zu Guanin wurde Hypoxanthin bevorzugt in den folgenden Experimenten als Ligand für die G-Switch-RNA eingesetzt.

Bindung von 6-Thioguanin an die G-Switch-RNA

Die Zugabe von $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markiertem 6-Thioguanin zur G-Switch-RNA führte in der Iminoregion eines $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrums zum Auftreten von zahlreichen neuen Signalen mit schmaler Linienbreite. Auch konnten Resonanzen der N1H1 und der N9H9 Iminogruppen des gebundenen 6-Thioguanins detektiert und zugeordnet werden (Abbildung 3.10 A und C). Somit bindet 6-Thioguanin mit hoher Affinität an die G-Switch-RNA in der Abwesenheit von Mg^{2+} .

Die Überlagerung der Iminogruppenregion der $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren der G-Switch-RNA in Komplex mit Guanin und mit 6-Thioguanin zeigt, dass sich durch den unterschiedlichen Liganden die chemische Verschiebung von wenigen Resonanzen ändert (Abbildung 3.10 A). Am stärksten ändert sich die chemische Verschiebung eines Uridins, das eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem N3 des gebundenen 6-Thioguanins eingeht, wie es aus einem 2D-HNN-COSY Spektrum des Komplexes aus der RNA mit 6-Thioguanin ersichtlich ist (Abbildung 3.10 C). Auch bei der Überlagerung der Aminoregion von $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren der G-Switch-RNA in Komplex mit Guanin und 6-Thioguanin zeigt der Großteil der Resonanzen die gleiche chemische Verschiebung für beide Liganden mit Ausnahme zweier Aminogruppen (Abbildung 3.10 B). Eine der Aminogruppen kann anhand von NOEs dem gebundenen Liganden und die andere dem Cytidin, das mit dem Liganden eine Watson-Crick Basenpaarung eingeht, zugeordnet werden. Die Resonanzen dieser beiden Aminogruppen sind für den Komplex mit 6-Thioguanin im Gegensatz zu Guanin in ^{15}N zu tieferem Feld verschoben. Auch ist der chemische Verschiebungsunterschied der beiden Protonen der beiden angesprochenen Aminogruppen für den Komplex mit 6-Thioguanin deutlich größer als für den Komplex mit Guanin. Dieser Effekt könnte auf dem unterschiedlichen chemischen Umfeld basieren, das diese Aminogruppenprotonen durch den unterschiedlichen Liganden erfahren. Allerdings könnten die Wasserstoffbrückenbindungen der intermolekularen Watson-Crick Basenpaarung der RNA im Komplex mit 6-Thioguanin auch stärker sein als im Komplex mit Guanin, was die Rotationsbarriere der beteiligten Aminogruppen erhöht und dadurch zu größeren chemischen Verschiebungsunterschieden der Aminogruppenprotonen führt.

**Abbildung 3.10**

Bindungsmechanismus von 6-Thioguanin an die G-Switch-RNA. (A) Überlagerung der Iminoregion von $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren der G-Switch-RNA in Komplex mit Guanin (schwarz) und in Komplex mit 6-Thioguanin (rot). Die N1H1 und die N9H9 Iminogruppen der Liganden sind markiert. Die chemischen Verschiebungsänderungen der N3H3 Iminoressonanz sowohl des Uridins (U), das eine Basenpaarung mit der N3N9 Seite des gebundenen Liganden eingeht, als auch eines weiteren Uridins, ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. (B) Überlagerung der Aminoregion von $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren der G-Switch-RNA in Komplex mit Guanin (schwarz) und in Komplex mit 6-Thioguanin (rot). Die Aminogruppenresonanzen der unterschiedlichen Liganden und des Cytidins (C NH₂), das mit dem Ligand eine intermolekulare Watson-Crick Basenpaarung eingeht, sind gekennzeichnet. Die Resonanzen der beiden Protonen einer Aminogruppe sind durch eine gestrichelte Linie verbunden. (C) 2D-HNN-COSY Spektrum der Iminoregion des Komplexes aus ^{15}N -markierter G-Switch-RNA mit $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markiertem 6-Thioguanin. Die intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen sowohl dem N1H1 des 6-Thioguanins und dem N3 eines Cytidins als auch dem N3H3 eines Uridins und dem N3 des gebundenen 6-Thioguanin, sind durch gestrichelte Linien hervorgehoben. Das N9H9 des gebundenen 6-Thioguanin ist markiert. (D) Intermolekulare Basenpaarungswechselwirkung zwischen dem gebundenen 6-Thioguanin (rot) und der G-Switch-RNA (schwarz).

Anhand der $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren und dem 2D-HNN-COSY Spektrum wird ein Bindungsmechanismus von 6-Thioguanin an die G-Switch-RNA beschrieben (Abbildung 3.10

D), der identisch mit dem vorher beschriebenen Bindungsmechanismus von Guanin an die G-Switch-RNA ist. Die Bindung von 6-Thioguanin ändert nicht die globale Struktur des G-Switch-RNA-Komplexes. Das wird dadurch deutlich, dass lediglich Resonanzen von Nukleotiden, die in der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung lokalisiert sind, ihre chemische Verschiebung ändern. Diese chemischen Verschiebungsänderungen werden durch die unterschiedliche chemische Natur des Substituenten in der Position 6 des Purinrings im 6-Thioguanin hervorgerufen.

Bindung von 7-Deazaguanin an die G-Switch-RNA

Die Zugabe von 7-Deazaguanin zur G-Switch-RNA führte in der Iminoregion eines $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrums zum Auftreten von zahlreichen neuen Signalen mit schmaler Linienbreite (Abbildung 3.11 A). In einem gefilterten 1D- ^1H Spektrum von ^{15}N -markierter G-Switch-RNA in Komplex mit unmarkiertem 7-Deazaguanin konnten die N1H1 und die N9H9 Iminogruppen des gebundenen 7-Deazaguanin detektiert und zugeordnet werden (Abbildung 3.11 B). In der freien Form von 7-Deazaguanin ist interessanterweise bereits eine Iminoressonanz detektierbar. Diese Iminoressonanz, deren chemische Verschiebung in der freien Form sehr ähnlich der in der gebundenen Form ist, kann der N9H9 Iminogruppe zugeordnet werden. Demzufolge ist die N1H1 Iminogruppen aufgrund ihres schnellen Austausches mit dem Lösungsmittel nicht detektierbar. Diese Daten zeigen, dass die G-Switch-RNA in Abwesenheit von Mg^{2+} einen hochaffinen Komplex mit 7-Deazaguanin ausbildet. Der Vergleich der Iminoregion der $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren der G-Switch-RNA in Komplex mit Guanin bzw. mit 7-Deazaguanin zeigt, dass die Anzahl der detektierbaren Iminoressonanzen unverändert bleibt und lediglich für die N3H3 Iminoressonanz eines Uridins eine starke chemische Verschiebungsänderung für den Komplex der RNA mit 7-Deazaguanin im Gegensatz zu Guanin zu beobachten ist (Abbildung 3.11 A). Aufgrund der unveränderten Anzahl an Iminoressonanzen kann ausgeschlossen werden, dass eine Iminogruppe der RNA eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem N7 des Liganden ausbildet und die geringen chemischen Verschiebungsänderungen weisen darauf hin, dass die globale Struktur des G-Switch-RNA-Komplexes erhalten bleibt.

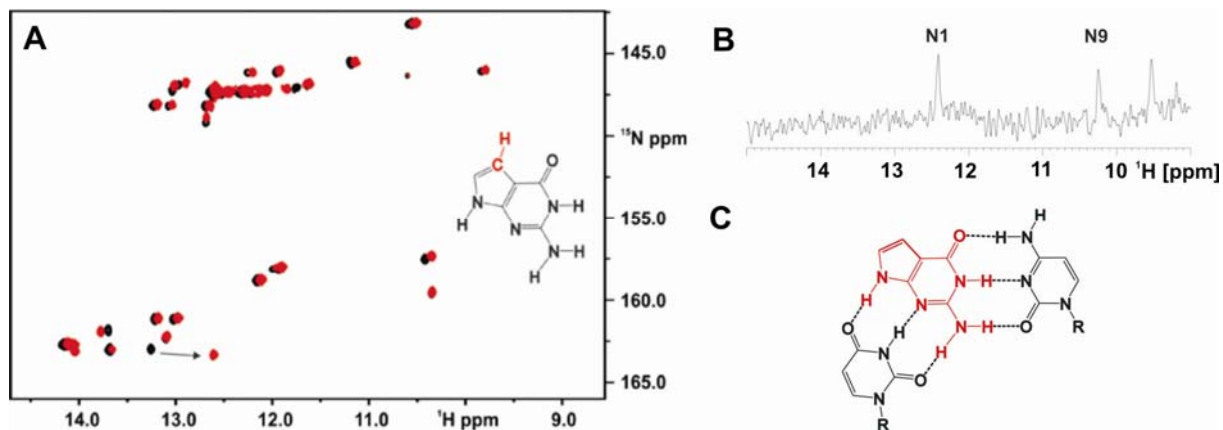


Abbildung 3.11

Bindung von 7-Deazaguanin an die G-Switch-RNA. (A) Überlagerung der Iminoregionen der $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren von ^{15}N -markierter G-Switch-RNA in Komplex mit Guanin (schwarz) und 7-Deazaguanin (rot). Die Anzahl der detektierbaren Signale bleibt unverändert. Eine N3H3 Iminogruppe eines Uridins der RNA, die eine starke chemische Verschiebungsänderung zwischen den Komplexen mit Guanin und 7-Deazaguanin zeigt, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die chemische Struktur von 7-Deazaguanin ist schematisch dargestellt. Der Unterschied zu Guanin ist rot hervorgehoben. (B) 1D-1H gefiltertes Spektrum von ^{15}N -markierter G-Switch-RNA in Komplex mit unmarkiertem 7-Deazaguanin. Die N1H1 und die N9H9 Iminogruppe des gebundenen 7-Deazaguanins können detektiert und zugeordnet werden. (C) Intermolekulare Basenpaarungswechselwirkung zwischen dem gebundenen 7-Deazaguanin (rot) und der G-Switch-RNA (schwarz).

Bindung von 6-Bromo-2-aminopurin an die A-Switch-RNA

Die Zugabe von 6-Bromo-2-aminopurin zur A-Switch-RNA führte zu keinen Änderungen in der Iminoregion eines $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrens. Nach weiterer Zugabe von 5 mM Mg^{2+} traten jedoch zahlreiche neue Resonanzen mit schmaler Linienbreite auf und die N9H9 Iminogruppe des gebundenen 6-Bromo-2-aminopurins wird detektierbar, was für die Ausbildung eines stabilen Komplexes der A-Switch-RNA mit 6-Bromo-2-aminopurin steht (Abbildung 3.12 A). Demzufolge erfolgt die Bindung von 6-Bromo-2-aminopurin an die A-Switch-RNA im Gegensatz zu Adenin Mg^{2+} -abhängig. 6-Bromo-2-aminopurin unterscheidet sich von Adenin durch den Austausch der Aminogruppe mit einem Brom in Position 6 und durch die Einführung einer Aminogruppe in Position 2. Somit geht im 6-Bromo-2-aminopurin-A-Switch-RNA-Komplex im Gegensatz zum Adenin-A-Switch-RNA-Komplex eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Aminogruppe in Position 2 des Liganden und der C4 Carbonylgruppe des Uridins, das eine Watson-Crick Basenpaarung mit dem Liganden eingeht, verloren. Stattdessen können sich zwei zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der neu eingeführten Aminogruppe in Position 2 und den C2 Carbonylgruppen der beiden an der Ligandbindung beteiligten Uridinen ausbilden (Abbildung 3.12 B).

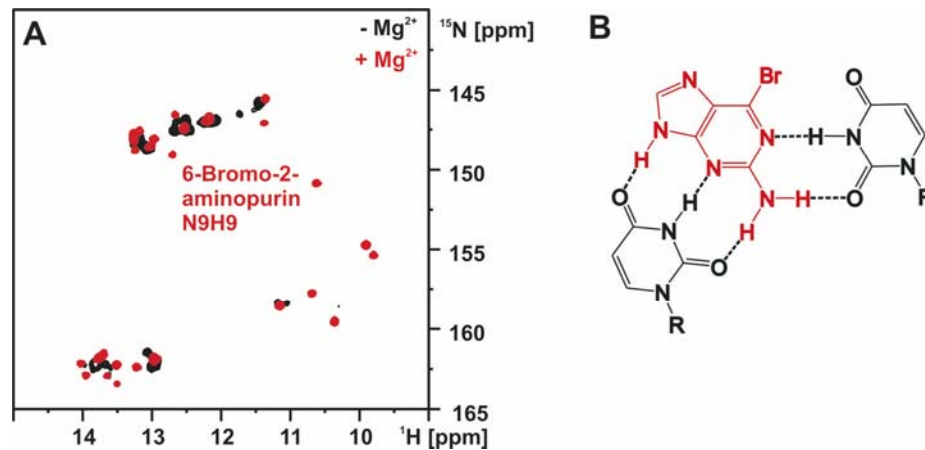


Abbildung 3.12

Die Bindung von 6-Bromo-2-aminopurin an die A-Switch-RNA bedarf Mg^{2+} . (A) Überlagerung der Iminoregion von $^1H,^{15}N$ -HSQC Spektren der A-Switch-RNA mit 6-Bromo-2-aminopurin (schwarz) und der A-Switch-RNA mit 6-Bromo-2-aminopurin und 5 mM Mg^{2+} (rot). Die N9H9 Iminogruppe des 6-Bromo-2-aminopurins ist in Gegenwart von Mg^{2+} detektierbar und im Spektrum gekennzeichnet. (B) Intermolekulare Basenpaarungswechselwirkung zwischen dem gebundenen 6-Bromo-2-aminopurin (rot) und der A-Switch-RNA (schwarz).

Die Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Position 6 des Liganden und der Position 4 des einen Uridins führt zum Verlust der Ligandbindung an die A-Switch-RNA. Selbst die zwei neuen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Position 2 des Liganden und der Position 2 der beiden Uridine können die Ligandbindung nicht wiederherstellen. Somit kann der Verlust der Wasserstoffbrückenbindung an Position 6 des Liganden nicht von zwei neu eingeführten Wasserstoffbrückenbindungen an Position 2 kompensiert werden, was ihr eine höhere Priorität in der Ligandbindung der A-Switch-RNA zukommen lässt. Neben den beiden neuen intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen bedarf es schließlich noch Mg^{2+} für die Bindung von 6-Bromo-2-aminopurin an die A-Switch-RNA.

Die Ligandbindungsuntersuchungen von verschiedenen Analoga an die G-Switch- und an die A-Switch-RNA zeigen, dass die Wasserstoffbrückenbindungen an den Positionen 2 und 7 des Liganden keine essentielle Rolle für die Ligandbindung spielen. Im Gegensatz dazu ist die Wasserstoffbrückenbindung an Position 6 kritisch für die Ligandbindung. Ihr Verlust kann nicht durch zwei neue Wasserstoffbrückenbindungen an Position 2 kompensiert werden. Außerdem wird deutlich, dass Mg^{2+} -Ionen die Bindungsaffinität von Liganden erhöht, obwohl Mg^{2+} nicht direkt an der Ligandbindung beteiligt ist, da seine Anwesenheit keine generelle Voraussetzung für die Ligandbindung darstellt.

3.3 Konformationelle Änderungen der Purin-Riboswitch Aptamerdomänen

Durch die Beschreibung des Bindungsmechanismus von Liganden an die Purin-bindenden Riboswitche können lediglich Aussagen über die Nukleotide der RNA getroffen werden, die direkt an der Ligandbindung beteiligt sind. Diese Daten können jedoch keinen Aufschluss über die Konformation der freien und der Ligand-gebundenen RNA geben und in diesem Zuge eventuell auftretende konformationelle Unterschiede aufzeigen.

Um Aussagen über die Konformation der RNA zu machen, werden ortsspezifische Sonden in der RNA benötigt, wozu sich die Iminogruppenresonanzen besonders eignen. Sie treten für alle basengepaarte Guanodin- und Uridinreste auf. Eine Grundvoraussetzung für die Verwendung von Iminogruppenresonanzen als ortsspezifische Sonden ist deren eindeutige Zuordnung. Mit der Zuordnung der Iminogruppenresonanzen kann sowohl die Identität der Nukleotide, die an der Ligandbindung beteiligt sind, offengelegt werden, als auch eventuelle Ligand-induzierte konformationelle Änderungen aufgezeigt werden. Weiterhin kann die Wechselwirkung von Metallionen an die RNA lokalisiert werden.

Zuordnung der Iminoresonanzen des G-Switch-RNA-Hypoxanthin-Komplexes

Die Zuordnung der Iminoresonanzen für eine RNA der Größe und Komplexität der G-Switch-RNA ist schwierig, da die Iminoresonanzen in den kanonischen Bereichen überlagern und in den nicht-kanonischen Bereichen eine NOE-basierte Iminoresonanzkonnektivität, die Grundlage für die Iminoresonanzzuordnung, nicht mehr gegeben ist. Hier kann jedoch die Röntgenstruktur von Nutzen sein, da durch sie mögliche NOEs vorhergesagt werden können, nach denen dann gezielt gesucht werden kann. Auf diese Weise gelang es, die Iminoresonanzen sowohl der G-Switch-RNA und der G-Switch-wt-RNA in Komplex mit Guanin und Hypoxanthin als auch der A-Switch-RNA und der A-Switch-wt-RNA in Komplex mit Adenin vollständig zuzuordnen. Die Zuordnung der Iminoresonanzen soll im Folgenden am Beispiel der G-Switch-RNA in Komplex mit Hypoxanthin beschrieben werden.

Die Iminoresonanzen in einem $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektroms der G-Switch-RNA in Komplex mit Hypoxanthin waren für eine RNA von 73 Nukleotiden Länge außerordentlich gut aufgelöst. Die G-Switch-RNA enthält 21 Guanosine und 17 Uridine (Abbildung 3.13 B). Im Bereich der chemischen Verschiebung von Guanosin H1N1-Gruppen waren 19 Resonanzen und im

sehr stabil ist und folglich mit dem Lösungsmittel austauscht. Die Nicht-Detektierbarkeit der Iminoresonanzen der Reste U36, U48, U63 und G62 ist durch die publizierte Röntgenstruktur des Komplexes (Batey et al., 2004) zu erklären, in der diese Reste lösungsmittelzugänglich sind und somit wie G12 nicht zu beobachten sind. Sämtliche beobachteten inter- und intramolekularen NOEs und Wasserstoffbrückenbindungen im 2D-HNN-COSY Spektrum (Abbildung 3.9 A) können durch die Röntgenstruktur des Komplexes vorhergesagt werden. Das lässt die Annahme zu, dass die Struktur des untersuchten RNA-Hypoxanthin-Komplexes in Lösung nahezu identisch mit dem Komplex im Kristall ist.

Struktureller Übergang der G-Switch-RNA von der freien in die gebundene Form

Um die strukturellen Übergänge der freien G-Switch-RNA zu ihrer Hypoxanthin-gebundenen Form genauer zu charakterisieren, wurden die Iminoregionen von $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren der freien und der Hypoxanthin-gebundenen RNA in Abwesenheit von Mg^{2+} verglichen. Die Iminoresonanzen der Uridine und Guanosine der RNA eignen sich besonders gut, um strukturelle Übergänge zu beobachten, da sie nur detektierbar sind, wenn sie Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden z.B. im Zuge von Basenpaarungen oder wenn sie aus sterischen Gründen vor dem Austausch mit dem Lösungsmittel geschützt sind. Weiterhin sind die chemischen Verschiebungen der Iminoresonanzen empfindlich auf die Art der Wechselwirkung, die die Iminogruppe eingeht und auch empfindlich auf Unterschiede in Basenstapelungen aufgrund der daraus resultierenden Ringstromeffektänderung.

Das $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum der freien G-Switch-RNA zeigte weniger Signale als die Hypoxanthin-gebundene Form und die Signale hatten unterschiedliche Intensitäten und ihre Linienbreiten waren nicht homogen wie in der gebundenen Form (Abbildung 3.14 A). Das deutete darauf hin, dass der freie Zustand der G-Switch-RNA weniger strukturiert ist als der gebundene und ein Ensemble von Konformationen, die sich mit Ratenkonstanten ineinander umwandeln, die im sogenannten intermediären Austausch auf der NMR-Zeitskala (Bain, 2003) vorliegen. Dennoch konnten viele der Signale im freien Zustand durch Vergleich mit der gebundenen Form zugeordnet werden. Diese partielle Zuordnung konnte durch 2D- $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY und 3D- $^1\text{H},^1\text{H},^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC Spektren der freien G-Switch-RNA überprüft und ausgeweitet werden. Der Vergleich der Iminoresonanzen der G-Switch-RNA in ihrer freien und Hypoxanthin-gebundenen Form deutet darauf hin, dass die Sekundärstruktur der RNA sehr ähnlich im freien und gebundenen Zustand ist. Die Helices I, II und III sind zu einem großen Teil in beiden Zuständen ausgebildet. Auch sind die beiden G:U Basenpaare, U17:G79 in Helix I und G57:U69 in Helix III, in beiden Zuständen detektierbar.

Die Iminosignale sämtlicher Nukleotide der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung und der abschließenden Basenpaare der drei Helices, die zur Drei-Wege-Kreuzung zeigen, sind im Gegensatz zu den drei Helices in der freien Form nicht nachweisbar. Hierbei handelt es sich um die Nukleotide U22, G45, G46, U47, U49, U51, G72 und U75 (Abbildung 3.14 A). Demzufolge sind die Nukleotide der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung in der freien Form der G-Switch-RNA an keinen stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt und liegen sehr wahrscheinlich flexibel und unstrukturiert vor.

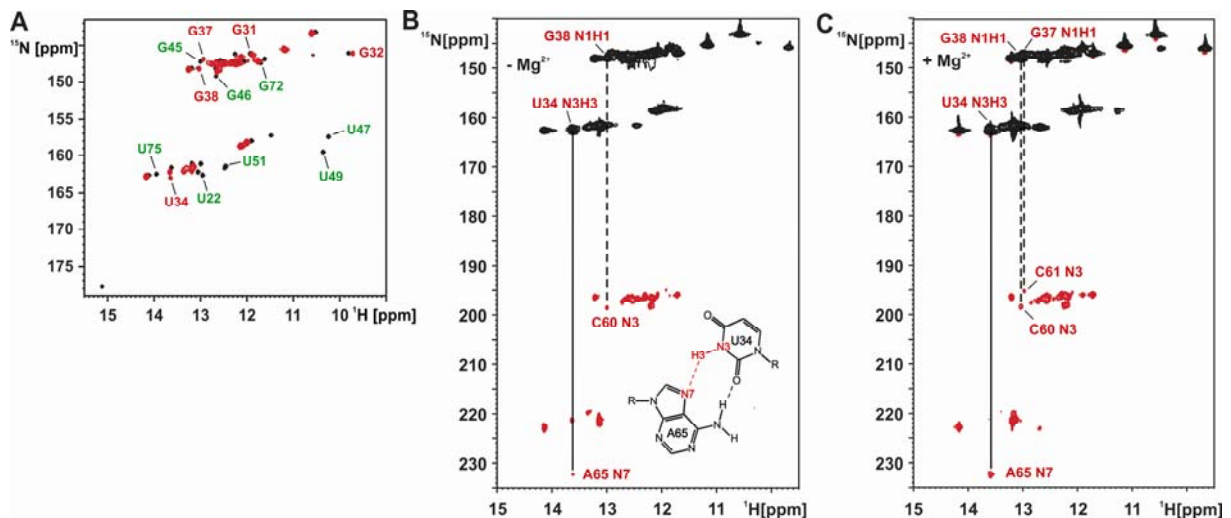


Abbildung 3.14

Konformationelle Änderung der G-Switch-RNA durch Hypoxanthin Bindung und Konformation der freien RNA. (A) Überlagerung der Iminoregion von ^1H , ^{15}N -HSQC Spektren der G-Switch-RNA in Komplex mit Hypoxanthin (schwarz) und der freien G-Switch-RNA (rot). Iminosonanzen der Nukleotide aus der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung sind grün und von Nukleotiden aus den Schleife II und III sind in rot gekennzeichnet. (B) HNN-COSY der freien G-Switch-RNA in Abwesenheit von Mg^{2+} . Eine durchgezogene Linie kennzeichnet die Korrelation, die eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Iminogruppe eines Uridins und der N7 Position eines Adens widerspiegelt, wie sie im umgekehrten Hoogsteen A:U Basenpaar zwischen dem U34 in Schleife II und dem A65 in Schleife III vorkommt. Diese Basenpaarung, mit der nachgewiesenen Wasserstoffbrückenbindung in rot hervorgehoben, ist schematisch in die Abbildung eingelassen. Eine gestrichelte Linie kennzeichnet die Korrelation, die eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Iminogruppe von G38 in Schleife II und dem N3 von C60 in Schleife III widerspiegelt, wie sie für ein Watson-Crick G:C Basenpaar erwartet wird. (C) HNN-COSY Spektrum der freien G-Switch-RNA in Gegenwart von 5 mM Mg^{2+} . Das Kreuzsignal, das das oben beschriebene umgekehrte Hoogsteen A:U Basenpaar widerspiegelt, hat eine größere Intensität als in Abwesenheit von Mg^{2+} . Auch wird nun die Korrelation detektierbar, die eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Iminogruppe des G37 und dem N3 von C61 widerspiegelt, wie es im Watson-Crick G:C Basenpaar zwischen G37 in Schleife II und C61 in Schleife III vorkommt. Somit stabilisiert Mg^{2+} die angeführten weitreichenden Basenpaarungen.

Neben den Signalen der Nukleotide der drei Helices sind im Iminobereich des ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrums der freien G-Switch-RNA Resonanzen sichtbar, die den Nukleotiden U34, G37 und

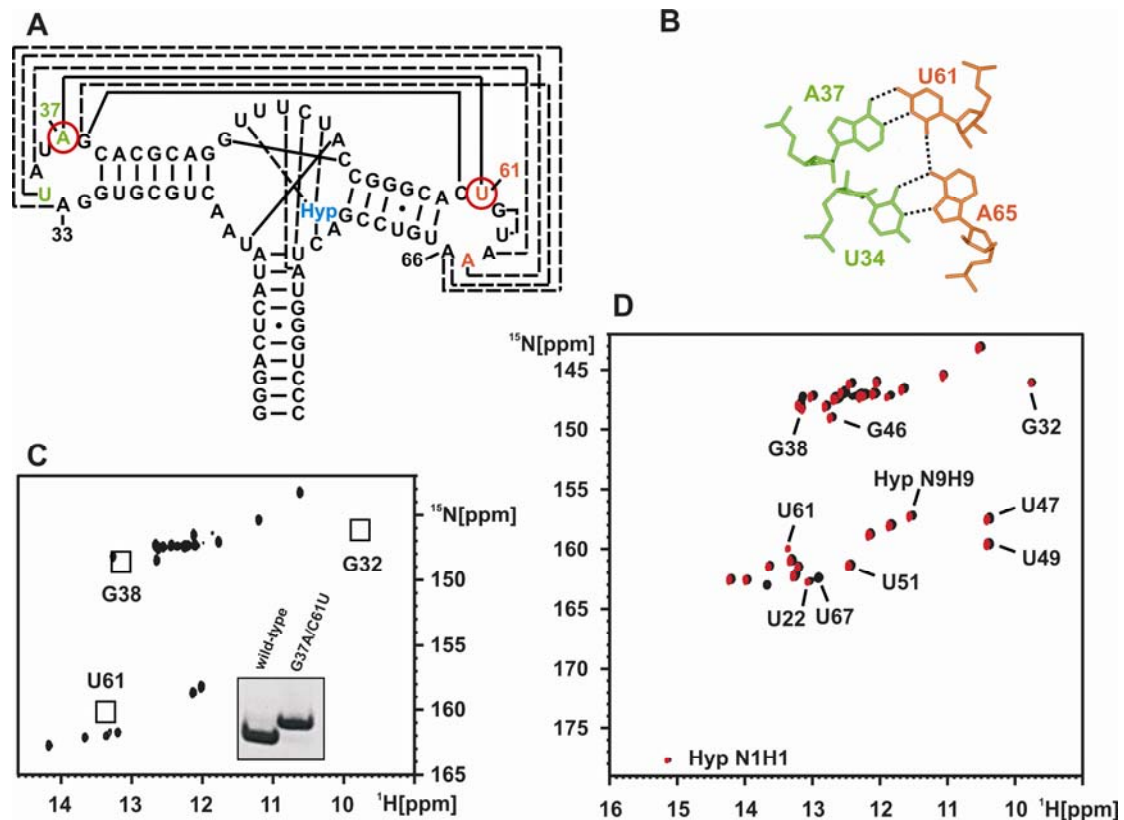
G38 zugeordnet werden können, die an der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung zwischen den Schlaufen II und III beteiligt sind. Zusätzlich wird das Iminosignal des Restes G32 beobachtet, der am apikalen Ende der Helix II lokalisiert ist. Die Iminoresonanzen der aufgeführten Nukleotide weisen sehr ähnliche chemische Verschiebungen in der Hypoxanthin-gebundenen und in der freien Form der G-Switch-RNA auf, so dass sie wahrscheinlich in sehr ähnlichen Basenpaarungen in der freien und der gebundenen Form vorliegen. G37 und G38 aus der Schlaufe II gehen mit C61 und C60 aus der Schlaufe III zwei weitreichende Watson-Crick Basenpaare ein (Abbildung 3.13 C und D). U34 bildet mit A65 ein umgekehrtes Hoogsteen A:U Basenpaar aus, was zusammen mit dem G37:C61 Basenpaar ein Basenquartett formt (Abbildung 3.13 C). Auf ähnliche Weise bildet das G38:C60 Basenpaar mit dem ungewöhnlichen A33:A66 Basenpaar ein weiteres Basenquartett aus (Abbildung 3.13 D). Die Iminogruppe von G32 geht keine Wasserstoffbrückenbindung ein, ist aber dennoch detektierbar, da sie durch Stapelwechselwirkungen von dem Austausch mit dem Lösungsmittel geschützt ist (Abbildung 3.14 A und B). Die beschriebenen Wasserstoffbrückenbindungen, die an der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung beteiligt sind, wurden weiter mittels eines 2D-HNN-COSY Experiments an einer Probe der freien G-Switch-RNA analysiert. Hier konnte die G38:C60 Basenpaarung durch eine Korrelation der G38 Iminoresonanz mit dem N3 von C60 nachgewiesen werden, wie sie in einem G:C Watson-Crick Basenpaar auftreten. Zusätzlich konnte die Ausbildung der weitreichenden Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Iminogruppe von U34 und dem N7 von A65 aufgrund ihrer charakteristischen Korrelation gezeigt werden (Abbildung 3.14 B). Die hier beschriebenen Wasserstoffbrückenbindung, die in der freien Form der G-Switch-RNA gefunden wurden, wurden ebenso in der Hypoxanthin-gebundenen Form nachgewiesen, was zusammen mit den sehr ähnlichen chemischen Verschiebungen in der freien und gebundenen Form der Iminoresonanzen von den Nukleotiden, die an der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung beteiligt sind, zeigt, dass die weitreichenden Basenpaarungen der Schlaufen II und III bereits in der freien Form der G-Switch-RNA vorhanden sind. Die beinahe identischen chemischen Verschiebungen von den Nukleotiden, die an der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung beteiligt sind, schließt ein Gleichgewicht im schnellen Austausch auf der NMR-Zeitskala von einer Konformation, in der die Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung ausgebildet ist und einer, in der sie nicht ausgebildet ist, aus. In diesem Falle würde sich die chemische Verschiebung der beteiligten Reste aus einem Mittelwert aus dem Anteil der Konformationen mit einer ausgebildeten und ohne ausgebildeter Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung zusammensetzen und damit von der chemischen Verschiebung der Konformation mit ausgebildeter Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung stärker abweichen. Auch kann ein Gleichgewicht im langsamen Austausch auf der NMR-Zeitskala ausgeschlossen werden, da hierbei doppelte Signalsätze für die Iminogruppen von den stabilen Watson-Crick Basenpaarungen in den Helices II und III zu erwarten wären, was nicht zu beobachten ist.

Dennoch scheint die Dynamik der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung in der freien Form etwas größer zu sein als in der Hypoxanthin-gebundenen Form, da die Reste G37 und U34 in der freien Form etwas größere Linienbreiten zeigen.

Die Zugabe von Mg^{2+} zur freien Form der G-Switch-RNA verursachte geringe Änderungen in der chemischen Verschiebung einiger Reste, führte allerdings zu keinen neuen Resonanzen, wie z.B. Resonanzen für die Ligand-bindende Drei-Wege-Kreuzung. Ein 2D-HNN-COSY Spektrum der G-Switch-RNA in Gegenwart von Mg^{2+} zeigte, dass die Korrelation der U34 Iminogruppe mit dem N7 von A65 an Intensität zunahm und dass nun eine Korrelation zwischen der G37 Iminogruppe und dem N3 von C61 detektierbar war (Abbildung 3.14 C). Demzufolge führt die Anwesenheit von Mg^{2+} zu einer Stabilisierung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung in der freien Form der G-Switch-RNA, wohingegen weiterhin keine stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen für die Ligand-bindende Drei-Wege-Kreuzung nachweisbar sind.

Destabilisierung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung durch Einführung einer Mutation

Zur Charakterisierung der Rolle der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung zwischen den Schlaufen II und III wurde eine Mutation in einem der beiden Basenquartetts vorgenommen, das die beiden Schlaufen verbindet. Hier wurde das G37:C61 Watson-Crick Basenpaar, das ein Basenquartett mit dem umgekehrten U34:A65 Hoogsteen Basenpaar ausbildet, zu einem A37:U61 Watson-Crick Basenpaar mutiert (Abbildung 3.15 A). Diese Mutation führt formal zum Verlust von zwei Wasserstoffbrückenbindungen im Basenquartett, eine im A37:U61 Basenpaar und eine zwischen den Resten A37 und U34 (Abbildung 3.15 B). Die Iminoregion des $^1H,^{15}N$ -HSQC Spektrums der freien Form dieser Mutante ist in Abbildung 3.22 C gezeigt. Beim Vergleich mit dem Spektrum der freien G-Switch-RNA erkennt man, dass das Signal von G37 wie zu erwarten fehlt, da es im Zuge der Mutation durch ein Adenosin ersetzt wurde. Auch sind die Signale der Reste G32 und G38 im Spektrum der Mutante sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Mg^{2+} nicht vorhanden. Somit verhindert die G37A/C61U Mutation die Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung in der freien Form der RNA. Die Abwesenheit der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung in der Doppelmutante konnte auch durch native Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Hier ist die Laufgeschwindigkeit der Mutante gegenüber der G-Switch-RNA herabgesetzt (Abbildung 3.15 C, bildlicher Einschub), was eine geringere Kompaktheit der RNA widerspiegelt, wie es für den Fall zu erwarten ist, in dem die Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung nicht ausgebildet werden kann.

**Abbildung 3.15**

Ligandbindung und konformationelle Änderungen in der G37A/C61U Mutante. (A) Lokalisierung der Mutation in der Sekundärstruktur der Aptamerdomäne. (B) Die Mutation führt formal zum Verlust von zwei Wasserstoffbrückenbindungen einem der beiden Basenquartetts, die zwischen den Schleifen II und III ausgebildet werden. (C) Iminogruppenregion eines $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrums der G37A/C61U Mutante ohne Ligand in Gegenwart von 5 mM Mg^{2+} . Die Iminoressonanzen von G32 und G38 sind in der Mutante nicht detektierbar. Auch wird das durch Mutation eingefügte U61 nicht detektiert. Einschub: Native Gelelektrophorese der Wildtyp-RNA (links) und der G37A/C61U Mutante (rechts). (D) Überlagerung der Iminoressonanzregion von $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren der G-Switch-RNA in Komplex mit Hypoxanthin (schwarz) und der G37A/C61U Mutante in Komplex mit Hypoxanthin (rot), beide in Gegenwart von 5 mM Mg^{2+} . Iminoressonanzen des gebundenen Hypoxanthins und von Nukleotiden der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung und der Schleifen II und III sind markiert.

Die Zugabe von Hypoxanthin zur mutierten RNA in der Abwesenheit von Mg^{2+} führte zu keinen Veränderungen in ihrem NMR Spektrum. Auch waren keine Iminosignale des gebundenen Hypoxanthins zu beobachten, was zeigte, dass diese RNA in Abwesenheit von Mg^{2+} kein Hypoxanthin binden kann. Wurde jedoch die RNA in Gegenwart von 5 mM Mg^{2+} mit äquimolaren Mengen von Hypoxanthin versetzt, so erhielt man ein $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum (Abbildung 3.15 D), das dem der G-Switch-RNA in Komplex mit Hypoxanthin und in Gegenwart von Mg^{2+} sehr stark ähnelte. Wie es bereits für die G-Switch-RNA in Komplex mit Hypoxanthin beobachtet wurde, befindet sich der Komplex aus der G37A/C61U G-Switch-RNA in Komplex mit Hypoxanthin im langsamen Austausch auf der NMR-Zeitskala, was für

eine Komplexbildung von ähnlicher Stabilität spricht. Es wurden die Resonanzen der N1H1 und der N9H9 Iminogruppe des gebundenen Hypoxanthins, der Nukleotide aus der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung und von G32 und G38 mit ähnlichen chemischen Verschiebungen beobachtet, wie sie bereits für den Hypoxanthin-G-Switch-RNA-Komplex gefunden wurden. Zusätzlich wurde ein weiteres Uridinsignal beobachtet, das dem U61 zugeordnet werden konnte, welches im Zuge der C61U Mutation eingeführt wurde. In einem 2D-HNN-COSY Experiment konnte das so gebildete A37:U61 Basenpaar nachgewiesen werden und mit Hilfe von 2D-¹H,¹H-NOESY und 3D-¹H,¹H,¹⁵N-NOESY-HSQC Experimenten konnten alle weiteren Resonanzen zugeordnet werden. Somit konnte gezeigt werden, dass Ligandbindung an die G37A/C61U G-Switch-RNA in Gegenwart von Mg²⁺ nicht nur die Faltung der Ligand-bindende Drei-Wege-Kreuzung induziert, sondern auch der Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung. Lediglich für U34, das das umgekehrte U34:A65 Hoogsteen Basenpaar ausbildet, konnte kein Signal detektiert werden. Vermutlich führte die fehlende Wasserstoffbrückenbindung zwischen A37 und U34 im mutierten Basenquartett zu einer Destabilisierung, die dazu führte, dass die Iminogruppe des U34 nun im schnellen Austausch mit dem Lösungsmittel vorliegt.

Die Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung ist außerhalb des Riboswitches stabil

Aus den vorangegangenen Experimenten geht hervor, dass die Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung sich auch ohne Faltung oder Ligandbindung an die Drei-Wege-Kreuzung ausbildet. Deshalb sollte nun untersucht werden, ob diese Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung auch außerhalb der Riboswitch-RNA stabil ist. Dafür wurden zwei verschiedene RNA-Konstrukte synthetisiert, in denen die Sequenz der Helices II und III variiert wurde, die Sequenzen der Schlaufen II und III aber stets unverändert blieben und die ein Verbindungsstück enthielten, dessen Länge und Sequenz variiert wurde (Abbildung 3.16 A). Die Iminoressonanzen von G32 und U34 als auch das umgekehrte U34:A65 Hoogsteen Basenpaar wurden als Sonden für die Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung verwendet. Das für dieses umgekehrte A:U Basenpaar erwartete NOE Kreuzsignal und die Korrelation im 2D-HNN-COSY Spektrum sind in Abbildung 3.16 B schematisch abgebildet. Das hierfür verwendete Konstrukt, in dem das Verbindungsstück zwischen den beiden Helices der Wildtyp Sequenz im Guanin-bindenden Riboswitch entspricht (G-Switch-25-72-wt-RNA), wurde in ¹⁵N-G,U,C ¹³C,¹⁵N-A markierter Form durch *in vitro* Transkription synthetisiert. Das 2D-HNN-COSY Spektrum dieser RNA (Abbildung 3.16 C) zeigt deutlich eine Korrelation zwischen der Iminogruppe von U34 und dem N7 eines Adenins, wie es für die Wasserstoffbrückenbindung in einem umgekehrten A:U Hoogsteen Basenpaar zu erwarten

ist. Auch konnte das erwartete NOE Kreuzsignal zwischen der U34 Iminogruppe und dem H8 des Adenins beobachtet werden (Abbildung 3.23 D). Die Identität des H8 Signals konnte in einem $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC Experiment festgestellt werden, in dem die H8 von den H2 Signalen der Adenosine unterschieden werden konnten. Zusätzlich wurde im 1D- ^1H Spektrum von beiden Konstrukten eine Resonanz mit einer chemischen Verschiebung, die der von G32 sehr ähnlich ist, gefunden (Abbildung 3.16 E). In einem $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Experiment der G-Switch-25-72-wt-RNA konnte zuvor gezeigt werden, dass diese Resonanz einer Guanosin Iminogruppe zugeordnet werden kann. Somit konnte auch in der Abwesenheit von Helix I und einer von der Wildtyp Sequenz abweichenden Sequenz im Verbindungsstück die Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung anhand der Imino-Resonanz von G32 und dem umgekehrten U34:A65 Hoogsteen Basenpaar nachgewiesen werden, was auf sehr ähnliche Konformationen der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung in der G-Switch-25-72-wt-RNA und der G-Switch-RNA schließen lässt.

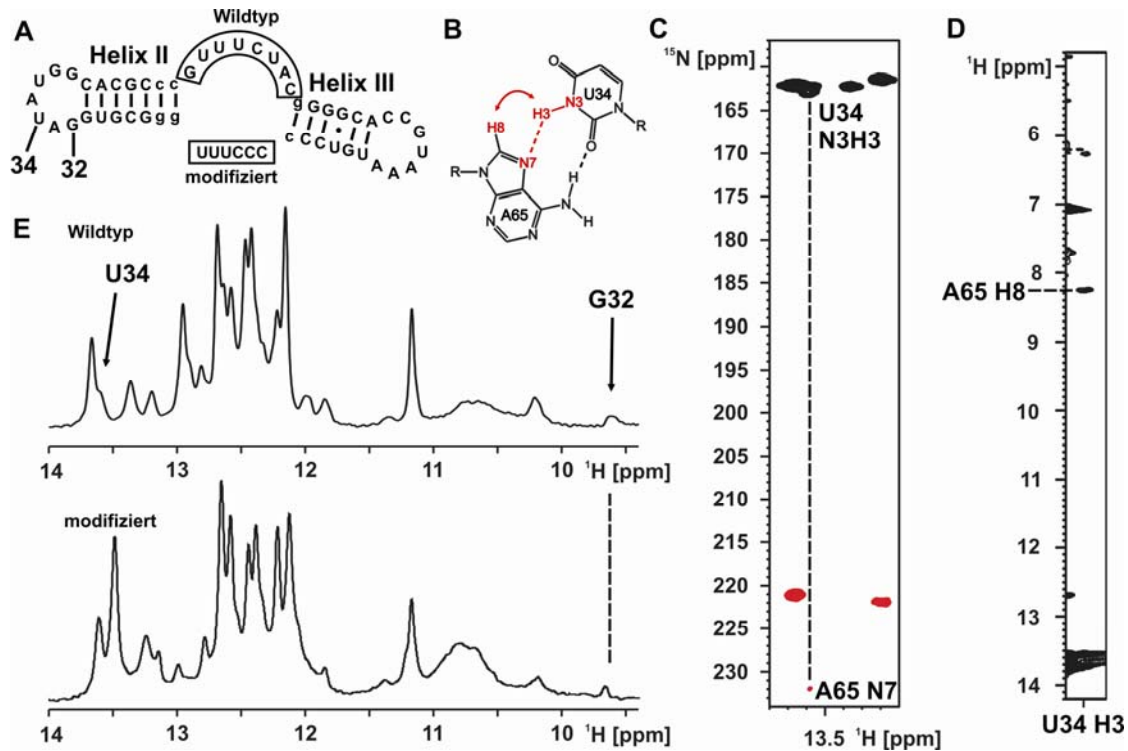


Abbildung 3.16

Die Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung außerhalb des Riboswitch-Zusammenhangs. (A) G-Switch-25-72-wt-RNA, in der die Verbindungsstücksequenz eingerahmt ist. Darunter ist die modifizierte Verbindungsstücksequenz eingerahmt dargestellt. Nukleotide, die von der Wildtyp Sequenz abweichen, sind in kleinen Buchstaben dargestellt und die Numerierung ist analog zu der Aptamerdomäne. (B) Schematische Darstellung eines umgekehrten Hoogsteen A:U Basenpaars, in dem die Wasserstoffbrückenbindung eines Uridin N3H3 zu einem Adenosin N7 durch eine rote gestrichelte Linie hervorgehoben ist und der erwartete NOE Kontakt zwischen dem Uridin H3 und dem Adenosin H8 durch einen roten Pfeil gekennzeichnet ist. (C) Ausschnitt von der U34 Iminogruppe eines 2D-HNN-COSY Spektrums der G-Switch-25-72-wt-RNA, in dem die erwartete Korrelation aufgrund der Wasserstoffbrückenbindung des umgekehrten Hoogsteen A:U Basenpaars durch eine gestrichelte Linie hervorgehoben ist. (D) Ausschnitte von der U34 Iminogruppe aus einem 2D- $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY Spektrums der G-Switch-25-72-wt-RNA, in dem der erwartete NOE Kontakt von der U34 Iminogruppe zum H8 des Adenosins in Übereinstimmung mit einem umgekehrten Hoogsteen A:U Basenpaar gekennzeichnet ist. (E) Die 1D- ^1H -Imionprotonenspektren der RNA mit Wildtyp und modifizierter Verbindungsstücksequenz zeigen beide eine Iminoresonanz für G32.

Diese Beobachtung wurde weiter durch ein Konstrukt bestätigt, das lediglich aus der Helix II (G-Switch-25-45-RNA) besteht. Für dieses Konstrukt konnten außer den NOEs von Watson-Crick Basenpaaren keine weiteren NOE-Signale beobachtet werden, die auf eine Strukturierung der Schleife II hindeuteten.

Iminoresonanzzuordnung und Tertiärstrukturelemente des A-Switch-wt-RNA-Adenin-Komplexes

In der Iminoregion eines $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrums der Aptamerdomäne des Adeninbindenden Riboswitches aus *B.subtilis* (A-Switch-wt-RNA) in Komplex mit Adenin in der Abwesenheit von Mg^{2+} sind gut aufgelöste Signale mit schmaler Linienbreite erkennbar (Abbildung 3.17 B). Das Signal der N9H9 Iminogruppe des gebundenen Adenins ist nachweisbar, was in der freien Form des Adenins nicht detektierbar ist und somit auf die Ausbildung eines hochaffinen RNA-Ligand-Komplexes in Abwesenheit von Mg^{2+} hindeutet. Die Iminoresonanzen des RNA-Adenin-Komplexes konnten mit Hilfe von 2D- $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY und 3D- $^1\text{H},^1\text{H},^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC Spektren zugeordnet werden. Die A-Switch-wt-RNA enthält 16 Guanosine und 19 Uridine (Abbildung 3.17 A). Im $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum sind Iminoresonanzen von 12 Guanosinen und 17 Uridinen detektierbar. Iminoresonanzen, die nicht zugeordnet werden konnten, gehören zu den Nukleotiden G13, G14, U36, G48, G62 und G63. Oft sind die NMR Resonanzen von terminalen Nukleotiden in RNA-Helices wegen ihrer geringeren Stabilität und dem daraus resultierenden schnellen Austausch ihrer Iminoprotonen mit dem Lösungsmittel nicht nachweisbar. Die Iminogruppen der Nukleotide U36, G48, G62 und G63 sind laut der Röntgenstruktur des Komplexes (Serganov et al., 2004) dem Lösungsmittel exponiert und dadurch auch nicht nachweisbar.

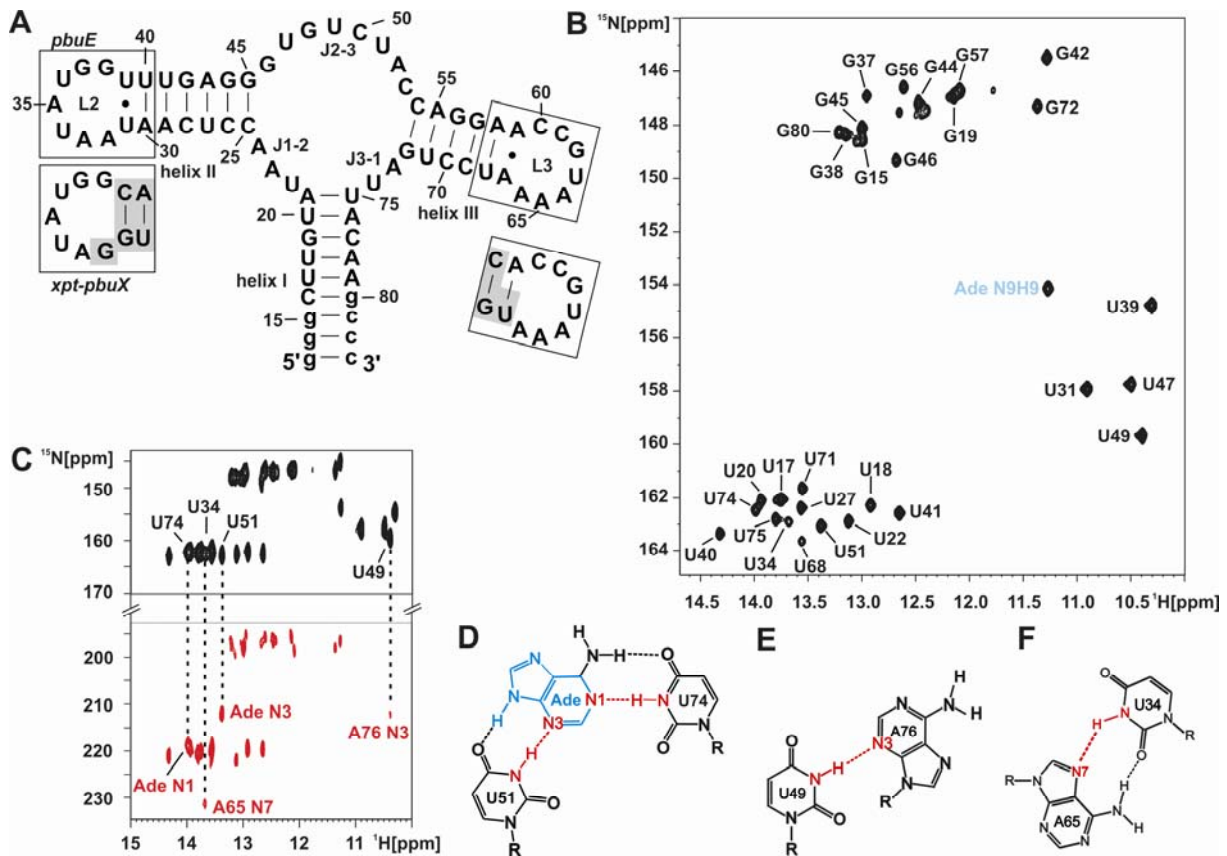


Abbildung 3.17

Imine resonanzzuordnung des Komplexes aus der Aptamerdomäne des *pbuE* Adenin-bindenden Riboswitches aus *B.subtilis* gebunden mit Adenin. (A) Sekundärstruktur der A-Switch-wt-RNA in der die Schleifen II und III eingerahmt sind. Die Sequenzen der Schleifen II und III für den *xpt-pbuX* Guanin-bindenden Riboswitch aus *B.subtilis* sind unterhalb eingerahmt dargestellt. Nukleotide, die sich im Vergleich zum Adenin-bindenden Riboswitch unterscheiden, sind grau hinterlegt. (B) Imino-region eines $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrums der A-Switch-wt-RNA in Komplex mit Adenin mit Imino-resonanzzuordnung in der Abwesenheit von Mg^{2+} . Die Imino-resonanz des Adenins ist in blau markiert. (C) 2D-HNN-COSY Spektrum des Adenin-RNA-Komplexes in Abwesenheit von Mg^{2+} . Die Korrelationen von intermolekularen und ausgewählten an Tertiärstrukturen beteiligte Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien hervorgehoben. Schematische Darstellung des Basentripels, durch das das gebundene Adenin von U74 und U51 erkannt wird (D), die Wechselwirkung zwischen U49 und A76 (E) und das umgekehrte weitreichende Hoogsteen A65:U34 Basenpaar (F). Alle Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien dargestellt und die Wasserstoffbrückenbindungen, die in (C) hervorgehoben sind, sind rot gefärbt. Das gebundene Adenin ist in blau dargestellt.

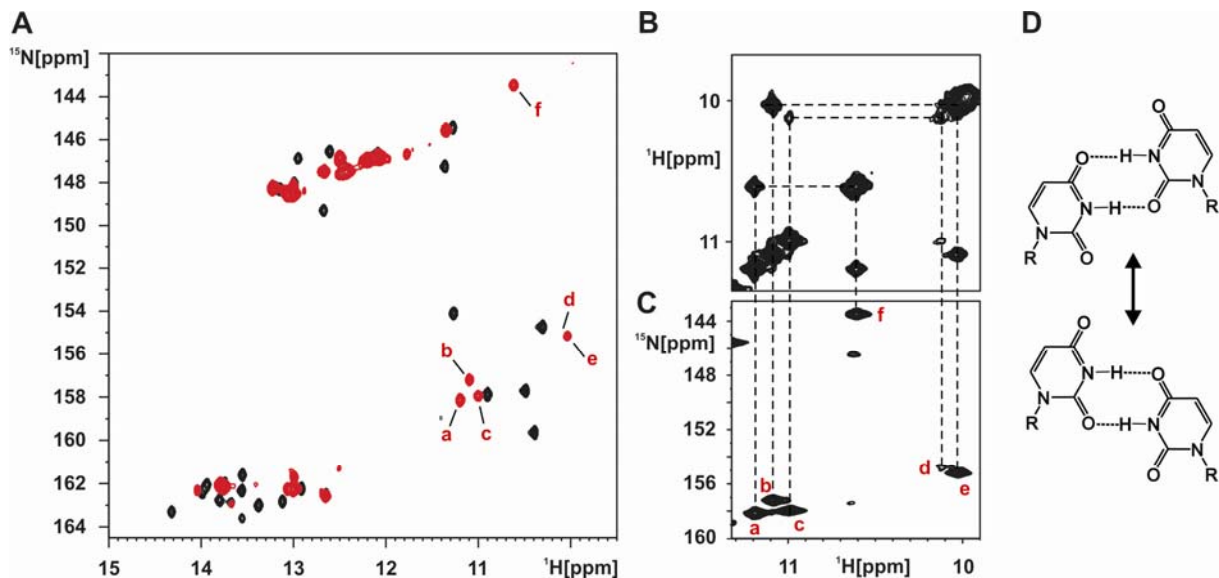
Charakteristische Tertiärstrukturelemente können in einem 2D-HNN-COSY Experiment (Dingley und Grzesiek, 1998) untersucht werden, in dem Wasserstoffbrückenbindungen des Typs $\text{N-H}\cdots\text{N}$ nachgewiesen werden. Das HNN-COSY Spektrum der A-Switch-wt-RNA in Komplex mit Adenin zeigt neben Korrelationen kanonischer Basenpaarungen und den oben beschriebenen intermolekularen Korrelationen, die den Bindungsmechanismus von Adenin an die RNA beschreiben, Korrelationen von einigen nicht-kanonischen Basenpaarungen. Die

Iminogruppe des U49 zeigt eine Korrelation zu dem N3 eines Adenosins, was anhand seiner chemischen Verschiebung zugeordnet werden konnte (Abbildung 3.17 C). Dies stimmt überein mit einer Wasserstoffbrückenbindung der Iminogruppe von U49 und dem N3 von A76, die in der Röntgenstruktur des Komplexes beobachtet wurde (Serganov et al., 2004) (Abbildung 3.17 E). Des Weiteren zeigt die Iminogruppe von U34 eine Korrelation zu einem Adenosin N7 (Abbildung 3.17 C), wie es für das umgekehrte Hoogsteen A65:U34 Basenpaar zu erwarten ist (Wöhnert et al., 1999), das in der Röntgenstruktur beobachtet wurde (Abbildung 3.17 F). NOE-Daten und chemische Verschiebungsargumente der C2 und C4 Carbonylgruppen von U31 und U39 deuten darauf hin, dass diese Nukleotide in Übereinstimmung mit der Röntgenstruktur ein asymmetrisches U:U Basenpaar ausbilden (Ohlenschläger et al., 2004).

Die Anzahl der beobachteten Iminoressonanzen, die erhaltene Zuordnung, die beobachteten intra- und intermolekularen NOEs, der oben beschriebene Bindungsmechanismus erhalten aus 2D-HNN-COSY Experimenten und die nicht-kanonischen Basenpaarungen in Tertiärstrukturelementen sind deutliche Beweise, dass die Tertiärstruktur der Aptamerdomäne des Adenin-bindenden Riboswitches gebunden an Adenin in Lösung in Abwesenheit von Mg^{2+} identisch ist mit der publizierten Röntgenstruktur, die in Gegenwart von hohen Mg^{2+} -Konzentrationen erhalten wurde. Demzufolge ist weder die Ligandbindung noch die korrekte Faltung dieses RNA-Ligand-Komplexes abhängig von Mg^{2+} -Ionen.

Heterogenität in der freien Form der A-Switch-wt-RNA

Das $^1H,^{15}N$ -HSQC Spektrum der freien Form der A-Switch-wt-RNA in Abwesenheit von Metallionen zeigt Iminoressonanzen, die breit sind und unterschiedliche Intensitäten haben (Abbildung 3.18 A). Im Vergleich zu der Adenin-gebundenen Form sind deutlich weniger Signale in der freien Form zu beobachten. Die Signale für die Nukleotide U20, U22, G45, G46, U47, U49, U51, U71, G72, U74 und U75, die in der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung und an den Enden der Helices liegen, die zur Drei-Wege-Kreuzung zeigen, sind nicht detektierbar. Dies ist ein Anzeichen, dass keine stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Nukleotiden der Drei-Wege-Kreuzung vorhanden sind und somit die Ligand-bindende Drei-Wege-Kreuzung nicht geordnet ist. Des Weiteren ist das Signal von G38 nicht nachweisbar und die Signale von G37 und U34 sind nur sehr schwach. Da diese Nukleotide in Schlaufe II liegen, deutet dies darauf hin, dass die Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung in der freien Form der A-Switch-wt-RNA stark destabilisiert ist. Demzufolge liegt nur ein kleiner Teil der RNA in einer Konformation vor, in der die Schlaufen II und III interagieren. Der Großteil der RNA liegt der Großteil der RNA in einer vollständig offenen Konformation vor.

**Abbildung 3.18**

Die Konformation der freien A-Switch-wt-RNA in Abwesenheit von Mg^{2+} . (A) Überlagerung der Iminoresonanzen der $^1H, ^{15}N$ -HSQC Spektren der freien (rot) und der Adenin-gebundenen (schwarz) A-Switch-wt-RNA in Abwesenheit von Mg^{2+} . Iminoresonanzen von fünf Uridinen (a-e) und einem Guanonsin (f), deren Iminogruppen an nicht-kanonischen Basenpaarungen in der freien Form der A-Switch-wt-RNA beteiligt sind, sind mit roten Buchstaben markiert. (B und C) Ausschnitte aus einem 2D- $^1H, ^1H$ -NOESY Spektrum (B) der freien Form der A-Switch-wt-RNA und der entsprechende Bereich aus einem $^1H, ^{15}N$ -HSQC Spektrum (C). Iminoresonanzkorrelationen sind im 2D- $^1H, ^1H$ -NOESY Spektrum mit gestrichelten Linien eingezeichnet und ihre Identität ist anhand des entsprechenden Bereiches im $^1H, ^{15}N$ -HSQC Spektrum (C) erkennbar. (D) Zwei unterschiedliche Konformationen, die ein U:U Basenpaar einnehmen kann.

Neben den Iminoresonanzen von Nukleotiden, die in stabile Watson-Crick Basenpaarungen in den zentralen Teilen der Helices lokalisiert sind, sind Resonanzen von fünf Uridinen und einem Guanosin erkennbar, die an nicht-kanonischen Basenpaarungen beteiligt sind. Aufgrund von NOEs zwischen diesen Iminoresonanzen (Abbildung 3.18 B) und ihren chemischen Verschiebungen in $^1H, ^{15}N$ -HSQC Spektren (Abbildung 3.18 C) kann die Ausbildung von zwei asymmetrischen U:U Basenpaaren und einem G:U Basenpaar in der freien Form der RNA angenommen werden. Allerdings wird in der Röntgenstruktur des Adenin-gebundenen Komplexes der RNA nur ein U:U Basenpaar (U31:U39) beobachtet und es gibt keine Hinweise auf ein stabiles G:U Basenpaar. Somit stellt das zweite U:U Basenpaar und das G:U Basenpaar ein alternatives Basenpaarungsmuster dar, das ausschließlich in der freien Form der A-Switch-wt-RNA beobachtet wird und durch die Bindung des Liganden aufgelöst wird. Ob diese alternativen Basenpaarungen in den Schleifen II und III oder in der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung auftreten, kann aufgrund fehlender NOEs zu anderen Iminogruppen nicht eindeutig bestimmt werden. Auch kann das zweite U:U Basenpaar von einer alternativen Konformation des U:U Basenpaares zwischen U31 und U39 (Abbildung 3.18 D) oder von einer weiteren weitreichenden U:U Basenpaarung herrühren. In diesem Fall

sollten theoretisch für das zweite U:U Basenpaar Austauschkreuzsignale der Iminogruppen detektierbar sein. Da jedoch die ^1H und die ^{15}N chemischen Verschiebungen der beiden Uridine sehr ähnlich sind, würden ihre Kreuzsignale von den starken Diagonalsignalen in 2D- $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY Experimenten und ^{15}N -ZZ-Austauschexperimenten (Hud et al., 1999) verdeckt werden. Mg^{2+} Titrationsexperimente an der freien Form der A-Switch (siehe unten) deuten jedoch darauf hin, dass die alternativen U:U und G:U Basenpaare sich im Bereich der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung formieren und damit mit der Ausbildung der korrekten weitreichenden Basenpaarungen zwischen den Schlaufen II und III konkurrieren.

Mg^{2+} -induzierte Konformationsänderungen in der freien Form der A-Switch-wt-RNA

Die freie Form der Aptamerdomäne des Adenin-bindenden Riboswitches wurde mit Mg^{2+} titriert und die Änderungen der Iminogruppensignale wurden in einem $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum verfolgt. Die Anzahl der Signale nahm im Laufe der Titration ab und die Signale erreichten vergleichbare Intensitäten in der Gegenwart von 5 mM Mg^{2+} (Abbildung 3.19 A). Im Verlauf der Titration erscheint das Signal für G38 und die Intensität der Signale für G37 und U34 nimmt dramatisch zu. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen die Ausbildung der weitreichenden Basenpaarungen zwischen den Schlaufen II und III hervorruft. Die Signale für die Nukleotide G37 und G38 ändern kontinuierlich ihre chemische Verschiebung mit steigenden Mg^{2+} -Konzentrationen. Das zeigt, dass Mg^{2+} das schnelle Gleichgewicht zwischen offenen Konformationen ohne ausgebildete Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung und geschlossenen Konformationen stark zu Gunsten einer geschlossenen Konformation verschiebt, in der eine stabile Interaktion zwischen den Schlaufen II und III auftritt.

Gleichzeitig führt die schrittweise Zugabe von Mg^{2+} -Ionen zum Verschwinden der Iminoresonanzen des nicht-kanonischen G:U Basenpaars und des einen der beiden U:U Basenpaare, wohingegen die Iminoresonanzen des anderen U:U Basenpaars ihre chemischen Verschiebungen hin zu denen des U31:U39 Basenpaars in der Adenin-gebundenen Form in Gegenwart von Mg^{2+} ändern. Somit führt die Mg^{2+} -induzierte Ausbildung der stabilen, ‚nativen‘ Schlaufen-Schlaufen-Interaktion direkt zur Dissoziation der alternativen Basenpaarungen, die in der freien Form der A-Switch-wt-RNA in Abwesenheit von Mg^{2+} beobachtet wurden. Diese Daten zeigen, dass das Ensemble von schnell ineinander übergehenden Konformationen in Abwesenheit von Mg^{2+} in der freien Form der RNA zu einer homogenen Konformation in der Gegenwart von Mg^{2+} konvergieren, in der die Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung ausgebildet ist.

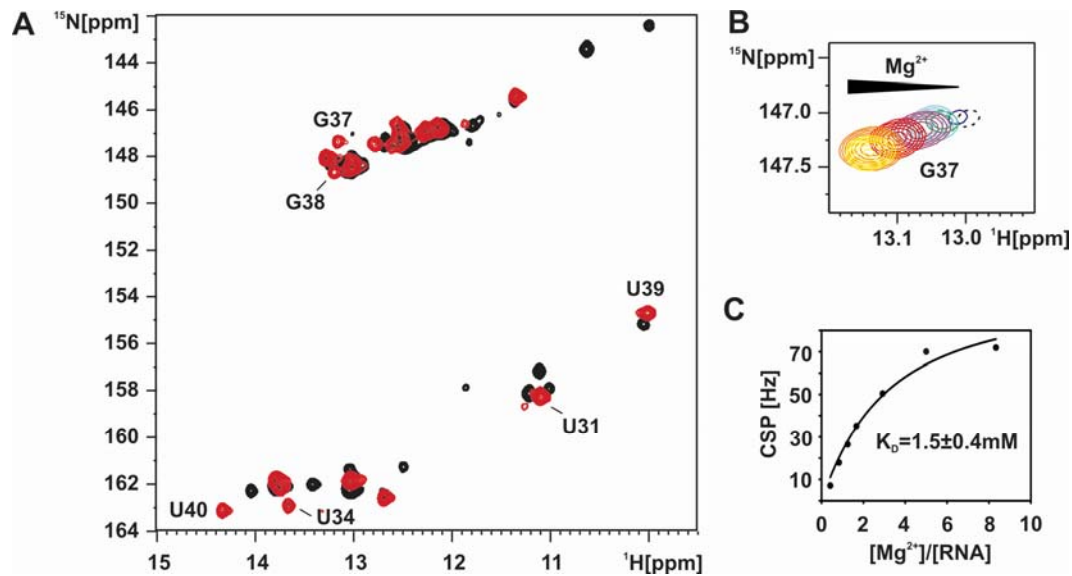


Abbildung 3.19

Mg²⁺-induzierte Faltung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung in der freien Form der A-Switch-wt-RNA. (A) Überlagerung der Iminoregion von ¹H,¹⁵N-HSQC Spektren der freien (schwarz) und der Mg²⁺-gebundenen (rot) Form der A-Switch-wt-RNA. (B) ¹H,¹⁵N-HSQC Spektrum der Iminogruppe von G37 während einer Mg²⁺ Titration. Die Titrationsschritte sind 0 mM (schwarz), 0,25 mM (blau), 0,5 mM (grün), 0,75 mM (hellblau), 1 mM (violett), 1,75 mM (rot), 3 mM (orange) und 5 mM (gelb). Die Resonanz von G37 bei 0 mM Mg²⁺ ist durch eine gestrichelte Linie dargestellt, da sie auf einer niedrigeren Ebene eingezeichnet ist, als alle anderen Titrationsschritte. (C) Die chemische Verschiebungsänderung der Iminogruppenresonanz von G37 ist aufgetragen gegen das Verhältnis von [Mg²⁺]/[RNA]. Die Kurve, die die Titrationsschritte nach nicht linearer Regression am besten beschreibt, ist eingezeichnet. Die daraus erhaltene Bindungskonstante (K_D) von Mg²⁺ an G37 ist 1,5 mM ± 0,4 mM.

Unter Verwendung der schrittweisen Änderung der chemischen Verschiebung der Iminogruppe von G37 im Laufe der Mg²⁺-Titration konnte die Dissoziationskonstante von Mg²⁺ an die Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung bestimmt werden (Abbildung 3.19 B). Die Iminoresonanz von G37 nimmt stark an Intensität zu und ändert ihre chemische Verschiebung im Laufe der Titration um bis zu 0,15 ppm in ¹H und 0,35 ppm in ¹⁵N. Diese Beobachtung ist durch die schnelle Assoziation und Dissoziation des Komplexes von Mg²⁺ und RNA zu erklären. Durch die Korrelation der chemischen Verschiebungsänderung mit dem Verhältnis von [Mg²⁺]/[RNA] für jeden Titrationsschritt erhält man eine Sättigungskurve, anhand derer nach nichtlinearer Regression eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante von Mg²⁺ an die Schlaufe II von 1,5 mM ± 0,4 mM bestimmt wurde (Abbildung 3.19 C).

Interessanterweise führten Titrationsen der freien A-Switch-wt-RNA mit Co(NH₃)₆³⁺ zu dem gleichen Ergebnis im Hinblick auf die Ausbildung der nativen Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung und der Destabilisierung des alternativen Basenpaarungsmusters. Demzufolge ruft Mg²⁺ die Faltung dieser RNA in seine native Konformation ausschließlich durch Ausbildung von Kontakten mit der äußeren Ligandensphäre (*outer-sphere*) hervor, die durch die an Mg²⁺ koordinierten Wassermoleküle beschrieben wird.

Eine Mutation stabilisiert die Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung in der freien Form

Eine stabilisierende Mutation in Helix II wurde konstruiert, um den Effekt einer Stabilisierung der Helix II auf die Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung in der freien Form der *pbuE* Adenin-bindenden Riboswitch-RNA zu untersuchen. In dieser A30G/U40C Doppelmutante (A-Switch-RNA) ist das A30:U40 Basenpaar neben dem U31:U39 Basenpaar durch ein stabileres G:C Basenpaar ersetzt. Der *xpt-pbuX* Guanin-bindende Riboswitch trägt genau wie der *pbuE* Adenin-bindende Riboswitch ein U:A Basenpaar an der Position 30:40. Jedoch trägt der *xpt-pbuX* Guanin-bindende Riboswitch im benachbarte Basenpaar, das der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung zugewandt ist, ein stabiles kanonisches G:C Basenpaar und nicht ein instabileres nicht-kanonisches U:U Basenpaar wie im Fall des *pbuE* Adenin-bindenden Riboswitches (Abbildung 3.13 B und 3.20). Die A-Switch-RNA bindet den Liganden Adenin auf identische Weise wie die A-Switch-wt-RNA (Noeske et al., 2005).

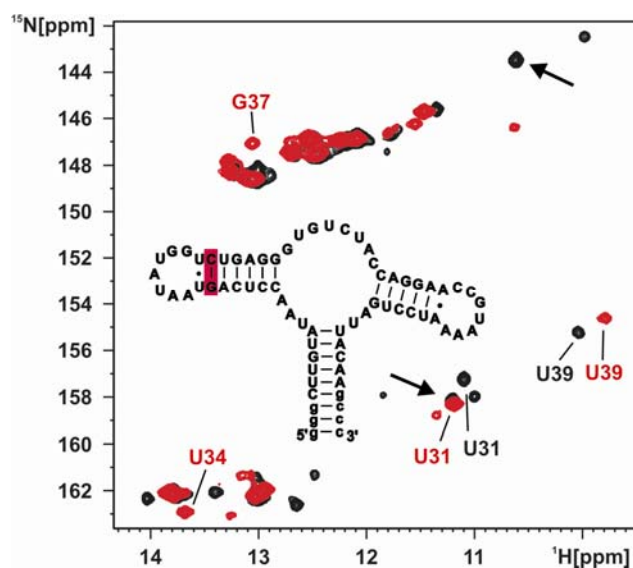


Abbildung 3.20

Eine Mutation stabilisiert die Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung in der freien Form der Adenin-bindenden Riboswitch-RNA. Überlagerung der Imingruppenregion eines ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrums der freien Form der A-Switch-wt-RNA (schwarz) und der A30G/U40C Doppelmutante (rot), beide in Abwesenheit von Mg^{2+} . Resonanzen der Nukleotide G37 und U34 sind in der Wildtyp-RNA kaum detektierbar im Gegensatz zu der Doppelmutanten-RNA. In der Doppelmutanten-RNA sind nur zwei Resonanzen für die Imingruppen des U:U Basenpaars detektierbar und die Resonanzen der G:U Basenpaare (Pfeile) sind nicht detektierbar. Die Sekundärstruktur der A30G/U40C Doppelmutante ist schematisch dargestellt. Das mutierte Basenpaar ist rot hinterlegt.

Das Imingruppen ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum der freien Form der A-Switch-RNA zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich zu dem der A-Switch-wt-RNA. Für die A-Switch-RNA

sind die Iminoresonanzen der Nukleotide G37 und U34, die in der Schlaufe II liegen und weitreichende Basenpaarungen mit Nukleotiden der Schlaufe III eingehen, bereits in der freien Form detektierbar mit chemischen Verschiebungen ähnlich zu denen in der Adenin-gebundenen Form der RNA. Des Weiteren ist lediglich ein U:U Basenpaar zu beobachten, das dem U31:U39 Basenpaar entspricht. Auch können keine Signale für das G:U Basenpaar gefunden werden, das in der freien Form der A-Switch-wt-RNA auftrat (Abbildung 3.20). Diese Daten zeigen, dass die A-Switch-RNA im Gegensatz zur A-Switch-wt-RNA bereits in der freien Form in der Abwesenheit von Mg^{2+} eine stabile Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung ausbildet.

3.4 Kationbindungsstellen in Purin-Riboswitch Aptamerdomänen

Positiv geladene Metallionen gehen neben einer diffusen Wechselwirkung spezifische Bindungen mit dem Polyanion RNA ein. Die spezifische Bindung von Metallionen an RNA kann über die RNA-Iminogruppenresonanzen nachgewiesen werden und mit der Zuordnung der RNA-Iminogruppenresonanzen können die Bindungsstellen von Metallionen im RNA-Molekül bestimmt werden. Im Folgenden werden die Bindungsstellen von Metallionen an die Aptamerdomänen des Guanin- und des Adenin-bindenden Riboswitches bestimmt.

Bindungsstellen zweiwertiger Kationen im Adenin-A-Switch-wt-RNA-Komplex

Es wurden drei unterschiedliche, sich ergänzende Methoden angewandt, um die Bindung von zweiwertigen Metallionen an den Komplex aus A-Switch-wt-RNA gebunden an Adenin zu charakterisieren und um mögliche, daraus resultierende strukturelle Effekte in Lösung mit NMR zu analysieren. Zunächst wurden die Änderungen der chemischen Verschiebung von Iminogruppenresonanzen bei Titration mit Mg^{2+} untersucht, die durch Wechselwirkungen der Metallionen mit dem RNA-Komplex hervorgerufen werden. Zweitens wurde Mn^{2+} als paramagnetisches Mg^{2+} -Analogon eingesetzt, um paramagnetische Linienverbreiterungen der NMR-Signale von Iminogruppen zu beobachten, die sich räumlich nahe zu der vermeintlichen zweiwertigen Metallionenbindungsstelle befinden. Drittens wurde $Co(NH_3)_6^{3+}$, das ein Analog von hexahydratisierten Mg^{2+} -Ionen ist, eingesetzt, um anhand von chemischen Verschiebungsänderungen und NOE-Experimenten Iminogruppen ausfindig zu machen, die räumlich nahe an vermeintlichen zweiwertigen Metallionenbindungsstellen liegen.

Die Aptamerdomäne der Adenin-bindende Riboswitch-RNA in Komplex mit Adenin wurde mit Mg^{2+} titriert und die Iminoresonanzen wurden in einem $^1H,^{15}N$ -HSQC der Iminogruppen beobachtet (Abbildung 3.21 A). Die Anzahl der Iminoresonanzen bleibt unverändert und keine großen Änderungen ihrer chemischen Verschiebung treten auf. Das ist ein Anzeichen dafür, dass die globale Struktur des Komplexes bei Zugabe von Mg^{2+} unverändert bleibt und dass keine neuen strukturellen Elemente ausgebildet werden. Während manche Iminoresonanzen keine oder nur kleine chemische Verschiebungsänderungen zeigen, erfahren andere Resonanzen signifikante Änderungen ihrer chemischen Verschiebung nach Zugabe von 5 mM Mg^{2+} zum Adenin-RNA-Komplex. Solche signifikante chemische Verschiebungsänderungen werden für U22, G37, G38, U39, U47, U71 und die N9H9 Iminogruppe des gebundenen

Adenins beobachtet. Wenn diese Iminogruppen, die durch Mg^{2+} -Bindung beeinflusst werden, in der Röntgenstruktur des Komplexes hervorgehoben werden, werden vier klar definierte Regionen sichtbar (Abbildung 3.22 A). G37 und G38 sind in Schleife II lokalisiert und durch Ausbildung weitreichender Watson-Crick Basenpaarungen mit C61 und C60 in Schleife III an der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung beteiligt. U39 liegt an der apikalen Spitze der Helix II, U71 ist am unteren Ende der Helix III positioniert und zeigt somit zur zentralen Drei-Wege-Kreuzung. U22, U47 und das N9H9 des gebundenen Adenins gruppieren sich alle an der Schnittstelle zwischen RNA und dem gebundenen Liganden.

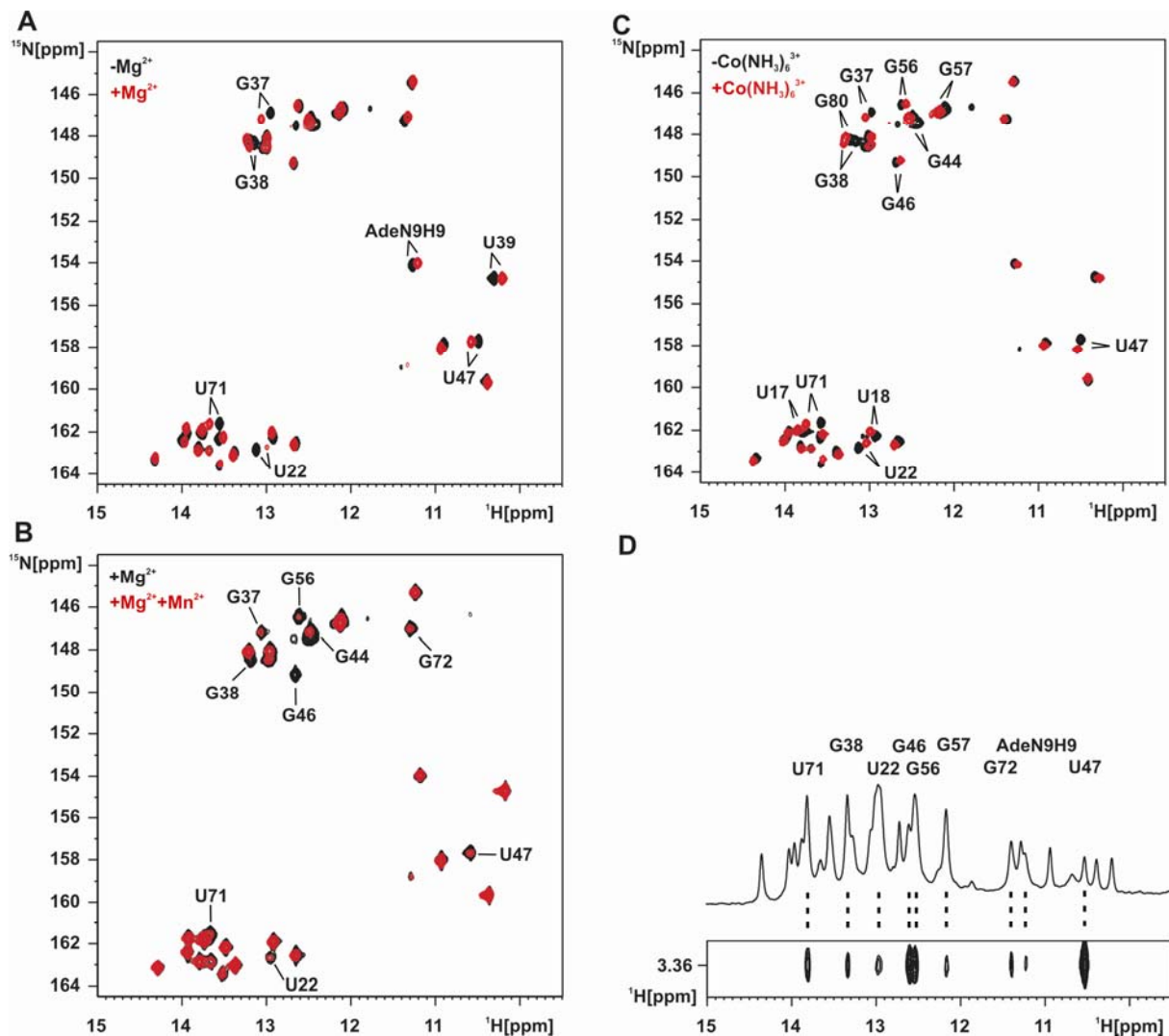


Abbildung 3.21

Bindung von divalenten Metallkationen an den A-Switch-wt-Adenin-Komplex. (A) Überlagerung der Iminoregionen der $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren der A-Switch-wt-RNA in Komplex mit Adenin in der Abwesenheit von Mg^{2+} (schwarz) und in der Anwesenheit von $5\text{ mM } Mg^{2+}$ (rot). Iminoresonanzen, die chemische Verschiebungsänderungen von $>0,05\text{ ppm}$ in ^1H oder $>0,4\text{ ppm}$ in ^{15}N bei der Zugabe von $5\text{ mM } Mg^{2+}$ zeigen, sind markiert. (B) Überlagerung der Iminoregionen der $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren der A-Switch-wt-RNA in Komplex mit Adenin und $5\text{ mM } Mg^{2+}$ in der Abwesenheit von Mn^{2+} (schwarz) und in

der Anwesenheit von 15 μM Mn^{2+} (rot). Iminoresonanzen, die Mn^{2+} -induzierte Linienverbreiterung zeigen, sind markiert. (C) Überlagerung der Iminoregionen der $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren der A-Switch-wt-RNA in Komplex mit Adenin in der Abwesenheit von $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ (schwarz) und in der Anwesenheit von 3 mM $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ (rot). Iminoresonanzen, die chemische Verschiebungsänderungen von $>0,05$ ppm in ^1H oder $>0,4$ ppm in ^{15}N bei der Zugabe von 3 mM $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ zeigen, sind markiert. (D) Iminoregion eines $1\text{D-}^1\text{H}$ Spektrums der A-Switch-wt-RNA in Komplex mit Adenin in Gegenwart von 5 mM $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ (oben) und ein Ausschnitt aus einem $2\text{D-}^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY Spektrum mit den intermolekularen Kreuzsignalen des $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ und der RNA bzw. dem gebundenen Adenin (unten). Resonanzen der Iminogruppen der RNA und des gebundenen Adenins, die intermolekulare Kontakte zu den $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ Protonen zeigen, sind markiert.

Die Bindung von paramagnetischem Mn^{2+} -Ionen erhöht in der Umgebung der Bindungsstelle mit einer Abstandsabhängigkeit von r^{-6} die Spinrelaxation (Bertini und Luchinat, 1986) und führt dadurch zur Linienverbreiterung der Resonanzen. Es werden nur mikromolare Konzentrationen von Mn^{2+} benötigt, um diesen Effekt zu induzieren (Allain und Varani, 1995; Butcher et al., 2000; Feigon et al., 2001; Hurd et al., 1979). Im RNA-Adenin-Komplex in Gegenwart von 5 mM Mg^{2+} zeigen die Iminoresonanzen von U22, G37, G38, G44, G46, U47, G56, U71 und G72 eine signifikante Linienverbreiterung nach Titration mit 15 μM Mn^{2+} (Abbildung 3.21 B). Demzufolge wird bei allen Resonanzen, bei denen eine signifikante chemische Verschiebungsänderung im Zuge der Mg^{2+} -Titration beobachtet wurde, außer U39 und der N9H9 Gruppe des gebundenen Adenins, auch eine Mn^{2+} -induzierte Linienverbreiterung der Signale beobachtet. Von den vier Resonanzen, die eine Linienverbreiterung aber keine chemische Verschiebungsänderung zeigen, ist G56 und G72 nahe bei U71 gelegen, was sowohl durch Mg^{2+} als auch durch Mn^{2+} beeinflusst wird. Auch G46, für das nur eine Linienverbreiterung beobachtet wurde, ist benachbart zu U47, das sensitiv auf beide Ionen reagiert. Vier definierte Regionen werden sichtbar, wenn die Iminogruppen, die Mn^{2+} -induzierte Linienverbreiterung zeigen, in der Röntgenstruktur hervorgehoben werden (Abbildung 3.22 B). Drei dieser Regionen wurden zuvor im Mg^{2+} Titrationsexperiment identifiziert. Diese Regionen liegen nahe bei G37 und G38, die an der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung beteiligt sind, in der Mitte von Helix III (U71, G56, G72) und in der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung (U22, G46 und U47). G44, das in der unteren Hälfte von Helix II lokalisiert ist, zeigt keine Mg^{2+} -induzierte chemische Verschiebungsänderung und ist auch nicht räumlich nahe zu anderen Iminogruppen gelegen, die durch die Gegenwart von entweder Mg^{2+} oder Mn^{2+} beeinflusst werden.

Die Geometrie von $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ ist ähnlich der von hexahydratisierten Mg^{2+} -Ionen ($\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$). Allerdings ist seine Ligandensphäre – die sechs koordinativ gebundenen Aminogruppen – inert gegen den Austausch mit dem Lösungsmittel oder den Ersatz einer dieser Aminogruppen durch eine funktionelle Gruppe der RNA. Im Gegensatz zu hydratisiertem Mg^{2+} können deshalb keine direkten, intermolekularen Wechselwirkungen zwischen dem Metallion und funktionellen Gruppen der RNA ausgebildet werden (Cowan, 1993). Alle Wechselwirkungen zwischen dem $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ -Ion und der RNA werden deshalb durch

Wechselwirkungen zwischen funktionellen Gruppen der RNA und den Aminogruppen der Ligandensphäre vermittelt.

Um die Magnesiumbindungsstudien zu ergänzen, wurde der Adenin-RNA-Komplex mit $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ titriert. Genau wie bei der Mg^{2+} Titration des Komplexes bleibt die globale Konformation des RNA-Ligand-Komplexes erhalten und keine weiteren strukturellen Elemente werden ausgebildet, wie anhand der unveränderten Anzahl der detektierbaren Iminogruppen hervorgeht. In einem $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum zeigten die Iminogruppen von U17, U18, U22, G37, G38, G44, G46, U47, G56, G57, U71 und G80 eine signifikante chemische Verschiebungsänderung durch die Zugabe von 3 mM $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ (Abbildung 3.21 C).

Die Bindungsstelle von $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ an den Adenin-RNA-Komplex kann neben der Untersuchung der chemischen Verschiebungsänderungen der Iminogruppen auch durch intermolekulare NOEs zwischen den Protonen der NH_3 -Gruppe des $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ und den Protonen der RNA bestimmt werden. $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, im Gegensatz zu $\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$, kann für solche NMR Experimente verwendet werden, da die Protonen der Aminoliganden von $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ nur langsam mit dem Lösungsmittel austauschen und dadurch mit NMR detektierbar sind. Ein 2D- $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY Spektrum des Adenin-RNA-Komplexes in Gegenwart von 5 mM $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ wurde aufgenommen. Hier wurden intermolekulare NOEs von den Protonen des $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ zu den Iminogruppen von U22, G38, G46, G47, G56, G57, U71, G72 und dem N9H9 des gebundenen Adenins gefunden (Abbildung 3.21 C). Alle Iminogruppen, deren Resonanzlinien durch Mn^{2+} -Zugabe verbreitert wurden, zeigen entweder eine signifikante chemische Verschiebungsänderung nach Zugabe von 3 mM $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ oder haben einen intermolekularen NOE in Gegenwart von 5 mM $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$. G57, das NOEs und chemische Verschiebungsänderungen mit $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ zeigt, aber nicht von Mn^{2+} beeinflusst ist, liegt in der Mitte von Helix III in der Nähe von G56, U71 und G72, die alle sowohl durch $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ als auch durch Mn^{2+} beeinflusst werden. Auch das N9H9 des gebundenen Adenins, das einen NOE zu $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ hat und Mg^{2+} -induzierte chemische Verschiebungsänderung zeigt, aber keine Linienverbreiterung durch Mn^{2+} , liegt in der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung und damit nahe zu U22, G46 und G47. Die Iminoressonanzen von U17, U18 und G80 in Helix I zeigen nur eine Änderung der chemischen Verschiebung in der Gegenwart von $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ nicht aber in der Gegenwart von Mg^{2+} und auch keine Mn^{2+} -induzierte Linienverbreiterung.

Durch Hervorheben der Iminogruppen in der Röntgenstruktur, die chemische Verschiebungsänderungen und intermolekulare NOEs in Gegenwart von $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ zeigen, werden fünf klar abgegrenzte $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ Bindungsstellen im Adenin-A-Switch-wt-Komplex deutlich (Abbildung 3.22 C).

Drei dieser Bindungsstellen wurden zuvor in den Mg^{2+} - und den Mn^{2+} -Experimenten identifiziert. Sie sind in der Nähe von G37 und G38 in der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung, in der Mitte der Helix III (U71, G56 und G72) und in der Ligand-bindenden

Drei-Wege-Kreuzung gelegen. Dies kann besser veranschaulicht werden, wenn nur die Iminogruppen, die durch alle drei Ionen, Mg^{2+} , Mn^{2+} und $Co(NH_3)_6^{3+}$ beeinflusst werden, in der Röntgenstruktur hervorgehoben werden (Abbildung 3.22 D).

Eine Bindungsstelle in der Mitte der Helix II kann nur in Mn^{2+} Experimenten und durch $Co(NH_3)_6^{3+}$ -induzierte chemische Verschiebungsänderungen bestimmt werden.

Die Röntgenstruktur der Aptamerdomäne des *add* Adenin-bindenden Riboswitches in Komplex mit Adenin zeigt fünf gebundene hexahydratisierte Mg^{2+} -Ionen (Mg1 bis Mg5, Nomenklatur der Mg Atome in Anlehnung an (Serganov et al., 2004)) (Abbildung 3.22 D). Eine der Mg^{2+} -Bindungsstellen (Mg3) ist an Kristallpackungswechselwirkungen beteiligt. Mg1 bindet in der Röntgenstruktur an Nukleotide von J2-3 und ans untere Ende von Helix II in der Nähe von U22 und U47. U22 und U47 wurden in allen oben beschriebenen Experimenten als zweiwertige Metallbindungsstelle in Lösung identifiziert. Mg2 bindet in der Nähe von U71 in Helix II an den Adenin-RNA-Komplex und wurde als eine Konsensusbindungsstelle in Lösung identifiziert. Eine zweiwertige Metallbindungsstelle am unteren Ende von Helix II, die Mg4 in der Röntgenstruktur entsprechen würde, konnte nur durch Mn^{2+} -induzierte Linienverbreiterung und in $Co(NH_3)_6^{3+}$ Titrations (G44) beobachtet werden. Demnach bindet dieses Mg^{2+} -Ion möglicherweise nur schwach.

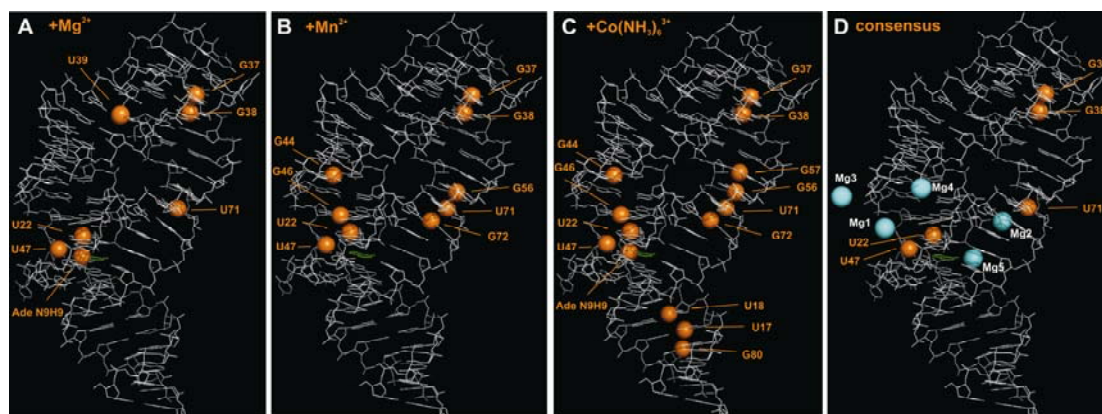


Abbildung 3.22

Divalente Metallionenbindungsstellen in Lösung sind in der Röntgenstruktur des nah verwandten *add* Adenin-bindenden Riboswitches von *V.vulnificus* in Komplex mit Adenin hervorgehoben. (A) Iminogruppen, die eine chemische Verschiebungsänderung bei Zugabe von Mg^{2+} zeigen (Abb 3.28 A), sind als orange Kugeln dargestellt. (B) Iminogruppen, die Mn^{2+} -induzierte Linienverbreiterung bei Zugabe von Mn^{2+} zeigen (Abb 3.28 B), sind als orange Kugeln dargestellt. (C) Iminogruppen, die eine chemische Verschiebungsänderung bei Zugabe von $Co(NH_3)_6^{3+}$ (Abb 3.28 C) und Iminogruppen, die intermolekulare NOEs zu $Co(NH_3)_6^{3+}$ Protonen (Abb 3.28 D) zeigen, sind als orange Kugeln dargestellt. (D) Konsensus der Iminogruppen, die sowohl chemische Verschiebungsänderungen durch Mg^{2+} , Mn^{2+} -induzierte Linienverbreiterung als auch chemische Verschiebungsänderungen und intermolekulare NOEs durch und zu $Co(NH_3)_6^{3+}$ zeigen, sind als orange Kugeln dargestellt. Mg^{2+} -Ionen, die in der Röntgenstruktur des Komplexes gefunden wurden, sind als hellblaue Kugeln dargestellt und analog zu (Serganov et al., 2004) numeriert. Die RNA ist durch weiße Linien, der Ligand Adenin ist durch grüne Linien dargestellt.

Keine zweiwertige Metallbindungsstelle in Lösung konnte in der Nähe von Mg3, entstanden durch Kristallpackungswechselwirkungen, und Mg5 der Röntgenstruktur gefunden werden. Auf der anderen Seite bindet in der Röntgenstruktur kein Mg²⁺ in der Nähe von G37 und G38, die an der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung beteiligt sind, obwohl alle NMR Experimente in Lösung dort zweifelsfrei eine zweiwertige Metallbindungsstelle ausmachen. Interessanterweise scheint die Bindung von Mg²⁺ an dieser Stelle jedoch wichtig für die Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung im *pbuE* Adenin-bindenden Riboswitch zu sein (wie oben gezeigt).

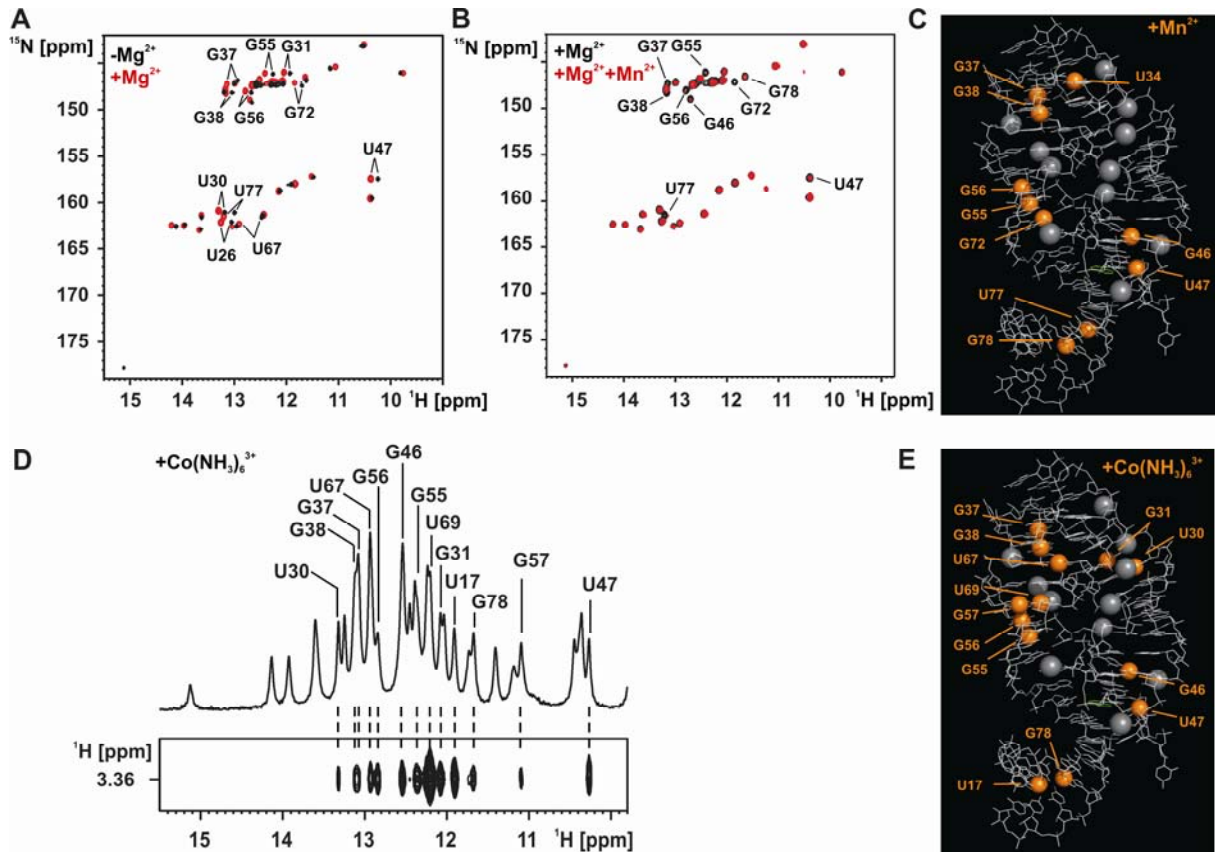
Bindungsstellen zweiwertiger Kationen im Hypoxanthin-G-Switch-RNA-Komplex

Wie für den Adenin-A-Switch-wt-RNA-Komplex bereits beschrieben, wurde auch der Komplex aus Hypoxanthin mit der G-Switch-RNA auf zweiwertige Metallbindungsstellen hin untersucht. Dazu wurde die G-Switch-RNA in Komplex mit Hypoxanthin mit Mg²⁺ titriert und die chemischen Verschiebungsänderungen der Iminoresonanzen in einem ¹H,¹⁵N-HSQC verfolgt. Die Zugabe von Mg²⁺ führte nicht zu sehr großen Änderungen der chemischen Verschiebung und die Anzahl der Iminoresonanzen blieb unverändert. Das deutet darauf hin, dass die globale Struktur des Hypoxanthin-RNA-Komplexes unverändert bleibt und keine neuen Strukturelemente gebildet werden. Die Iminoresonanzen der Nukleotide U26, U30, G31, G37, G38, U47, G55, G56, U67, G72 und U77 zeigten in Gegenwart von 5 mM Mg²⁺ chemische Verschiebungsänderungen von mehr als drei Linienbreiten (> 66 Hz) in entweder ¹H oder ¹⁵N (Abbildung 3.23 A). Wenn die Iminogruppen, die durch Mg²⁺-Bindung beeinflusst werden, in der Röntgenstruktur des Komplexes hervorgehoben werden, so werden fünf klar definierte Regionen sichtbar. G37 und G38 sind in Schlaufe II lokalisiert und an der Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung beteiligt und U67 bildet ein Basenpaar am apikalen Ende von Helix III und ist somit direkt neben G38. U47 ist in der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung lokalisiert. U30 und G31 liegen am apikalen Ende von Helix II. G55, G56 und G72 liegen am unteren Ende von Helix III und nahe bei U26 in Helix II wohingegen U77 in der Mitte von Helix I positioniert ist. Demzufolge deuten die Daten aus dem Mg²⁺ Experiment auf bis zu fünf vermeintliche Mg²⁺ Bindungsstellen im Hypoxanthin-RNA-Komplex hin.

Zusätzlich wurde auch der Hypoxanthin-RNA-Komplex in Gegenwart von 5 mM Mg²⁺ mit 5 und 8 μM Mn²⁺ titriert. Nach Titration von 5 μM Mn²⁺ tritt starke Linienverbreiterung für die Iminogruppen der Nukleotide G37, G38, G46, U47, G55, G56, G72, U77 und G78 auf oder ihre Resonanzen verschwinden vollständig (Abbildung 3.23 B). Bei Mn²⁺ Konzentrationen von 8 μM wird auch U34 beeinflusst. U34 ist nahe bei G37 und G38 gelegen und alle drei Nukleotide

sind an der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung beteiligt. Alle Nukleotide, für die Mn^{2+} -induzierte Linienverbreiterung beobachtet wurde, wurden auch Mg^{2+} -induzierte chemische Verschiebungsänderungen registriert. Lediglich U30 und G31 zeigten keine Mn^{2+} -induzierte Linienverbreiterung. Somit konnte durch Mn^{2+} -induzierte Linienverbreiterung vier der zweiwertigen Metallionenbindungsstellen bestätigt werden, die zuvor durch Mg^{2+} -induzierte chemische Verschiebungsänderungen auffindig gemacht wurden.

Weiterhin wurden für den Hypoxanthin-RNA-Komplex in Gegenwart von 5 mM $Co(NH_3)_6^{3+}$ ein 2D- $^1H,^1H$ -NOESY Spektrum aufgenommen, in dem intermolekulare NOEs von den Protonen des $Co(NH_3)_6^{3+}$ zu den Iminogruppen von U17, U30, G31, G37, G38, U46, U47, G55, G56, G57, U67, U69 und G78 gefunden wurden (Abbildung 3.23 D). Die Iminogruppen, die Mg^{2+} -induzierte chemische Verschiebungsänderungen bzw. Mn^{2+} -induzierte Linienverbreiterung zeigen, haben alle bis auf U34, U77 und U72 auch einen intermolekularen NOE in Gegenwart von $Co(NH_3)_6^{3+}$. Die Iminogruppen von U17, G57 und U69 zeigen einen intermolekularen NOE, wurden zuvor jedoch weder durch Mg^{2+} -induzierte chemische Verschiebungsänderung noch durch Mn^{2+} -induzierte Linienverbreiterung identifiziert. Interessanterweise bilden G57 und U69 in Helix III und U17 in Helix I an der Ausbildung von G:U Basenpaaren beteiligt. Somit liegen die Nukleotide, die einen intermolekularen NOE zu $Co(NH_3)_6^{3+}$ zeigen und weder durch Mg^{2+} -induzierte chemische Verschiebungsänderung noch durch Mn^{2+} -induzierte Linienverbreiterung identifiziert wurden, ausschließlich in G:U Basenpaaren vor.

**Abbildung 3.23**

Divalente Metallionenbindungsstellen im G-Switch-RNA-Hypoxanthin-Komplex. (A) Überlagerung der Iminoregionen der ¹H,¹⁵N-HSQC Spektren der G-Switch-RNA in Komplex mit Hypoxanthin in der Abwesenheit von Mg²⁺ (schwarz) und in der Anwesenheit von 5 mM Mg²⁺ (rot). Iminoresonanzen, die chemische Verschiebungsänderungen von mehr als drei Linienbreiten bei der Zugabe von 5 mM Mg²⁺ zeigen, sind markiert. (B) Überlagerung der Iminoregionen der ¹H,¹⁵N-HSQC Spektren der G-Switch-RNA in Komplex mit Hypoxanthin und 5 mM Mg²⁺ in der Abwesenheit von Mn²⁺ (schwarz) und in der Anwesenheit von 5 μM Mn²⁺ (rot). Iminoresonanzen, die Mn²⁺-induzierte Linienverbreiterung zeigen, sind markiert. (C) Röntgenstruktur des *xpt-pbuX* Guanin-bindenden Riboswitches in Komplex mit Hypoxanthin, in dem Iminogruppen, die Mn²⁺-induzierte Linienverbreiterung bei Zugabe von 8 μM Mn²⁺ zeigen, als orange Kugeln dargestellt sind. Die RNA ist durch weiße Linien, der Ligand Hypoxanthin ist durch grüne Linien dargestellt. Gebundene Co(NH₃)₆³⁺-Ionen, die in der Röntgenstruktur des Komplexes gefunden wurden, sind als graue Kugeln dargestellt. (D) Iminoregion eines 1D-¹H Spektrums der G-Switch-RNA in Komplex mit Hypoxanthin in Gegenwart von 5 mM Co(NH₃)₆³⁺ (oben) und ein Ausschnitt aus einem 2D-¹H,¹H-NOESY Spektrum mit den intermolekularen Kreuzsignalen des Co(NH₃)₆³⁺ und der RNA (unten). Resonanzen der Iminogruppen der RNA, die intermolekulare Kontakte zu den Co(NH₃)₆³⁺ Protonen zeigen, sind markiert. (E) Iminogruppen, die intermolekulare NOEs zu Co(NH₃)₆³⁺ Protonen haben, sind als orange Kugeln dargestellt. Die RNA ist durch weiße Linien, der Ligand Hypoxanthin ist durch grüne Linien dargestellt. Gebundene Co(NH₃)₆³⁺-Ionen, die in der Röntgenstruktur des Komplexes gefunden wurden, sind als graue Kugeln dargestellt.

Wenn die Iminogruppen, deren Resonanzen Mn²⁺-induzierten Linienverbreiterung erfahren, in der Röntgenstruktur des Hypoxanthin-RNA-Komplexes hervorgehoben werden, werden vier

klar definierte Mn^{2+} -Bindungsstellen deutlich (Abbildung 3.23 C). Wenn jedoch die Iminogruppen, die einen intermolekularen NOEs zu $Co(NH_3)_6^{3+}$ ausbilden, in der Röntgenstruktur hervorgehoben werden, werden fünf $Co(NH_3)_6^{3+}$ -Bindungsstellen deutlich (Abbildung 3.23 E). Die durch $Co(NH_3)_6^{3+}$ Experimente verdeutlichten Metallionbindungsstellen bestätigen die vier durch Mn^{2+} -induzierte Linienverbreiterung bestimmten Bindungsstellen und zeigen noch eine weitere Metallionbindungsstelle auf. Diese zusätzliche Metallionbindungsstelle wird durch die Iminogruppen von U30 und G31 bestimmt und konnte schon durch Mg^{2+} -induzierte chemische Verschiebungsänderungen aufgedeckt werden und ist in der apikalen Region der Helix II lokalisiert.

Die in der Röntgenstruktur gebundenen $Co(NH_3)_6^{3+}$ -Ionen sind in Abbildung 3.23 C und E ebenfalls hervorgehoben. Die gebundenen $Co(NH_3)_6^{3+}$ -Ionen bestätigen vier der mit NMR lokalisierten Metallbindungsstellen, wenngleich manchmal auch mehr als ein $Co(NH_3)_6^{3+}$ -Ion pro Bindungsstelle beobachtet wird. Die Bindungsstelle in der Umgebung von U17, U77 und G78 in Helix I stellt eine Ausnahme dar, da für sie sowohl Mg^{2+} -induzierte chemische Verschiebungsänderungen, Mn^{2+} -induzierte Linienverbreiterung als auch intermolekulare NOEs zu $Co(NH_3)_6^{3+}$ mit NMR beobachtet wurden, jedoch keine gebundenen $Co(NH_3)_6^{3+}$ -Ionen in der Röntgenstruktur entdeckt wurden. In dieser Region enthält die in den NMR Experimenten verwendete RNA ein in der Wildtyp-Sequenz auftretendes U17:G79 Basenpaar im Gegensatz zu der RNA, die in der Röntgenstrukturbestimmung eingesetzt wurde, die hier ein kanonisches Watson-Crick Basenpaar trägt.

Im Hinblick auf die vorher gezeigten Ergebnisse ist es wichtig festzuhalten, dass alle vier experimentellen Methoden (Mg^{2+} -induzierte chemische Verschiebungsänderung, Mn^{2+} -induzierte Linienverbreiterung, intermolekulare NOEs zu $Co(NH_3)_6^{3+}$ und Röntgenkristallografie) einstimmig zweiwertige Metallbindungsstellen im Bereich der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung aufdecken.

Vergleich der Bindungsstellen für zweiwertige Kationen in den Purin-Aptamerdomänen

Die durch NMR-spektroskopische Methoden in Lösung bestimmten Metallionenbindungsstellen des Adenin-A-Switch-wt-Komplexes und des Hypoxanthin-G-Switch-Komplexes weisen einige Gemeinsamkeiten auf. So werden in den Ligandkomplexen der beiden Purin-bindenden Aptamerdomänen drei gemeinsame Metallionbindungsstellen gefunden. Die Iminogruppen von vier Nukleotiden, G37, G38, U47 und G55 (G-Switch-RNA) bzw. U71 (A-Switch-wt-RNA) werden je durch alle drei Methoden, Mg^{2+} -induzierte chemische Verschiebungsänderung, Mn^{2+} -induzierte Linienverbreiterung und $Co(NH_3)_6^{3+}$ -induzierte chemische Verschiebungsänderung und/oder intermolekulare NOEs zu $Co(NH_3)_6^{3+}$, in sowohl

der Guanin- als auch der Adenin-bindenden Riboswitch-RNA beobachtet. Dabei ist die Bindungsstelle, die durch G37 und G38 beschrieben wird, in der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung lokalisiert, die Bindungsstelle, die durch U47 beschrieben wird, in der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung lokalisiert und die Bindungsstelle, die in der G-Switch-RNA durch G55 und in der A-Switch-wt-RNA durch U71 beschrieben wird, am unteren Ende der Helix III lokalisiert. Bei der letzten beschriebenen Bindungsstelle handelt es sich in den beiden RNAs um die gleiche Bindungsstelle, da die G-Switch-RNA hier ein G55-C71 und die A-Switch-wt-RNA hier ein A55-U71 Basenpaar aufweist. Das gemeinsame Auftreten dieser drei Metallionbindungsstelle in den beiden Purin-Aptamerdomänen, scheint ihnen eine besondere Bedeutung zukommen zu lassen. Weil die Ligandbindung unabhängig von divalenten Metallionen stattfindet, scheinen alle beobachteten Metallionbindungsstellen die Stabilität der RNA-Struktur zu erhöhen. Die Metallbindungsstelle in der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung ist besonders bedeutend für den Grad der Ausprägung und somit die Stabilität der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung.

3.5 Konformationelle Änderungen im gesamten Guanin-bindenden Riboswitch

Untersuchung von konformationellen Änderungen in der Guanin-bindenden Riboswitch-RNA

Das Modell für die genregulierende Aktivität des Guanin-bindenden Riboswitches beruht auf einer Ligand-induzierten Umordnung der Sekundärstruktur der RNA (Mandal et al., 2003) (Abbildung 1.5). In dieser Arbeit wurden die strukturellen Auswirkungen der Ligandbindung an die Guanin-bindende Riboswitch-RNA mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Dazu wurde eine RNA hergestellt, die der *xpt-pbuX* Guanin-bindenden Riboswitch-RNA aus *B.subtilis* von den Nukleotiden 9 bis 165 entspricht und die im Folgenden als G-Switch-9-165-RNA bezeichnet wird (Abbildung 3.24).

Aufgrund der Größe der G-Switch-9-165-RNA von 157 Nukleotiden können bei dieser RNA konformationelle Änderungen nicht anhand der Iminogruppenresonanzen von Watson-Crick Basenpaaren nachvollzogen werden, da ihre Zuordnung derzeit mit standardmäßigen 2D- und 3D-heteronuklearen NMR-Experimenten und selektiver Isotopenmarkierung nicht möglich ist. Eine Ausnahme stellen G:U Basenpaare dar, in denen die Iminogruppe des Guanosins und die des Uridins räumlich nahe zueinander positioniert sind. Die Iminoresonanzen dieser G:U Basenpaare können leicht in 2D- $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY Spektren detektiert werden, da ihre NOEs eine größere Intensität als sequentielle Iminoresonanz-NOEs aufweisen und ihr chemischer Verschiebungsbereich sich von dem von Watson-Crick Basenpaaren unterscheidet.

Laut des Modells für die genregulierende Aktivität des Guanin-bindenden Riboswitches kann die RNA zwei unterschiedliche Sekundärstrukturen einnehmen. Demnach bilden sich in Anwesenheit des Liganden die ligandbindende Aptamerdomäne und eine transkriptionsabbrechende Helix (Terminator) aus, wohingegen in Abwesenheit des Liganden die Helix I der Aptamerdomäne zerstört ist und sich alternativ eine Helix ausbildet, die die Ausbildung der transkriptionsabbrechenden Helix verhindert (Antiterminator). Da das Muster an G:U Basenpaaren in der Terminatorkonformation und in der Antiterminatorkonformation unterschiedlich ist (Abbildung 1.5), kann anhand der Iminoresonanz NOEs der G:U Basenpaare die Konformation der G-Switch-9-165-RNA bestimmt werden. Mit Hilfe von kleinen Modell-RNAs, die dem Terminator, dem Antiterminator bzw. einem Konstrukt aus Helix I und Antiterminator (Helix I+Antiterminator)

entsprechen (Abbildung 3.24, Abbildung 3.25, Abbildung 3.26), konnten die auftretenden G:U Basenpaare zugeordnet werden.

G-Switch-9-165-RNA zeigt keine Ligand-induzierte Konformationsänderung

In einem 2D-¹H,¹H-NOESY Spektrum der G-Switch-9-165-RNA mit äquivalenten Mengen an Hypoxanthin ist eine Iminoresonanz bei 15,1 ppm zu beobachten (Abbildung 3.24), die aufgrund ihrer chemischen Verschiebung der N1H1 Iminogruppe des gebundenen Hypoxanthin zugeordnet wird. Somit ist deutlich, dass die G-Switch-9-165-RNA einen stabilen Komplex mit Hypoxanthin ausbildet. Weiterhin werden durch Vergleich mit dem 2D-¹H,¹H-NOESY Spektrum der G-Switch-RNA in Komplex mit Hypoxanthin NOEs für das in der Helix I lokalisierte G78:U17 und das in Helix III lokalisierte G57:U69 Basenpaar im G-Switch-9-165-RNA-Hypoxanthin-Komplex wieder gefunden. Auch kann durch weiteren Vergleich des 2D-¹H,¹H-NOESY Spektrums der Modell-Terminator-RNA mit dem des Komplexes aus der G-Switch-9-165-RNA gebunden an Hypoxanthin abgeleitet werden, dass die NOEs von den G146:U130 und G147:U129 Basenpaaren in der Modell-Terminator-RNA auch für den G-Switch-9-165-RNA-Hypoxanthin-Komplex beobachtet werden können. Somit ist im RNA-Hypoxanthin-Komplex die Terminatorhelix vorhanden. Diese Daten zeigen, dass in dem Komplex aus der G-Switch-9-165-RNA mit Hypoxanthin sowohl die Helices I und III der Aptamerdomäne als auch die Terminatorhelix aus der Expressionsplattform vollständig ausgebildet sind. Entsprechend des publizierten Modells ist das die Konformation der G-Switch-9-165-RNA, in der die Genexpression durch vorzeitigen Abbruch der Transkription unterdrückt wird.

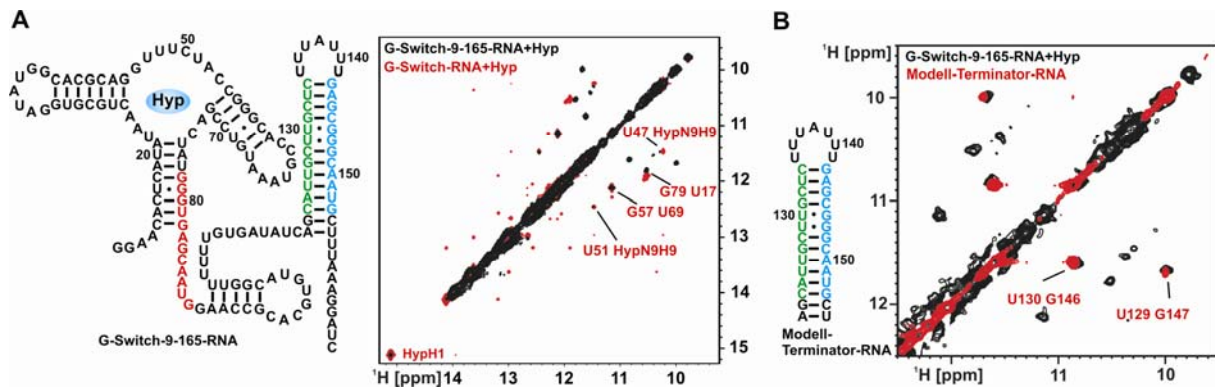


Abbildung 3.24

Hypoxanthinbindung an die G-Switch-9-165-RNA. (A) Angenommene Sekundärstruktur der G-Switch-9-165-RNA. Überlagerung der 2D-¹H, ¹H-NOESY Spektren der G-Switch-9-165-RNA in Komplex mit Hypoxanthin (schwarz) und der G-Switch-RNA in Komplex mit Hypoxanthin (rot). Die Bindung von Hypoxanthin an die G-Switch-9-165-RNA wird durch die H1 Iminoresoanz des gebundenen Hypoxanthins und die intermolekularen NOEs zwischen der N9H9 Iminogruppe des gebundenen Hypoxanthins und den Iminogruppen von U51 und U47 der RNA nachgewiesen. Die Iminogruppen-NOEs der G57:U69 und der G79:U17 Basenpaare, die in der Aptamerdomäne lokalisiert sind, zeigen, dass die Aptamerdomäne der G-Switch-9-165-RNA vollständig ausgebildet ist. (B) Sekundärstruktur der Modell-Terminator-RNA und Überlagerung der 2D-¹H, ¹H-NOESY Spektren der G-Switch-9-165-RNA in Komplex mit Hypoxanthin (schwarz) und der Modell-Terminator-RNA. Die Iminogruppen-NOEs der U130:G146 und der U129:G147 Basenpaare, die in der Modell-Terminator-RNA gefunden werden, werden mit identischer chemischer Verschiebung auch in der G-Switch-9-165-RNA wieder gefunden.

Auch die Ligand-ungebundene Form der G-Switch-9-165-RNA wurde NMR-spektroskopisch untersucht. Die NOEs der G:U Basenpaare in einem 2D-¹H, ¹H-NOESY Spektrum wurden mit denen von der Modell-Antiterminator-RNA und denen der Modell-Terminator-RNA verglichen (Abbildung 3.25). Dabei wird festgestellt, dass in der freien Form der G-Switch-9-165-RNA Iminoresoanzen von den aus der Aptamerdomäne stammenden G78:U17 Basenpaar in Helix I und G57:U69 Basenpaare in Helix III und von den in der Terminatorhelix lokalisierten G146:U130 und G147:U129 Basenpaaren detektiert werden. Für die in der Modell-Antiterminator-RNA beobachteten NOEs der G131:U81 und G82:U130 Basenpaare werden keine NOEs mit identischer chemischer Verschiebung in der freien Form der G-Switch-9-165-RNA gefunden. Somit sind in der freien Form der G-Switch-9-165-RNA sowohl die Helices I und III der Aptamerdomäne als auch die Terminatorhelix aus der Expressionsplattform vollständig ausgebildet. Diese Beobachtung widerspricht dem publizierten Modell, in dem in der Ligand-ungebundenen Form des Guanin-bindenden Riboswitches die Helix I der Aptamerdomäne und die Terminatorhelix zerstört sind und sich die Antiterminatorhelix ausbildet.

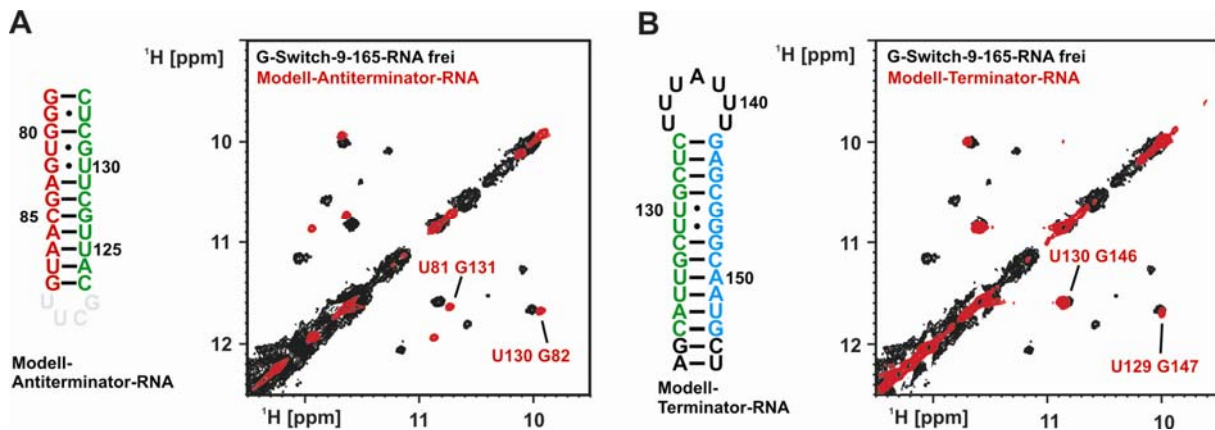


Abbildung 3.25

Die freie Form der G-Switch-9-165-RNA. (A) Sekundärstruktur der Modell-Antiterminator-RNA (nicht native Nukleotide sind in grau dargestellt) und Überlagerung der 2D- $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY Spektren der G-Switch-9-165-RNA in ihrer freien Form (schwarz) und der Modell-Antiterminator-RNA (rot). Die Iminogruppen-NOEs des U81:G131 und des U130:G82 Basenpaars der Modell-Antiterminator-RNA werden nicht in der freien Form der G-Switch-9-165-RNA wieder gefunden. (B) Sekundärstruktur der Modell-Terminator-RNA und Überlagerung der 2D- $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY Spektren der freien Form der G-Switch-9-165-RNA mit der Modell-Terminator-RNA. Die Iminogruppen-NOEs des U130:G146 und des U129:G147 Basenpaars der Modell-Terminator-RNA werden in der freien Form der G-Switch-9-165-RNA wieder gefunden.

Die G-Switch-9-134-RNA bildet die Antiterminatorhelix aus

Da die G-Switch-9-165-RNA in der freien und Hypoxanthin-gebundenen Form die Terminatorhelix ausbildet und die Antiterminatorhelix bislang nicht nachgewiesen werden konnte, wurde die G-Switch-9-134-RNA konzipiert. Diese RNA stellt eine Variante der G-Switch-9-165-RNA dar, die am 3' Ende um 31 Nukleotide verkürzt ist und somit nur die Nukleotide 9 bis 134 der Guanin-bindenden Riboswitch-RNA enthält. Da die Terminatorhelix die Nukleotide 121 bis 155 umfasst, ist in der G-Switch-9-134-RNA die Ausbildung der Terminatorhelix nicht mehr möglich; vielmehr konkurriert hier die Ausbildung der Helix I aus der Aptamerdomäne mit der Ausbildung der Antiterminatorhelix.

Interessanterweise kann diese G-Switch-9-134-RNA zwei unterschiedliche Konformationen abhängig von der Probenpräparation aufweisen. Hierbei unterscheiden sich die Probenpräparationen in einem RNA-Faltungsschritt, bei dem die aufgereinigte RNA durch einen thermischen Denaturierungsschritt eine andere Konformation einnimmt, als wenn sie ohne einen Denaturierungsschritt aus der Transkriptionslösung aufgearbeitet wird.

In einem 2D- $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY Spektrum der freien Form ohne Denaturierungsschritt aufgereinigten G-Switch-9-134-RNA werden die NOEs der Iminogruppen von zwei G:U Basenpaaren beobachtet, deren chemische Verschiebung identisch mit den NOEs der

Iminogruppen der G57:U69 und der G79:U17 Basenpaare der G-Switch-9-165-RNA ist. Somit ist in der ungefalteten Form der G-Switch-9-134-RNA, genau wie bei der G-Switch-9-165-RNA, die Helix I und die Helix III der Aptamerdomäne vollständig ausgebildet.

Nun werden die NOEs der G:U Basenpaare in einem 2D- ^1H , ^1H -NOESY Spektrum der freien Form der G-Switch-9-134-RNA, die einem Faltungsschritt unterworfen wurde, mit denen von der Modell-Terminator-RNA, der Modell-Antiterminator-RNA und denen der Helix I+Antiterminator-RNA verglichen. Dabei fällt auf, dass die NOEs der G131:U81 und der G82:U130 Basenpaare für die Modell-Antiterminator-RNA auch für die freie, gefaltete Form der G-Switch-9-134-RNA gefunden werden. Der NOE des G79:U133 Basenpaars für die Modell-Antiterminator-RNA kann jedoch nicht eindeutig für die freie, gefaltete Form der G-Switch-9-134-RNA gefunden werden. Vergleicht man jedoch die NOEs des G79:U133, des G131:U81 und des G82:U130 Basenpaars der Helix I+Antiterminator-RNA mit denen der freien, gefalteten Form der G-Switch-9-134-RNA, so ist erkennbar, dass die NOEs aller drei G:U Basenpaare auch in der freien, gefalteten Form der G-Switch-9-134-RNA detektierbar sind. Auch in einem ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum der freien, gefalteten G-Switch-9-134-RNA werden die Iminoresonanzen von U81 und U131 bei identischer chemischer Verschiebung wie in der Modell-Antiterminator-RNA beobachtet. Die Iminoresonanz von U81, das in der G-Switch-RNA ein Watson-Crick A:U Basenpaar mit A15 ausbildet und somit ein Teil der Helix I ist, ist in der freien G-Switch-9-134-RNA nicht nachweisbar. Diese Daten zeigen, dass in der freien, gefalteten Form der G-Switch-9-134-RNA die Antiterminatorhelix weitgehend ausgebildet ist und die Helix I zerstört ist.

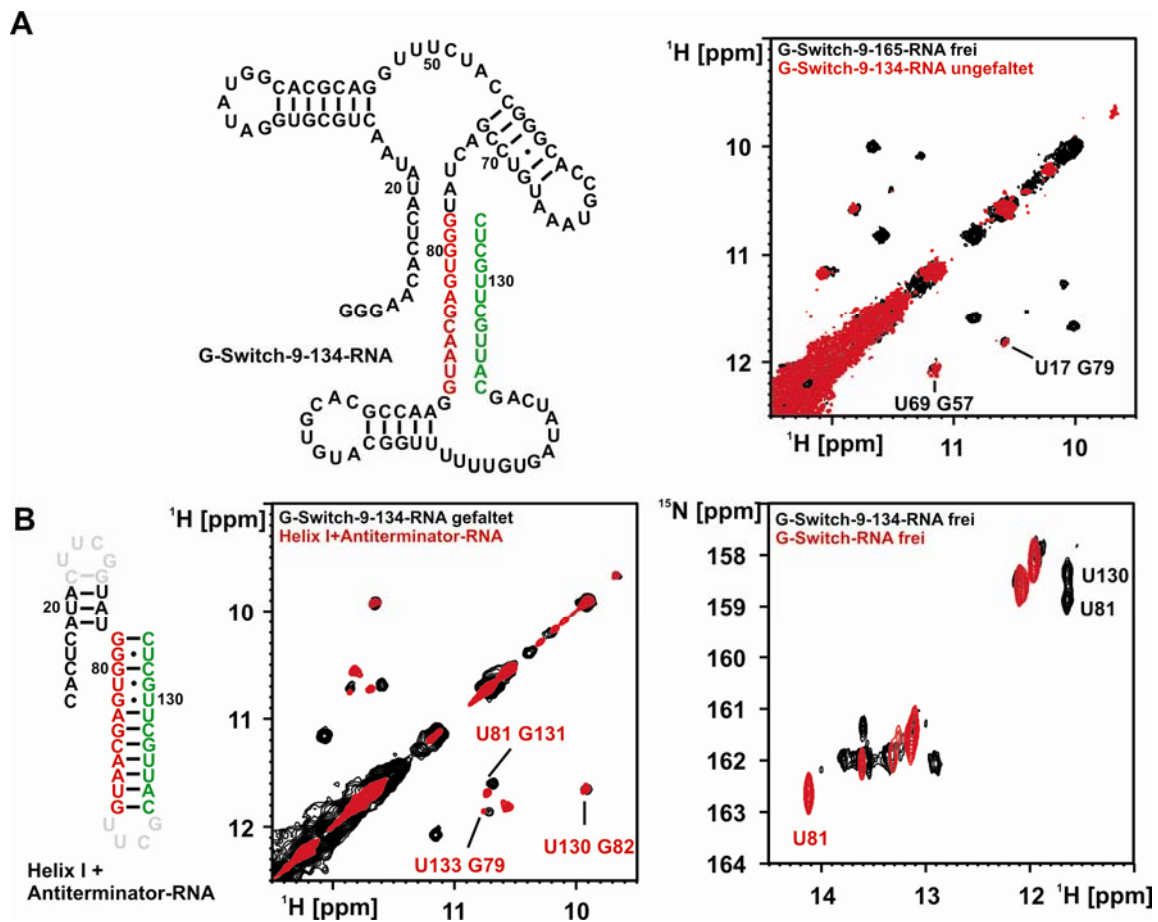


Abbildung 3.26

Die freie Form der G-Switch-9-134-RNA kann zwei unterschiedliche Konformationen annehmen. (A) Sekundärstruktur der G-Switch-9-134-RNA, in der die Ausbildung der Helix I mit der Ausbildung des Antiterminators konkurriert. Überlagerung der 2D- ^1H , ^1H -NOESY Spektren der freien G-Switch-9-165-RNA (schwarz) mit der ungefalteten G-Switch-9-134-RNA (rot). Die Iminogruppen-NOEs der U69:G57 und der U17:G79 Basenpaare aus der freien Form der G-Switch-9-165-RNA werden mit identischer chemischer Verschiebung in der ungefalteten Form der G-Switch-9-134-RNA wieder gefunden. (B) Sekundärstruktur der Helix I+Antiterminator-RNA (nicht native Nukleotide sind in grau dargestellt) und Überlagerung der 2D- ^1H , ^1H -NOESY Spektren der gefalteten G-Switch-9-134-RNA (schwarz) und der Helix I+Antiterminator-RNA (rot) (mitte). Die Iminogruppen-NOEs der U133:G79, U130:G82 und U81:G131 Basenpaare der Helix I+Antiterminator-RNA werden in der gefalteten G-Switch-9-134-RNA wieder gefunden. Überlagerung der ^1H , ^{15}N -HSQC Spektren der freien, gefalteten G-Switch-9-134-RNA (schwarz) und der freien G-Switch-RNA (rot) (rechts). In der freien, gefalteten G-Switch-9-134-RNA wird die Iminoressonanz von U130 aus dem Antiterminator gefunden und U81 kommt in einem Bereich zur Resonanz, wo Uridine aus G:U Basenpaaren beobachtet werden. Im Gegensatz dazu besitzt U81 der freien G-Switch-RNA eine chemische Verschiebung, die für Watson-Crick A:U Basenpaare typisch ist.

Nach Zugabe äquimolarer Mengen von Hypoxanthin zur gefalteten G-Switch-9-134-RNA konnte in einem ^1H , ^{15}N -HSQC Spektrum die Iminoressonanzen der Nukleotide U47, U49 und U51 beobachtet werden und in einem 2D- ^1H , ^1H -NOESY Spektrum konnte die N1H1 Iminoressonanz des gebundenen Hypoxanthins und intermolekulare NOEs zwischen der N9H9 Iminoressonanz des gebundenen Hypoxanthins und den Iminoressonanzen der

Nukleotide U47 und U51 beobachtet werden. Diese Daten zeigen, dass Hypoxanthin an die G-Switch-9-134-RNA bindet und mit ihr einen stabilen RNA-Ligand-Komplex ausbildet. Das Auftreten der Iminoresonanzen der Nukleotide U47, U49 und U51, die alle in der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung lokalisiert sind, deutet auf einen *induced-fit* Bindungsmechanismus für die Ligand-bindende Drei-Wege-Kreuzung hin, wie er auch schon für die G-Switch-RNA beobachtet wurde (siehe oben), da diese Iminoresonanzen in der freien Form der G-Switch-9-134-RNA nicht detektierbar sind. Der Vergleich der Iminoregion der $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren der Hypoxanthin-gebundenen G-Switch-9-134-RNA mit dem der Hypoxanthin-gebundenen G-Switch-RNA und der Modell-Antiterminator-RNA lässt erkennen, dass in der Hypoxanthin-gebundenen G-Switch-9-134-RNA die Iminoresonanzen der G131:U81 und der G82:U130 Basenpaare genau wie auch für die Modell-Antiterminator-RNA beobachtet werden. Des Weiteren wird durch Vergleich mit der Iminoregion der $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren der Hypoxanthin-gebundenen G-Switch-RNA erkannt, dass in der Hypoxanthin-gebundenen Form der G-Switch-9-134-RNA Iminoresonanzen der Nukleotide U75, U77 und U20, die alle im oberen Teil der Helix I lokalisiert sind, detektierbar sind. Somit ist in der Hypoxanthin-gebundenen G-Switch-9-134-RNA die Antiterminatorhelix weitgehend ausgebildet wie auch die obere drei Basenpaare der Helix I.

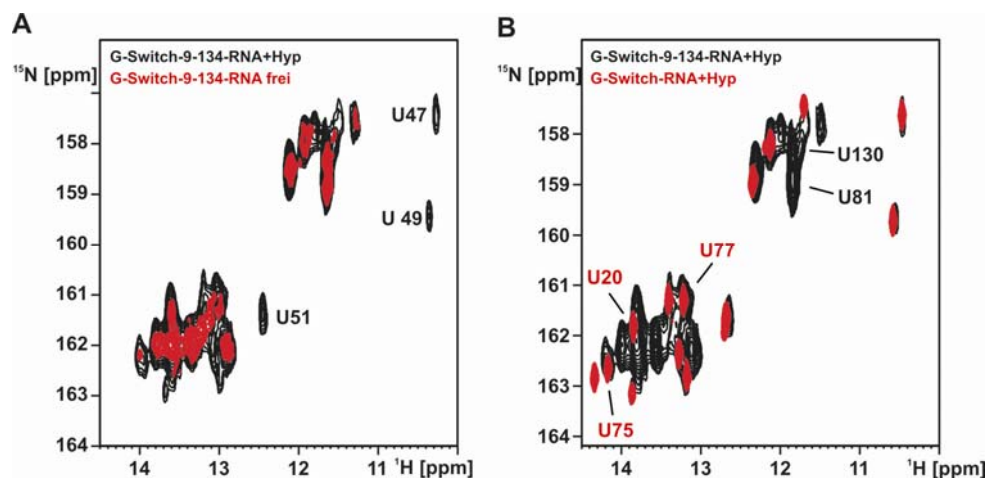


Abbildung 3.27

Die G-Switch-9-134-RNA bindet Hypoxanthin. (A) Überlagerung der $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren der freien, gefalteten (rot) und der Hypoxanthin-gebundenen (schwarz) G-Switch-9-134-RNA. In der Hypoxanthin-gebundenen Form der G-Switch-9-134-RNA treten Iminoresonanzen von U47, U49 und U51 aus der Ligandbindenden Drei-Wege-Kreuzung auf. (B) Überlagerung der $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren der G-Switch-134-RNA (schwarz) und der G-Switch-RNA (rot) jeweils in Komplex mit Hypoxanthin. Neben den Iminoresonanzen der Nukleotide U20, U75 und U77, die alle im oberen Bereich der Helix I lokalisiert sind, werden die Iminoresonanzen von U81 und U130 aus dem Antiterminator in der Hypoxanthin-gebundenen Form der G-Switch-9-134-RNA gefunden.

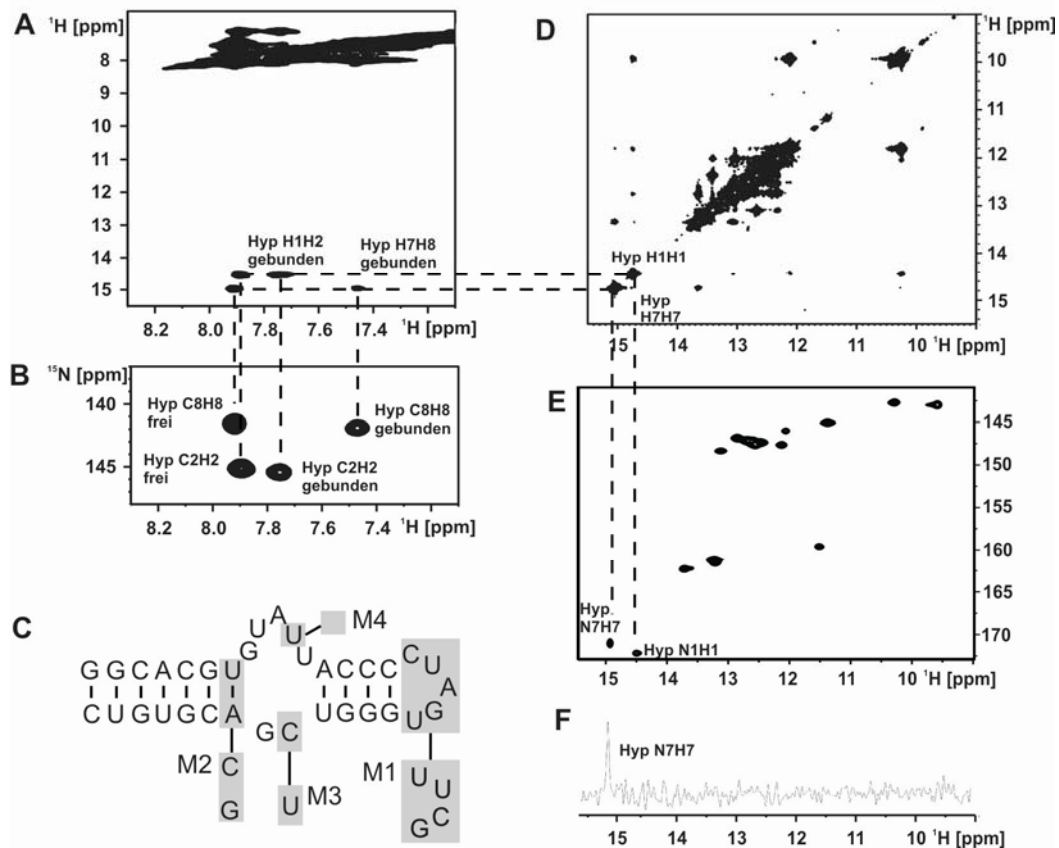
3.6 Bindung von Hypoxanthin an die X-Aptamer-RNA

Aus biochemischen Untersuchungen ist bekannt, dass die *in vitro* selektionierte Xanthin-Aptamer-RNA (X-Aptamer-RNA, Abbildung 3.28 C) die Purine Xanthin, Guanin und Hypoxanthin mit μM Affinität bindet (Kiga et al., 1998). Die in der Sekundärstruktur der Wildtypsequenz enthaltene fünf Nukleotide umfassende terminale Schlaufe der X-Aptamer-RNA (Abbildung 1.8) wurde durch eine stabile vier Nukleotide umfassende Schlaufe ersetzt (X-Aptamer-M1-RNA, Abbildung 3.28 C), um ein stabileres NMR-Konstrukt zu kreieren. Beide Konstrukte, das X-Aptamer- und das X-Aptamer-M1-RNA Konstrukt, enthalten sieben G:C und 3 A:U und ein G:U Basenpaar in ihrer Sekundärstruktur. Die Zugabe von Hypoxanthin zur X-Aptamer-M1-RNA führte in der Iminoregion eines $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrums zum Auftreten von neuen Signalen mit schmaler Linienbreite. In den chemischen Verschiebungsbereichen der Iminoprotonen von Guanosinen in Watson-Crick G:C und Uridinen in Watson-Crick A:U Basenpaaren werden ca. sechs bzw. drei Resonanzen beobachtet, einhergehend mit der publizierten Sekundärstruktur der RNA (Kiga et al., 1998).

Auch wurden Iminoresonanzen von vier Guanosinen und einem Uridin in nicht-kanonischen Basenpaarung und zwei Iminogruppen des gebundenen Hypoxanthins detektiert (Abbildung 3.28 D und E). Die Iminoresonanzen des gebundenen Hypoxanthins wurden durch Experimente mit $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markiertem und ^{15}N -7-selektiv markiertem Hypoxanthin in Komplex mit unmarkierter X-Aptamer-M1-RNA zugeordnet. Das Iminogruppen $1\text{D-}^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum der unmarkierten X-Aptamer-RNA in Komplex mit ^{15}N -7-selektiv markiertem Hypoxanthin zeigt eine einzelne Resonanz (Abbildung 3.28 F). Somit bindet Hypoxanthin an die X-Aptamer-RNA in seiner N7 protonierten tautomeren Form. Die N1H1-Iminogruppe des an die X-Aptamer-RNA gebundenen Hypoxanthins hat eine chemische Verschiebung von 14,5 ppm und 172,2 ppm und ist somit ähnlich der chemischen Verschiebung der N1H1-Iminogruppe des Hypoxanthins gebunden an die G-Switch-RNA (15,1 ppm und 177,7 ppm). Die N7H7-Iminogruppe des Hypoxanthins gebunden an die X-Aptamer-RNA hat eine Resonanzfrequenz von 14,9 ppm und 171,0 ppm.

In einem $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC Spektrum der Aromatenregion von unmarkierter X-Aptamer-M1-RNA in Komplex mit $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markiertem Hypoxanthin werden vier Resonanzen detektiert. Durch den Vergleich des Aromaten $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC Spektrums von freiem Hypoxanthin können zwei der Resonanzen dem C2H2 und dem C8H8 des freien Hypoxanthins zugeordnet werden. Die beiden Resonanzen bei 7,45 ppm und 7,75 ppm können aufgrund ihrer chemischen Verschiebung (Abbildung 3.28 B) und ihrer intramolekularen NOEs (Abbildung 3.28 A) dem C8H8 und dem C2H2 des gebundenen Hypoxanthins zugeordnet werden. Die intermolekularen NOEs des H2 und des H8 des gebundenen Hypoxanthins zu den N1H1

bzw. N7H7 Iminoressonanzen (Abbildung 3.28 A) bestätigen die Zuordnung der Resonanzen des gebundenen Hypoxanthins. Die Beobachtung, dass sowohl Resonanzen des gebundenen als auch die des freien Hypoxanthins auftreten (Abbildung 3.28 B) deutet auf eine Assoziation und Dissoziation des RNA-Ligand-Komplexes im Bereich des langsamen Austausches auf der NMR-Zeitskala hin, was für die Ausbildung eines hochaffinen RNA-Ligand-Komplexes steht. Das 1D- ^1H , ^1H -NOESY Spektrum der X-Aptamer-RNA in Komplex mit Hypoxanthin zeigt eine Korrelation zwischen der N7H7 Iminogruppe des gebundenen Hypoxanthins und dem Uridin aus einem Watson-Crick A:U Basenpaar. Des Weiteren kann ein G:G Basenpaar detektiert werden, was einen mittelstarken NOE zum N1H1 und einen sehr schwachen NOE zum N7H7 des gebundenen Hypoxanthins zeigt.

**Abbildung 3.28**

Hypoxanthin bindet als N7 Tautomer an die X-Aptamer-RNA. (A) ^{13}C -editiertes NOESY Spektrum der X-Aptamer-M1-RNA in Komplex mit Hypoxanthin und in Gegenwart von 5 mM Mg^{2+} . Die Kreuzsignale des Hypoxanthins sind markiert. (B) $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC von $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markiertem Hypoxanthin in Komplex mit X-Aptamer-M1-RNA in Gegenwart von 5 mM Mg^{2+} . Die Resonanzen des freien und des gebundenen Hypoxanthins sind markiert. (C) Sekundärstruktur der X-Aptamer-RNA. Hergestellte Mutanten der X-Aptamer-RNA sind mit M1-M4 benannt. Die mutierten Nukleotide sind grau hinterlegt und in einem separaten Kasten sind die geänderten Sequenzen abgebildet. Bei der Mutante 4 handelt es sich um eine Deletion des markierten Uridins. Nur die X-Aptamer Wildtypsequenz und die Mutante 1 sind hypoxanthinbindungskompetente Konstrukte (D) Imino-region eines $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY Spektrums der X-Aptamer-RNA in Komplex mit Hypoxanthin und in Gegenwart von 5 mM Mg^{2+} . Die Imino-resonanzen des gebundenen Hypoxanthins sind markiert. (E) Imino-region eines $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum der X-Aptamer-M1-RNA in Komplex mit $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markiertem Hypoxanthin in Gegenwart von 5 mM Mg^{2+} . Die Imino-resonanzen des gebundenen Hypoxanthins sind markiert. (F) 1D- $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum von unmarkierter X-Aptamer-M1-RNA in Komplex mit $^{15}\text{N}7$ -markiertem Hypoxanthin in Gegenwart von 5 mM Mg^{2+} . Hypoxanthin bindet an die X-Aptamer-RNA als das N7 Tautomer.

Um weitere Rückschlüsse auf den Bindungsmechanismus von Hypoxanthin an die X-Aptamer-RNA zu erhalten, wurden weitere Mutanten der RNA hergestellt (Abbildung 3.28 C). Alle diese hergestellten Mutanten tragen neben der Mutation, die Rückschlüsse auf den Bindungsmechanismus liefern soll (M2-M4), zusätzlich die stabilere terminale Schlaufe, die vier Nukleotide umfasst (M1).

Im X-Aptamer-M1M2 Konstrukt wird ein A:U Basenpaar, das an die innere Schlaufe angrenzt, durch ein G:C Basenpaar ersetzt. Diese Mutante M1M2 kann kein Hypoxanthin mehr binden, was darauf hin deutet, dass das A:U Basenpaar für die Bindung von Hypoxanthin bzw. für die Ausbildung der Bindungstasche notwendig ist. In einer anderen Mutante (M1M3) wird das Cytidin in der inneren Schlaufe gegen ein Uridin ausgetauscht. Da das mutierte Cytidin das einzige Cytidin in der Ligand-bindenden inneren Schlaufe darstellt, sollte somit untersucht werden, ob das Hypoxanthin über ein intermolekulares Watson-Crick Basenpaar an die X-Aptamer-RNA bindet. Die Mutante M1M3 verlor seine Bindungskompetenz für Hypoxanthin. Die Bindungsspezifität der Mutante M1M3 konnte jedoch nicht von Hypoxanthin auf Adenin geändert werden, was im Falle eines intermolekularen Watson-Crick Bindungsmechanismus des Liganden an die X-Aptamer-RNA denkbar wäre. In der Mutante M1M4 wird ein Uridin aus der inneren Schlaufe deletiert. Damit sollte untersucht werden, ob somit ein stabileres Konstrukt mit besseren NMR Eigenschaften erhalten werden kann. Die Mutante 4 verlor jedoch ihre Bindungskompetenz für Hypoxanthin, was bedeutet, dass das besagte Uridin entweder direkt an der Ligandbindung beteiligt ist oder eine wichtige strukturelle Funktion ausführt.

Diese Daten weisen die Bindung von Hypoxanthin an die X-Aptamer-RNA nach. Interessanterweise bindet Hypoxanthin an die X-Aptamer-RNA in seiner N7-tautomeren Form im Gegensatz zur Bindung von Hypoxanthin an die G-Switch-RNA. Durch die Einführung bestimmter Mutationen in der Ligand-bindenden inneren Schlaufe konnte gezeigt werden, dass die innere Schlaufe wohl eine komplexe Struktur ausbildet und jede Veränderung zum Verlust der Ligandbindung führt.

3.7 Phosphatgruppenerkennung durch den TPP-Riboswitch

Biochemische Daten zeigten, daß Liganden mit steigender Anzahl an Phosphatgruppen stärker an die TPP-Riboswitch-RNA binden. So steigt die Bindungsaffinität von Thiamin über Thiaminmonophosphat bis hin zu Thiaminpyrophosphat an (Winkler et al., 2002a). Die Mg^{2+} -abhängige Ligandbindung (Yamauchi et al., 2005) lässt eine direkte Wechselwirkung der Phosphatgruppe des Liganden mit Mg^{2+} -Ionen möglich erscheinen. Im Folgenden soll durch ^{31}P -NMR-Spektroskopie gezeigt werden, dass die Bindung von TPP und die Aptamerdomäne des TPP-bindenden Riboswitches (TPP-Switch-RNA, Abbildung 3.29 A) Mg^{2+} -vermittelt stattfindet.

Mg^{2+} -abhängige Bindung von TPP an den TPP-Riboswitch induziert RNA Faltung

Das 1D- 1H Iminoprotonenspektrum der freien TPP-Switch-RNA ist in Abbildung 3.29 B gezeigt. Es zeigt einige Resonanzen im chemischen Verschiebungsbereich, in dem Iminoresonanzen von Watson-Crick Basenpaarungen erwartet werden. Die Anzahl der Signale ist in Übereinstimmung mit der Anzahl an Basenpaaren im publizierten Sekundärstrukturmodell der RNA (Winkler et al., 2002a). Nicht-kanonische Basenpaarungen scheinen weitgehend abwesend zu sein, da nur wenige schwache Signale außerhalb des chemischen Verschiebungsbereichs von kanonischen Basenpaarungen beobachtet werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass die einzelsträngigen Nukleotidabschnitte in der freien Form der RNA weitgehend unstrukturiert vorliegen. Die Zugabe von Mg^{2+} -Ionen zur freien TPP-Switch-RNA führte zu wenigen chemischen Verschiebungsänderungen (Abbildung 3.29 C). Auch hatte die Zugabe von TPP zur freien Form der TPP-Switch-RNA in Abwesenheit von Mg^{2+} keine Auswirkung auf das 1D- 1H Iminoprotonenspektrum (Abbildung 3.29 D). Wurde jedoch Mg^{2+} und TPP gleichzeitig zur freien Form der TPP-Switch-RNA gegeben oder zu einer Probe von TPP-Switch-RNA in Gegenwart von TPP Mg^{2+} titriert, so erschienen neue Signale und andere zeigten signifikante chemische Verschiebungsänderungen (Abbildung 3.29 E). Somit bindet TPP an die TPP-Switch-RNA, jedoch nur in der Gegenwart von Mg^{2+} Ionen. Manche der neu aufgetretenen Iminoprotonensignale liegen im chemischen Verschiebungsbereich von ungewöhnlichen Basenpaarungen.

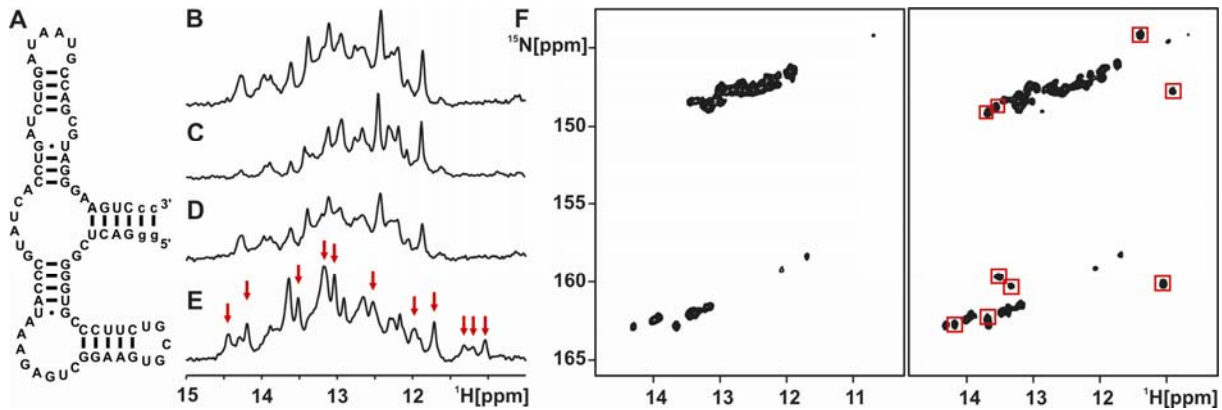


Abbildung 3.29

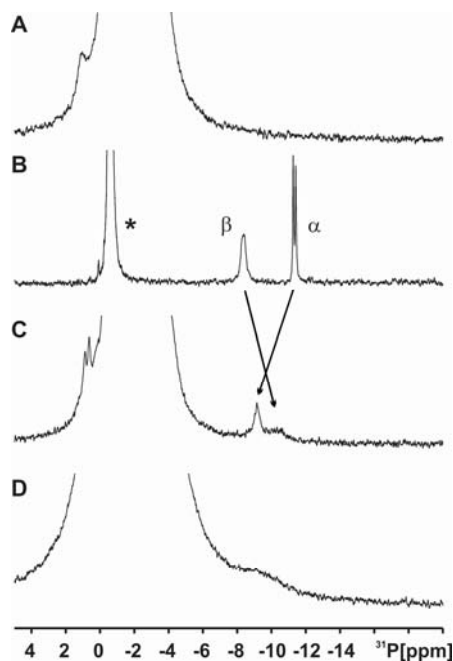
TPP bindet an die TPP-Switch-RNA in Gegenwart von Mg²⁺. (A) Sekundärstruktur der Aptamerdomäne des TPP-bindenden Riboswitches (TPP-Switch-RNA). Nukleotide, die zur Steigerung der Transkriptionseffizienz eingefügt wurden, sind durch kleine Buchstaben dargestellt. Vergleich der 1D-¹H-Iminogruppenspektren der TPP-Switch-RNA: (B) in der freien Form, (C) in Gegenwart von Mg²⁺, (D) in Gegenwart von TPP und (E) in Gegenwart von sowohl TPP als auch Mg²⁺. Neue Signale, die aus der Ligand-induzierten Faltung der RNA resultieren sind durch rote Pfeile gekennzeichnet. (F) Der Vergleich der Iminoregion von ¹H,¹⁵N-HSQC Spektren der TPP-Switch-RNA in seiner freien Form (links) und gebunden an TPP in Gegenwart von Mg²⁺ (rechts) deckt neue Signale auf (rot eingrahmt). Diese Signale zeigen die Ausbildung von nicht-kanonischen Strukturelementen der RNA, deren Ausbildung durch Ligandbindung induziert wird.

Diese Beobachtung wird durch den Vergleich von ¹H,¹⁵N-HSQC Spektren des Iminobereiches der TPP-Switch-RNA in seiner freien Form (Abbildung 3.29 F, links) und in Komplex mit TPP und Mg²⁺ (Abbildung 3.29 F, rechts) weiter bestärkt. Diese Daten zeigen, dass die Bindung von TPP an die TPP-Switch-RNA in Gegenwart von Mg²⁺ zur Ausbildung von Tertiärstrukturelementen führt.

Die Phosphatgruppen des gebundenen TPP und TMP liegen in engem Kontakt mit der RNA

³¹P-NMR-Spektroskopie wurde angewandt, um die Beteiligung der Phosphatgruppen des TPP an der Bindung an die RNA zu untersuchen. Die ³¹P-Signale von TPP liegen außerhalb des chemischen Verschiebungsbereichs, in dem die Phosphatgruppen des RNA Rückgrats gewöhnlich beobachtet werden, wohingegen jedoch die Phosphatgruppen der terminalen 5'-Triphosphate, die bei durch *in vitro* Transkription mit NTPs hergestellter RNA auftreten, in einem ähnlichen chemischen Verschiebungsbereichs beobachtet werden (Fürting et al., 2003). Um die Interferenz durch das Auftreten von terminalen 5'-Triphosphatsignalen zu minimieren, wurde die RNA mit alkalischer Phosphatase behandelt. Das ³¹P-NMR Spektrum der mit alkalischer Phosphatase behandelten TPP-Switch-RNA in Gegenwart von 15 mM Mg²⁺

ist in Abbildung 3.30 A abgebildet. Das Spektrum zeigt lediglich breite und undefinierte Signale im chemischen Verschiebungsbereich von $\sim 1,5$ ppm bis $\sim 4,5$ ppm, in dem gewöhnlich die Resonanzen der Phosphodiesterbindungen des RNA Rückgrats zu beobachten sind (Abbildung 3.30 A). Das Spektrum von freiem TPP bei gleicher Mg^{2+} Konzentration zeigt zwei scharfe Signale bei $-8,36$ ppm und $-11,34$ ppm, die weit außerhalb des chemischen Verschiebungsbereichs von RNA-Signalen liegen (Abbildung 3.30 B). Durch Vergleich der ^{31}P NMR Spektren von TPP mit und ohne Protonenentkopplung bei identischen Bedingungen, konnte die Resonanz bei $-8,36$ ppm der β -Phosphatgruppe und die Resonanz bei $-11,34$ ppm der α -Phosphatgruppe zugeordnet werden (Anhang 3). Bei Zugabe von stöchiometrischen Mengen TPP-Switch-RNA zum freien TPP wurden zwei Signale mit chemischen Verschiebungen von $-9,12$ ppm und $-10,3$ ppm beobachtet (Abbildung 3.30 C). Das deutet darauf hin, dass die chemische Umgebung der beiden Phosphatgruppen sich geändert hat. Die beiden Signale des gebundenen TPPs haben eine wesentlich größere Linienbreite als die des freien TPPs, wie es für einen Komplex mit einem hohen Molekulargewicht erwartet wird. Dennoch sind die Linienbreiten der beiden Resonanzen unterschiedlich. Die Resonanz bei $-10,3$ ppm ist wesentlich breiter als die Resonanz bei $-9,12$ ppm. Das bedeutet, dass eine Phosphatgruppe eine größere lokale Mobilität aufweist, mit Bewegungen, die im Bereich des intermediären Austausches auf der NMR-Zeitskala stattfinden. Diese breitere Resonanz bei $-10,3$ ppm wurde vorläufig der β -Phosphatgruppe des gebundenen TPPs zugeordnet. Ähnliche chemische Verschiebungsänderungen von Phosphatgruppenresonanzen beim Übergang von der freien in eine gebundene Form wurden für die Bindung von TPP an die Pyruvatdecarboxylase (Flatau et al., 1988) und von GTP an das Ras-Protein (Rösch et al., 1986) beobachtet, wo die Phosphatgruppen des gebundenen Liganden Wasserstoffbrückenbindungen mit den Proteinseitenketten eingehen (Arjunan et al., 1996; Pai et al., 1989).

**Abbildung 3.30**

(A) 1D-³¹P NMR Spektrum der TPP-Switch-RNA in Gegenwart von 15 mM Mg²⁺. (B) 1D-³¹P NMR Spektrum von TPP in Gegenwart von 15 mM Mg²⁺. Die Resonanzen der α- und β-Phosphatgruppen sind gekennzeichnet und das Signal des Phosphatpuffers ist mit einem Stern versehen. (C) 1D-³¹P NMR Spektrum von TPP (0,5 mM) in Komplex mit TPP-Switch-RNA (0,8 mM) in Gegenwart von 15 mM Mg²⁺. Die chemischen Verschiebungsänderungen des gebundenen TPP im Gegensatz zum freien TPP sind durch Pfeile gekennzeichnet. (D) 1D-³¹P NMR Spektrum von TPP in Komplex mit TPP-Switch-RNA in Gegenwart von 15 mM Mg²⁺ und 100 μM Mn²⁺. Die Signale des gebundenen TPPs sind beinahe bis unter die Nachweisgrenze verbreitert, was dafür spricht, dass sie sich in der Nähe einer divalenten Metallbindungsstelle befinden.

Zur weiteren Untersuchung der lokalen Umgebung der gebundenen Phosphatgruppen des TPPs wurde der Komplex aus TPP-Switch-RNA gebunden an TPP in Gegenwart von 15 mM Mg²⁺ mit 100 μM Mn²⁺ titriert. Aufgrund des großen Überschusses an Mg²⁺, werden nur Signale in der Nähe von hochaffinen zweiwertigen Metallbindungsstellen durch paramagnetische Spinrelaxation beeinflusst. In Gegenwart von Mn²⁺ weisen beide Phosphatgruppenresonanzen so starke Linienverbreiterung auf, dass sie kaum noch detektierbar sind (Abbildung 3.30 D), wohingegen die Resonanzen der Phosphatpuffers und des RNA Rückgrats nur schwache Linienverbreiterung aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass beide Phosphatgruppen des TPP im Komplex mit der RNA in der Nähe von einer oder mehreren Magnesiumbindungsstellen liegen.

Da TMP mit schwächerer Affinität an die TPP-Switch-RNA bindet, wurde TMP mit steigenden Konzentrationen von TPP-Switch-RNA (0,1, 0,3 und 1 Äquivalent) titriert und mit ³¹P-NMR-Spektroskopie verfolgt. Das Signal des freien TMPs bei 0,23 ppm (Abbildung 3.31 A) wird durch Zugabe von RNA sukzessive Tieffeld verschoben und seine Linienbreite nimmt sukzessive zu (Abbildung 3.31 B-C). Bei einem 1:1 Verhältnis von TMP zu RNA wurde das

Signal so breit, dass es beinahe nicht mehr detektierbar war (Abbildung 3.31 D). Das deutet darauf hin, dass die Assoziation und die Dissoziation des Komplexes aus TPP-Switch-RNA mit TMP im intermediären Austausch auf der NMR-Zeitskala liegen, was einher geht mit der publizierten Bindungskonstante für diesen Komplex (Winkler et al., 2002a). Wichtiger noch, es deutet auch darauf hin, dass die Phosphatgruppe des gebundenen TMPs nahe an der RNA liegt und nicht aus dem Komplex ins Lösungsmittel herausragt.

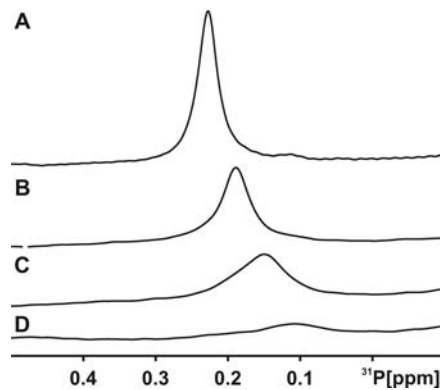


Abbildung 3.31

Titration von TMP mit steigenden Konzentrationen an TPP-Switch-RNA. (A) 1D- ^{31}P NMR Spektrum von 0,5 mM freiem TMP in Gegenwart von 15 mM Mg^{2+} . (B-D) 1D- ^{31}P Spektren von 0,5 mM TMP in Gegenwart von 15 mM Mg^{2+} mit 0,1, 0,3 und 1 Äquivalent TPP-Switch-RNA bei sonst gleich bleibenden Bedingungen.

Die Verbreiterung der ^{31}P -Signale des TPP im Zuge der Bindung an die TPP-Switch-RNA deutet auf eine spezifische Erkennung der Phosphatgruppen des Metaboliten hin. Durch Mn^{2+} -induzierte Linienverbreiterung konnte gezeigt werden, dass die Phosphatgruppen im TPP-RNA-Komplex in der Nähe von Magnesiumbindungsstellen liegen, so dass eine Mg^{2+} -vermittelte Ligandbindung möglich erscheint. Diese Ergebnisse erklären die zunehmende Bindungsaffinität von Metaboliten mit steigender Anzahl an Phosphatgruppen an die TPP-Riboswitch-RNA.

DISKUSSION

Die Evolution von Riboswitchen

Die hohe Konserviertheit von Riboswitch-Aptamerdomänen und ihr Vorkommen in allen drei Organismenreichen deutet zumindest für das Motiv der TPP-Aptamerdomäne darauf hin, dass es aus einer Zeit vor der evolutiven Trennung von Prokaryoten und Eukaryoten stammt, was vor ca. 1,5 Milliarden Jahren geschah. Auch die Art der von Riboswitchen erkannten Metaboliten, hier insbesondere die Koenzyme Adenosylcobalamin, FMN, SAM und TPP, deutet auf ihren frühen Ursprung in der Evolution hin, da es sich hierbei um Verbindungen handelt, von denen angenommen wird, dass sie zentrale katalytische Aufgaben in einer hypothetischen RNA-Welt übernommen haben könnten (White, 1976). In so einer RNA-Welt, die vor mehreren Milliarden von Jahren vor der Evolution von Proteinen existiert haben könnte, stehen einzig RNA-Moleküle für die Vorgänge des Lebens zur Verfügung und übernehmen somit sowohl die Speicherung der genetischen Information, als auch die Katalyse von lebenswichtigen Prozessen (Joyce, 1989). Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die heute bekannten Riboswitches nicht Relikte aus evolutionärer Frühzeit sind, sondern einfach den für ihre Aufgabe besten Mechanismus in der Biologie darstellen. Demnach könnten Riboswitches unabhängig voneinander entstanden sein und in einem evolutiv konvergierenden Prozess sich zu den heutigen bekannten Riboswitchen entwickelt haben. Dafür spricht unter anderem die Tatsache, dass es drei verschiedene Formen des SAM-Riboswitches gibt, die keine strukturellen Ähnlichkeiten untereinander aufweisen (Corbino et al., 2005; Fuchs et al., 2006). Abgesehen von der evolutionären Vorgeschichte von Riboswitchen scheint es offensichtlich, dass die heutige Biologie von diesem Modell der Genregulation profitiert. Möglicherweise bieten Riboswitches modernen Organismen ein genetisches System, das sie vor den metabolischen Kosten für die Synthese von proteinbasierten Regulationsmechanismen bewahrt. Dieser Vorteil könnte das verstärkte Auftreten von Riboswitchen in Prokaryoten erklären, da sie meist in einer Umgebung mit eher kärglichen Lebensbedingungen vorkommen.

Die hohe Homologie der Primär- und der Sekundärstruktur zwischen dem Adenin- und dem Guanin-bindenden Riboswitch in Verbindung mit der spezifischen Mutation des Nukleotids in Position 74, das an der Ausbildung eines intermolekularen Watson-Crick Basenpaars mit dem gebundenen Liganden beteiligt ist, deuten darauf hin, dass sich der Adenin- und der Guanin-bindende Riboswitch aus einem gemeinsamen evolutiven Vorgänger entwickelt haben. Der Adenin-bindende Riboswitch könnte durch eine zufällige C74U Mutation aus dem Guanin-bindenden Riboswitch hervorgegangen sein, da der Guanin-bindende Riboswitch häufiger als der Adenin-bindende Riboswitch aufzutreten scheint. Somit ist lediglich die Mutation eines spezifischen Nukleotides ausreichend, um die Spezifität des Guanin-bindenden Riboswitches hin zu Adenin zu ändern. Aufbauend auf dieser Mutation könnten sich die heute bekannten Adenin-bindenden Riboswitches aus dem Guanin-bindenden Riboswitch entwickelt haben.

Charakteristik der Ligandbindung von Purin-bindenden Riboswitchen

Die Aptamerdomänen des Guanin- und des Adenin-bindenden Riboswitches binden ihren jeweiligen Liganden auf sehr ähnliche Weise. In beiden Fällen werden zwischen dem gebundenen Purinliganden und der Riboswitch-RNA zwei Basenpaarungen beobachtet. Eine davon ist ein intermolekulares Watson-Crick Basenpaar: ein G:C Basenpaar für Guanin gebunden an den Guanin-bindenden Riboswitch und ein A:U Basenpaar für Adenin gebunden an den Adenin-bindenden Riboswitch. Das zweite Basenpaar ist eine zuvor noch nicht beschriebene Basenpaarung zwischen der N3/N9 Seite der Purinliganden und einem Uridin der RNA, was zur Ausbildung von mindestens zwei intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen führt. Diese intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen werden zwischen der N9H9 Iminogruppe und dem N3 des Purinliganden und der C4 Carbonylgruppe und der N3H3 Iminogruppe eines Uridins der RNA ausgebildet. Die Ausbildung eines intermolekularen Watson-Crick-Basenpaars ist die Grundlage für die Unterscheidung der unterschiedlichen Purinliganden durch den jeweiligen Riboswitch. Im Gegensatz dazu ist die Basenpaarung zwischen der N3/N9 Seite des Purinliganden und einem Uridin der RNA ein strukturelles Motiv, wodurch sowohl Guanin als auch Adenin von der RNA erkannt werden. Die Kombination dieser beiden Erkennungselemente untermauert die vorangegangene Beobachtung (Mandal und Breaker, 2004), nach der eine einzige C zu U Mutation die Spezifität des Guanin-bindenden Riboswitches von Guanin zu Adenin ändert und umgekehrt, ohne die Affinität der Wechselwirkung zu beeinflussen.

Das beobachtete Basenpaarungsmuster zwischen dem Purinliganden und der RNA erklärt auch, warum nicht Adenin selbst, sondern das verwandte, nicht in der Natur vorkommende 2,6-Diaminopurin der stärker bindende Ligand an die Adenin-bindende Riboswitch-RNA ist. Hier kann die zusätzliche Aminogruppe an Position 2 von 2,6-Diaminopurin zwei weitere Wasserstoffbrückenbindungen mit zwei C2 Carbonylgruppen der RNA ausbilden. Durch ähnliche Argumentation kann die vergleichbare Affinität von 2-Aminopurin im Vergleich zu Adenin an die A-Switch-RNA begründet werden (Mandal und Breaker, 2004). Hier ist der Verlust einer für A:U Watson-Crick Basenpaarungen typischen Wasserstoffbrückenbindung durch den Verlust der Aminogruppe in Position 6 des Liganden durch die Ausbildung zweier zusätzlicher Wasserstoffbrückenbindungen unter Verwendung der Aminogruppe in Position 2 des Liganden kompensiert.

Die Beobachtung, dass 6-Bromo-2-Aminopurin nicht an die A-Switch-RNA bindet, zeigt, dass die 6-Bromogruppe einen negativen Effekt auf die Ligandbindung hat. Dieser negative Effekt könnte durch die räumlich nahe Positionierung der elektronegativen 6-Bromogruppe des Liganden und der elektronegativen C4 Carbonylgruppe des Uridins, das das intermolekulare Watson-Crick Basenpaar ausbildet, hervorgerufen werden. In der Ligand-gebundenen Form wären diese beiden partiell negativ geladenen Gruppen weniger als 3 Å (Serganov et al., 2004)

voneinander entfernt, so dass die daraus resultierende Ladungsrepulsion eine Spannung in der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung hervorrufen würde, die zum Verlust der Bindung von 6-Bromo-2-aminopurin an die Adenin-bindende Riboswitch-RNA führen könnte. Diese Annahme scheint plausibel, da in der Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen die Ligandbindung wieder hergestellt werden kann. In der berichteten Röntgenstruktur ist ein Mg^{2+} -Ion ($Mg5$) in 5 Å Abstand von beiden negativ geladenen Gruppen zu finden, was die hervorgerufene Ladungsrepulsion verringern könnte und dadurch zur Ligandbindung führen könnte. Durch NMR Experimente kann in Lösung diese Mg^{2+} -Bindungsstelle jedoch nicht gefunden werden, es wird aber eine andere Mg^{2+} -Bindungsstelle in der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung lokalisiert. Bindung von Mg^{2+} an diese mit NMR nachgewiesene Bindungsstelle kann wegen ihrer größeren Entfernung nicht direkt die durch die negativ geladenen Gruppen hervorgerufene Ladungsrepulsion verringern. Vielmehr könnte die Bindung von Mg^{2+} an diese Mg^{2+} -Bindungsstelle die gesamte Architektur der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung stabilisieren, was zur Wiederherstellung der Ligandbindungsfähigkeit führen könnte.

Im Gegensatz dazu war jedoch für die Bindung aller anderen in dieser Arbeit untersuchten Purinliganden an die Purin-bindenden Riboswitch-RNA keine Mg^{2+} -Ionen nötig.

Der Bindungsaffinitätsverlust von Guanin hin zu Hypoxanthin an die Guanin-bindende Riboswitch-RNA kann durch den Verlust der 2-Aminogruppe auf ähnliche Weise erklärt werden, wie es oben für den Bindungsaffinitätsverlust von 2,6-Diaminopurin hin zu Adenin an die Adenin-bindende-Riboswitch-RNA beschrieben wurde. Obwohl durch biochemische Untersuchungen die Bindungsaffinität von 6-Thioguanin an die G-Switch-RNA mit ca. 1 μM bestimmt wurde und somit 200 fach schlechter, als die Bindungsaffinität von Guanin (Mandal et al., 2003), deuten die NMR Daten auf eine submikromolare Bindungsaffinität hin. Die signifikant unterschiedlichen chemischen Verschiebungen der Aminogruppen von 6-Thioguanin und der Aminogruppe des an der Ligandbindung beteiligten Cytidins im G-Switch-RNA-6-Thioguanin-Komplexes im Gegensatz zu dem Komplex mit Guanin sind wahrscheinlich auf die unterschiedliche chemische Umgebung zurückzuführen, die von der Schwefelgruppe in 6-Thioguanin hervorgerufen wird.

Es wird eine ausgeprägtere chemische Verschiebungsänderung für die Aminogruppe des Cytidins als für die Aminogruppe des gebundenen Liganden beobachtet, was durch ihre größere räumliche Nähe zu der Schwefelgruppe zu erklären ist. Zusätzlich konnte in einem NOESY Spektrum erkannt werden, dass das tieffeldigere Signal der Cytidin Aminogruppe, das eine stärkere chemische Verschiebungsänderung als das hochfeldigere Signal zeigt, auch einen stärkeren NOE zur Iminogruppe des gebundenen Liganden hat und somit näher an der durch 6-Thioguanin als Ligand eingeführten Schwefelgruppe liegt.

Es ist unwahrscheinlich, dass die unterschiedlichen chemischen Verschiebungen der beiden Aminogruppen auf einen Unterschied in der Rotationsbarriere der Aminogruppen zwischen den Komplexen mit den unterschiedlichen Liganden zurückzuführen ist. Hierbei würde es

sich um einen chemischen Austauschprozess handeln, in dem die Rotation um die C-N Bindung der Aminogruppen im Komplex mit 6-Thioguanin im langsamen Austausch vorläge und im Komplex mit Guanin der Austausch in Richtung zum intermediären Austausch verschoben wäre. Das ist unwahrscheinlich, da sich normalerweise beim Übergang vom langsamen Austausch hin zum intermediären Austausch nicht die chemische Verschiebung der Signale ändert, sondern lediglich ihre Linienbreite zunimmt. Erst kurz vor der Koaleszenz tritt eine geringe chemische Verschiebungsänderung beider Signale in Richtung ihres gemittelten Signals, das im schnellen Austausch zu beobachten ist, auf.

Interessanterweise konnte in den hier dargestellten Experimenten keine Wechselwirkung zwischen der Hoogsteen Seite des Purinliganden und der Purin-bindenden Riboswitch-RNA detektiert werden. Die Hoogsteen Seite von Guanin und Adenin unterscheiden sich von einander. Zwei Wasserstoffbrückenakzeptorgruppen (N7 und O6) treten in Guanin auf, wohingegen Adenin eine Wasserstoffbrückenakzeptorgruppe (N7) und einen Wasserstoffbrückendonorgruppe (6-Aminogruppe) an dieser Stelle besitzt. Dennoch unterscheidet sich nur ein Nukleotid systematisch in der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung zwischen dem Guanin- und dem Adenin-bindenden Riboswitch (Mandal et al., 2003; Mandal und Breaker, 2004). Dieses Nukleotid ist das an der intermolekularen Watson-Crick Basenpaarung mit dem Liganden beteiligte Nukleotid. Würden jedoch die Purinliganden mit ihrer Hoogsteen Seite eine Wechselwirkung unter Einbeziehung ihrer beiden funktionellen Gruppen mit der RNA eingehen, so würde dies einen systematischen Unterschied in den Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzungen zwischen der Adenin- und der Guanin-bindenden Riboswitch-RNA erfordern, was jedoch nicht beobachtet wird (Mandal et al., 2003; Mandal und Breaker, 2004). Alternativ könnte eine RNA-Ligand-Wechselwirkung, die die Hoogsteen Seite des gebundenen Liganden einbezieht, auf die N7 Position des Purinringes beschränkt sein. Die HNN-COSY Experimente und die Experimente mit dem 7-Deazaguanin-G-Switch-RNA-Komplex zeigen jedoch, dass weder eine NH- noch eine NH₂-Gruppe der RNA an einer Wasserstoffbrückenbindung mit der N7 Position des Liganden beteiligt ist. Eine NH- bzw. NH₂-Gruppe der RNA ist nicht beteiligt, da die Anzahl der NH- und NH₂-Resonanzen der G-Switch-RNA in Komplex mit 7-Deazaguanin identisch mit der Anzahl im Guanin-G-Switch-RNA-Komplex ist. Anhand der Zuordnung der Iminoressonanzen der G-Switch-RNA in Komplex mit Guanin wird erkannt, dass lediglich Iminoressonanzen von Nukleotiden der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung der G-Switch-RNA in Komplex mit 7-Deazaguanin im Gegensatz zu Guanin ihre chemische Verschiebung ändern. Die stärkste chemische Verschiebungsänderung zeigt die Iminoressonanz von U22, das mit weniger als 4 Å die der Position 7 des gebundenen-Liganden am nächsten gelegene Iminogruppe ist.

Demnach wird die N7 Position des Liganden entweder nicht von der RNA erkannt oder sie bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit einer 2'-OH-Gruppe aus, die einzige weitere in RNA auftretende funktionelle Gruppe, die als Wasserstoffbrückendonor dienen kann. Die

höhere Affinität der RNA zu Guanin im Vergleich zu 7-Deazaguanin (Mandal et al., 2003) favorisiert die zweite Annahme. Diese Annahme, die auf den in dieser Arbeit gezeigten NMR-Daten basiert, konnte durch die publizierten Röntgenstrukturen der Purin-Riboswitch-RNAs gebunden an ihre jeweiligen Liganden bestätigt werden (Batey et al., 2004; Serganov et al., 2004).

Durch die Untersuchung der Bindungsmechanismen von unterschiedlichen Purinanaloga an die Guanin- bzw. die Adenin-bindende Riboswitch-RNA wurde erkannt, dass die für die Ligandbindung ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen unterschiedliche Prioritäten haben. So zeigte die Bindung des Liganden 6-Bromo-2-aminopurin an den Adenin-bindenden Riboswitch, dass die Wasserstoffbrückenbindung ausgehend von der Position 6 eine höhere Priorität hat, als die Wasserstoffbrückenbindungen ausgehend von Position 2. Das kann auch durch den Vergleich der Dissoziationskonstanten von Adenin und 2-Aminopurin an den Adenin-bindenden Riboswitch beobachtet werden. Adenin und 2-Aminopurin haben eine identische Dissoziationskonstante (Mandal und Breaker, 2004), obwohl 2-Aminopurin zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausgehend von Position 2 ausbilden kann und keine von Position 6 und Adenin eine Wasserstoffbrückenbindung von Position 6 und keine von Position 2 ausbildet. Auch scheint im Adenin- und im Guanin-bindenden Riboswitch der Beitrag der Wasserstoffbrückenbindungen von Position 2 des Liganden zur Bindungsaffinität unterschiedlich zu sein, entgegen dem, was der Bindungsmechanismus vermuten lässt. Des Weiteren führt im Adenin-bindenden Riboswitch die Ausbildung von zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausgehend von Position 2 von Adenin zu 2,6-Diaminopurin zu einem Affinitätsanstieg von 290 nM, wohingegen die Bindungsaffinität im Guanin-bindenden Riboswitch von Guanin zu Hypoxanthin, wo auch zwei weitere Wasserstoffbrückenbindungen in Position 2 ausgebildet werden, nur zu einem Affinitätsanstieg um 40 nM. Diese Betrachtungen veranschaulichen, dass die einzelnen Wasserstoffbrückenbindungen eines Purinliganden an seinen Purin-bindenden Riboswitch unterschiedliche Beiträge zur Bindungsaffinität liefern und dass nicht nur die Art der Wasserstoffbrückenbindung, sondern das gesamte chemische Umfeld einer spezifischen Wasserstoffbrückenbindung in Betracht gezogen werden muss, um annähernd eine quantitative Aussage über den Beitrag einer Wasserstoffbrückenbindung zur Bindungsaffinität zu machen.

Das hier beschriebene Basenpaarungsmuster zwischen dem Purinliganden und der Riboswitch-RNA wurde bislang in noch keiner RNA bzw. keinem RNA-Ligand-Komplex beobachtet. Weder der SAM-bindende Riboswitch, der eine vergleichbare Affinität zu seinem Liganden aufweist, noch die SELEX-Aptamere für GTP und ATP, die eine vergleichbare bzw. geringere Affinität für ihren Liganden aufweisen, erkennen den Nukleobasenrest des Liganden über eine klassische Watson-Crick Basenpaarung (Carothers et al., 2006; Dieckmann

et al., 1996; Jiang et al., 1996; Montange und Batey, 2006). Somit basiert die hohe Affinität der Purin-Riboswitch Aptamerdomänen für ihre Liganden nicht zwangsläufig auf einer Watson-Crick Basenpaarung zwischen der RNA und dem Liganden. Es scheint, als spiegelte der einmalige Liganderkennungsmechanismus der Adenin- und Guanin-bindenden Riboswitche die spezifischen Anforderungen für Selektivität wider, durch den in der zellulären Umgebung die nötigen regulatorischen Funktionen der Riboswitche ausgeführt werden können. In Anbetracht dessen ist die gezielte Erkennung der N9H9 Iminogruppe bei der Bindung des Purinliganden geschickt, da diese Gruppe in Nucleosiden und Nucleotidderivaten, die verbreitet in der Zelle vorkommen, keine Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann, da sie sterisch blockiert ist.

Konformationelle Änderungen in den Aptamerdomänen der Purin-bindenden Riboswitche

Viele RNA-Moleküle binden ihre Liganden durch einen *induced fit*-Mechanismus. Hierbei ist die Ligandbindungstasche in der freien Form oft unstrukturiert und weist eine größere Dynamik als in der Ligand-gebundenen Form auf. Die Ligandbindung an eine unstrukturierte Bindungstasche hat einen hohen entropischen Preis, was sich negativ auf die freie Energie der Bindung niederschlägt (Leulliot und Varani, 2001). Der Vorteil ist jedoch, dass der Ligand vollständig von der RNA eingeschlossen werden kann, wodurch möglichst viele funktionelle Gruppen des Liganden erkannt werden und die größte mögliche Anzahl an intermolekularen Wechselwirkungen ausgebildet werden kann. Andere RNAs minimieren den entropischen Beitrag der freien Bindungsenergie, indem sie dem Liganden eine vorgeformte Bindungstasche präsentieren (Klein und Ferre-D'Amare, 2006; Ohlenschläger et al., 2004; Stoldt et al., 1999). Die Aptamerdomänen von Riboswitchen tragen oft konservierte Sequenzelemente, die nicht direkt an der Ligandbindung beteiligt sind. Strukturelle Untersuchungen von RNA-Ligand-Komplexen dieser Riboswitche haben verdeutlicht, dass diese Elemente an RNA-Tertiärstrukturen beteiligt sind, die die globale Struktur dieser RNAs stabilisieren (Batey et al., 2004; Edwards und Ferre-D'Amare, 2006; Montange und Batey, 2006; Noeske et al., 2007a; Noeske et al., 2007b; Serganov et al., 2006; Serganov et al., 2004; Thore et al., 2006). In manchen Fällen konnte gezeigt werden, dass die Zerstörung dieser Strukturelemente die Ligandbindungsfähigkeit der RNA aufhebt (Batey et al., 2004; Lemay et al., 2006; McDaniel et al., 2005), und sie somit für die Riboswitchfunktion unverzichtbar sind. Studien an den natürlich vorkommenden Varianten sowohl des Hammerhead- (De la Pena et al., 2003; Khvorova et al., 2003) als auch des Hairpin-Ribozyms (Murchie et al., 1998) aber auch des glmS-Ribozyms (Klein und Ferre-D'Amare, 2006) haben gezeigt, dass diese Ribozyme Tertiärstrukturelemente entfernt vom katalytischen Zentrum aufweisen, die die globale

Faltung der Ribozyme vorformen, wodurch die katalytische Aktivität gesteigert wird und auch die Abhängigkeit von divalenten Kationen abnimmt.

In dieser Arbeit wurden die Ligand-induzierten konformationellen Veränderungen in den Aptamerdomänen der Purin-bindenden Riboswitche in Lösung mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert (Abb. 4.1). Die NMR Daten liefern keine Evidenz für eine Strukturierung der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung in der freien Form der Purin-bindenden Riboswitch-RNAs. Diesbezüglich konnte kein Unterschied zwischen der Adenin- und der Guanin-bindenden Riboswitch-RNA erkannt werden, die sich in diesem Bereich lediglich durch den Pyrimidinrest an Position 74 unterscheiden, der im Zuge der Ligandbindung eine intermolekulare Watson-Crick Basenpaarung mit dem gebundenen Liganden eingeht. Es konnte also festgestellt werden, dass beide Purin-bindenden Riboswitche ihren Liganden in einem *induced fit*-Mechanismus binden, wodurch der gebundene Purinligand vollständig von der RNA umgeben wird und somit die größte mögliche Anzahl an intermolekularen Wechselwirkungen ausgebildet werden kann.

Die Purin-bindenden Riboswitch-RNAs verhalten sich unterschiedlich im Bezug auf die Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung in ihrer freien Form. Dieses Tertiärstrukturelement besteht hauptsächlich aus zwei Basenquartetts, die durch Nukleotide der Schlaufen II und III ausgebildet werden. Es konnte gezeigt werden, dass in der Guanin-bindenden Riboswitch-RNA dieses Tertiärstrukturelement in der freien Form bereits ausgebildet ist, wohingegen die Adenin-bindende Riboswitch-RNA dieses Element in ihrer freien Form nicht aufweist. Kleine chemische Verschiebungsänderungen für manche Nukleotide aus den Helices II und III und der Nukleotide der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung im Zuge der Ligandbindung an die Guanin-bindende Riboswitch-RNA deuten auf eine erhöhte Dynamik dieser Strukturelemente in der freien Form hin. Demnach sind die Helices in der freien Form der Guanin-bindenden Riboswitch-RNA bereits durch die Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung miteinander verbunden und die Ligandbindung bringt lediglich eine Änderung des Packungsmusters zwischen den Helices mit sich, was in einer Abnahme der Dynamik dieser Strukturelemente resultiert. Die NMR-Daten zusammengenommen mit dem Ergebnis der nativen Gelelektrophorese und den *in-line Probing* Daten zeigen eine stabile Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung in der freien Form der RNA auf. Demnach kann ein Gleichgewicht zwischen einer offenen und einer geschlossenen Form der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung in der freien Form der Guanin-bindenden Riboswitch-RNA ausgeschlossen werden. Die Gegenwart von Magnesium stabilisiert diese Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung, ist aber nicht essentiell für ihre Ausbildung.

Im Gegensatz zur Guanin-bindenden Aptamerdomäne werden in der eng verwandten Adenin-bindenden Aptamerdomäne keine stabilen Tertiärstrukturwechselwirkungen zwischen den Schlaufen II und III in der freien Form gefunden. Das zeigt, dass die Gegenwart

der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung keine Voraussetzung für die Ligandbindung ist, wie es auch für die G37A/C61U Mutante der Guanin-Aptamerdomäne gezeigt wurde. Somit wird für die G37A/C61U Mutante der Guanin-Aptamerdomäne und die Adenin-Aptamerdomäne ein *induced fit*-Mechanismus im Zuge der Ligandbindung sowohl für die Ligand-bindende Drei-Wege-Kreuzung, als auch für die Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung beobachtet. Allerdings handelt es sich im Fall der G37A/C61U Mutante der Guanin-Aptamerdomäne um einen Mg^{2+} -abhängigen Prozess.

In der freien Form der Adenin-Aptamerdomäne wird anstelle der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung jedoch ein alternatives Basenpaarungsmuster beobachtet, an dem wahrscheinlich Nukleotide der Schlaufen beteiligt sind und dessen Ausbildung mit der Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung konkurriert. Die Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung kann jedoch in Gegenwart von Mg^{2+} aber dennoch in Abwesenheit des Liganden induziert werden, was in Übereinstimmung mit Fluoreszenzdaten ist. In Fluoreszenzexperimenten am *add* Adenin-Riboswitch aus *V.vulnificus* wurde beobachtet, dass 2-Aminopurin, das für zwei unterschiedliche Nukleotide in der Schlaufe II eingebaut wurde, bei Zugabe von 2 mM Mg^{2+} einen drastischen Fluoreszenzabfall zeigt, was für die spontane Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung unter diesen Bedingungen steht (Rieder et al., 2007). Auch konnte am gleichen System durch FRET-Experimente die weitgehende Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung in Gegenwart von 2 mM Mg^{2+} beobachtet werden (Lemay et al., 2006). Somit zeigen die hier angefertigten NMR-Daten, bestätigt durch Fluoreszenzdaten, dass ein kleiner Sequenzunterschied in den apikalen Basenpaaren der Helix II und der Helix III und in einem Nukleotid der Schlaufe II zwischen dem *pbuE* Adenin- und dem *xpt-pbuX* Guanin-bindenden Riboswitch, zu signifikanten Unterschieden in der freien Form der RNA führt und dass sich die Mg^{2+} - bzw. Ligand-induzierten Faltungswege der RNA ändern (Abb. 4.1). Interessanterweise wird in den drei apikalen Basenpaaren ein identisches Basenpaarungsmuster auch im *add* Adenin-Riboswitch sowohl aus *V.vulnificus* als auch aus *V.parahaemolyticus* gefunden und alle bekannten Adenin-Riboswitche tragen in diesen drei Basenpaaren nur A:U oder nicht-kanonische Basenpaare. Im Gegensatz dazu tragen fast alle bekannten Guanin-bindenden Riboswitche in diesen drei Basenpaaren Watson-Crick Basenpaarungen, von denen mindestens eine ein G:C Basenpaar ist. Diese Sequenzanalyse erklärt demnach die unterschiedliche Konformation der A30G/U40C Mutante des Adenin-bindenden Riboswitches in der freien Form. Das Ersetzen eines A:U Basenpaars durch ein G:C Basenpaar am apikalen Ende der Helix II führt zur Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung in der freien Form in Abwesenheit von Mg^{2+} . Somit ist die geringere Stabilität der apikalen Basenpaare des Adenin-bindenden Riboswitches im Gegensatz zum Guanin-bindenden Riboswitch ausschlaggebend für die Abwesenheit der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung in der freien Form. Interessanterweise konnte durch Vergleich der Ligandbindungsaffinitäten von unterschiedlichen Guanin-bindenden

Riboswitchen abgeleitet werden, dass die Ligandbindungsaffinität unterschiedlicher Guaninbindender Riboswitche proportional mit der Stabilität der Helix II zunimmt (Mulhbachter und Lafontaine, 2007). Diese Beobachtung ist konsistent mit den in dieser Arbeit erbrachten Daten bezüglich der Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung in Abhängigkeit der Stabilität der Helix II für den Adenin-bindenden Riboswitch und den an anderer Stelle gezeigten Verlust der Ligandbindungs kompetenz in Abwesenheit der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung (Batey et al., 2004; Lemay et al., 2006).

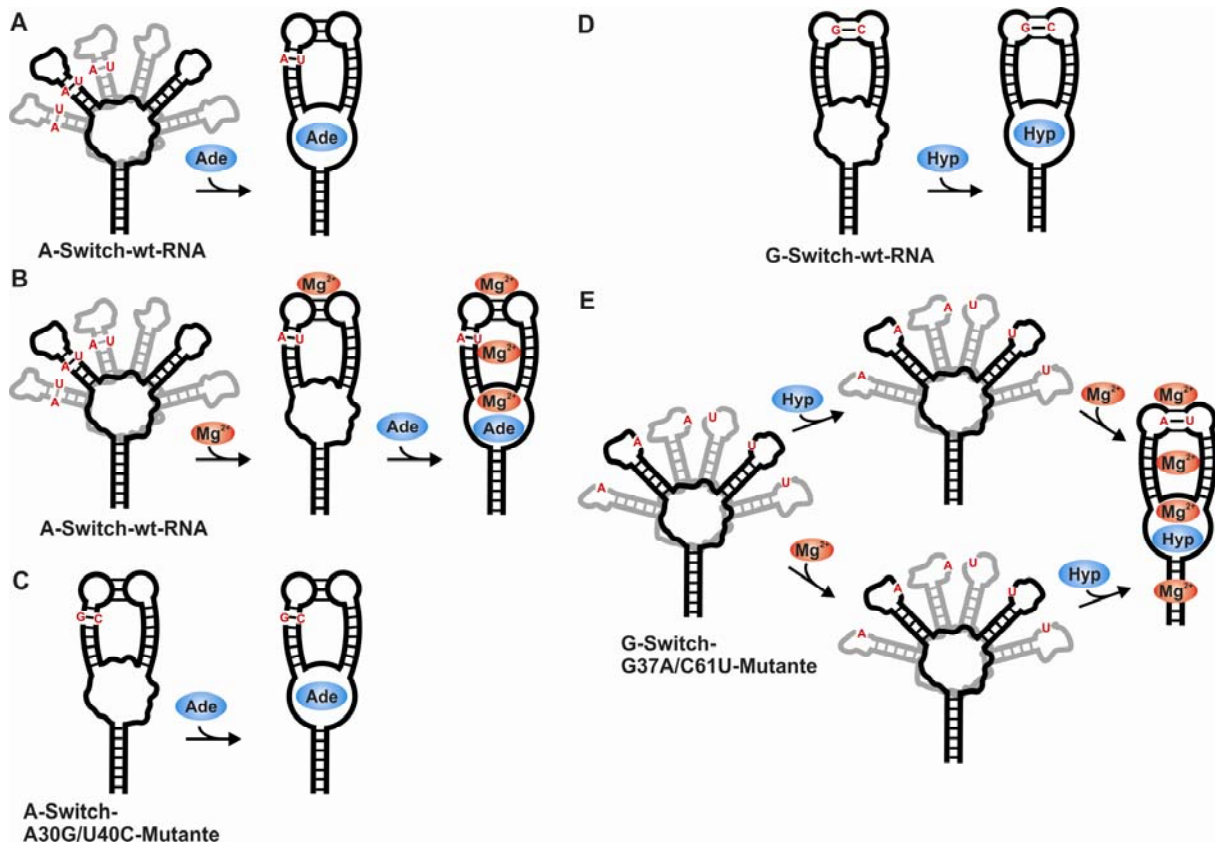


Abbildung 4.1

Faltungswege der Adenin- und der Guanin-bindenden Riboswitch Aptamerdomänen. (A) Die freie Form der *pbuE* Adenin-bindende Aptamerdomäne zeigt ein Ensemble ineinander übergehender Konformationen. Bindung von Adenin induziert gleichzeitig die Faltung der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung und der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung. (B) Die Gegenwart von Mg^{2+} induziert die Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung. Darauf folgende Bindung von Adenin führt zum vollständig ausgebildeten RNA-Ligand-Komplex mit mindestens drei Mg^{2+} -Bindungsstellen. (C) Eine stabilisierende Mutation in Helix II führt zur Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung der Adenin-bindenden Riboswitch-RNA in der freien Form. Bindung von Adenin resultiert lediglich in einer Strukturierung der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung. (D) Im Gegensatz zur Adenin-bindenden Aptamerdomäne ist in der *xpt-pbuX* Guanin-bindenden Aptamerdomäne die Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung in der freien Form bereits ausgebildet, so dass Ligandbindung lediglich in einer Strukturierung der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung resultiert, vergleichbar mit der A-Switch-A30G/U40C-Mutante (C). (E) Die Mutation eines weitreichenden an der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung beteiligten G:C Watson-Crick Basenpaars zu einem A:U Basenpaar, führt zum Verlust der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung in der freien Form der RNA. Weder die Anwesenheit von Mg^{2+} noch von Hypoxanthin allein vermag die RNA zu strukturieren. So zeigt die freie Form dieser RNA bzw. diese RNA in Anwesenheit von entweder Mg^{2+} oder Hypoxanthin ein Ensemble von ineinander übergehenden Konformationen, vergleichbar mit der freien Form der A-Switch-wt-RNA. Lediglich die gleichzeitige Anwesenheit von Mg^{2+} und Hypoxanthin führen zur Ligandbindung und der damit einhergehenden Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung.

Die unterschiedlichen Konformationen der freien Guanin-bindenden Riboswitch-RNA und der Adenin-bindenden Riboswitch-RNA führen durch die unterschiedlichen Faltungswege der beiden RNAs zu unterschiedlichen entropischen Kosten im Zuge der Ligandbindung. Der

höhere entropische Beitrag in der Adenin-bindenden Riboswitch-RNA könnte teilweise durch die bei der Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung frei werdende freie Energie kompensiert werden. Die unterschiedlichen Faltungswege sollten sich auch auf die Kinetik der Ligandbindung an die jeweilige RNA auswirken. In der Abwesenheit von Mg^{2+} sollte die Assoziationskonstante (k_{on}) von Adenin an die A-Switch-wt-RNA langsamer sein als für Guanin an die G-Switch-wt-RNA und mit steigenden Mg^{2+} -Konzentrationen sollte sich der k_{on} -Wert von Adenin stärker ändern, als der von Guanin an seine jeweilige RNA. Die Kinetik der Ligandbindung von Hypoxanthin an die Guanin-bindende Aptamerdomäne wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe durch NMR-Spektroskopie charakterisiert (Buck et al., 2007). Eine ähnliche Untersuchung der Bindung von Adenin an die Adenin-bindende Aptamerdomäne sollte unterschiedliche Kinetiken im Bezug auf die Faltung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung ergeben. Diese Faltungskinetik sollte sich dramatisch in Gegenwart von Mg^{2+} ändern. Mit der in dieser Arbeit charakterisierten A30G/U40C Mutante des Adenin-bindenden Riboswitches hat man ein System zur Hand, das es erlauben würde, die Kinetik der Ligandbindung von der Kinetik der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung getrennt zu betrachten bzw. den Einfluss von Mg^{2+} alleine auf die Ligandbindungskinetik zu betrachten. Die A30G/U40C-Mutante des Adenin-bindenden Riboswitches würde auch eine kinetische Untersuchung der Mg^{2+} -induzierten Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung zulassen. Die Kinetik der Ligandbindung ist ein extrem kritischer Parameter für die Funktion von kinetisch kontrollierten Riboswitchen.

Weiterhin könnten die unterschiedlichen Faltungswege einen Einstiegspunkt für das Entwerfen von selektiven Inhibitoren gegen Purin-bindende Riboswitche darstellen (Blount und Breaker, 2006). Die große Übereinstimmung der Strukturen der Aptamer-Ligand-Komplexe der Purin-bindenden Riboswitche wird es schwierig machen, Inhibitoren zu entwerfen, die spezifisch gegen einen Teil dieser Riboswitche gerichtet sind, wie z.B. Riboswitche aus einem bestimmten Bakterium. Jedoch könnten Inhibitoren für Selektivität sorgen, die gegen die freie Form von Riboswitchen gerichtet sind, in der sich kleine Sequenzunterschiede auf ihre Konformation auswirken können. Für manche dieser Riboswitche könnte es interessant sein, Inhibitoren gegen die Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung zu entwerfen, da diese für die Ligandbindung essentiell ist (Batey et al., 2004). Riboswitche mit einer vorgeformten Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung würden dadurch jedoch nicht in ihrer Funktion beeinflusst werden.

Divalente Kationbindungsstellen in den Purin-bindenden Aptamerdomänen

Mögliche divalente Kationbindungsstellen in Lösung wurden für den Komplex aus Adenin mit der Adenin-bindenden Aptamerdomäne und für den Komplex aus Hypoxanthin mit der Guanin-bindenden Aptamerdomäne mit drei unterschiedlichen Methoden bestimmt: Mg^{2+} -induzierte chemische Verschiebungsänderungen, Mn^{2+} -induzierte Linienverbreiterung und intermolekulare NOEs zwischen $Co(NH_3)_6^{3+}$ und den Iminprotonen der RNA. Für den Adenin-A-Switch-wt-RNA-Komplex wurde zusätzlich noch die Methode der $Co(NH_3)_6^{3+}$ -induzierte chemische Verschiebungsänderung angewandt. Alle unterschiedlichen Methoden lieferten konsistente Ergebnisse, was die Verlässlichkeit jeder einzelnen Methode untermauert. Da durch $Co(NH_3)_6^{3+}$ -basierte Experimente alle divalenten Kationbindungsstellen, die durch Mg^{2+} und Mn^{2+} basierte Experimente aufgedeckt wurden, bestätigt werden können, wird deutlich, dass alle identifizierten Kationbindungsstellen durch Wechselwirkung der äußeren Ligandensphäre des Kations mit der RNA entstehen.

Für den Adenin-bindenden Riboswitch wurden drei verschiedene divalente Kationbindungsstellen durch alle Methoden übereinstimmend identifiziert. Zwei dieser divalenten Kationbindungsstellen, eine befindet sich in der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung und die andere am unteren Ende der Helix III, konnten durch gebundene Mg^{2+} -Ionen in der Röntgenstruktur bestätigt werden (Serganov et al., 2004). Eine dritte divalente Kationbindungsstelle befindet sich in der Nähe der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung und konnte nicht in der Röntgenstruktur gefunden werden. Die Mg^{2+} -induzierte Ausbildung der Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung der Adenin-bindenden Aptamerdomäne in der Ligand-ungebundenen Form konnte jedoch hier durch NMR und unabhängig davon in FRET-Experimenten (Lemay et al., 2006) bestimmt werden, was ihre Existenz untermauert. Eine vierte divalente Kationbindungsstelle konnte nur mit Mn^{2+} und $Co(NH_3)_6^{3+}$ basierten Experimenten ausfindig gemacht werden. Interessanterweise ist an dieser vierten möglichen divalente Kationbindungsstelle in der Röntgenstruktur ein Mg^{2+} -Ion aufzufinden, was für eine niedrige Affinität für divalente Kationen an dieser Stelle spräche. Zwei in der Röntgenstruktur gebundene Mg^{2+} -Ionen (Mg3 und Mg5) konnten nicht in Lösung nachgewiesen werden. Mg3 ist an Kristallpackungseffekten beteiligt, wodurch diese Mg^{2+} -Bindungsstelle deswegen in Lösung nicht detektierbar sein sollte. Dass Mg5 in der Röntgenstruktur nicht nachweisbar ist, könnte darauf basieren, dass lediglich Guanosin- und Uridin-Iminogruppen als Sonden für die divalente Kationbindung verwendet wurden. Dadurch würde der Nachweis von divalenten Kationbindungsstellen in A,C-reichen Regionen der Struktur scheitern. Da jedoch die Iminogruppen von U74 und U75 in der Nähe von Mg5 liegen, scheint es, als sei diese durch Röntgenkristallographie identifizierte divalente Kationbindungsstelle in Lösung wenig oder gar nicht besetzt. Auf der anderen Seite wurde beobachtet, dass $Co(NH_3)_6^{3+}$ -Ionen an eine

Bindungsstelle in Helix I binden, die weder in der Röntgenstruktur noch durch Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Titrationsexperimente als Bindungsstelle identifiziert werden konnte. Aufgrund ihrer hohen Ladungsdichte haben $Co(NH_3)_6^{3+}$ -Ionen eine 10-fach höhere Affinität und induzieren größere chemische Verschiebungsänderungen als andere divalente Kationen, was vermuten lässt, dass hier eine sehr schwache Bindungsstelle identifiziert wurde. Die Verlässlichkeit der Bindungsstellen, die durch $Co(NH_3)_6^{3+}$ -Ionen identifiziert werden, wurde kürzlich in Frage gestellt (Fan et al., 2005). Die hier gezeigten Daten zeigen aber, dass $Co(NH_3)_6^{3+}$ eine nützliche Sonde für divalente Kationbindungsstellen darstellt, solange diese durch Kontakte mit der Ligandensphäre ausgebildet werden. Sie zeigen aber auch, dass der alleinige Verlass auf $Co(NH_3)_6^{3+}$ detektierte Bindungsstellen zu einer Überschätzung der Anzahl der Bindungsstellen führen könnte.

Im Komplex von Hypoxanthin an die Guanin-bindende Aptamerdomäne konnten vier divalente Kationbindungsstellen durch Mg^{2+} -induzierte chemische Verschiebungsänderung, Mn^{2+} -induzierte Linienverbreiterung und intermolekulare NOEs von $Co(NH_3)_6^{3+}$ -Ionen zu Protonen der RNA gefunden werden. Da alle diese Bindungsstellen auch durch $Co(NH_3)_6^{3+}$ -Ionen nachgewiesen werden konnten, handelt es sich auch hier ausschließlich um Wechselwirkungen zwischen der Ligandensphäre des Kations und der RNA. Eine dieser Bindungsstellen ist in Helix I lokalisiert und wurde nicht in der Röntgenstruktur gefunden (Batey et al., 2004), was sehr wahrscheinlich auf die Mutation des Wildtyp G79:U17 Basenpaars zu einem kanonischen Watson-Crick Basenpaar in dem kristallisierten Konstrukt zurückzuführen ist. Eine fünfte Bindungsstelle (U30, G31) wurde lediglich durch Mg^{2+} - und $Co(NH_3)_6^{3+}$ -Ionen identifiziert, so dass es sich hier eventuell nur um eine schwache Bindungsstelle handelt. Es fällt auf, dass $Co(NH_3)_6^{3+}$ -Ionen sehr starke intermolekulare NOEs mit den Iminogruppen der Uridine, die an G:U Basenpaaren beteiligt sind, ausbilden. In G:U Basenpaaren ragt die partiell negativ geladene C4 Carbonylgruppe des Uridins weit in die große Furche hinaus, wodurch eine besonders attraktive Wechselwirkung mit divalenten Kationen entstehen kann. Aus röntgenkristallographischen Untersuchungen ist bekannt, dass eine Sequenz, die der Region um das G57:U69 Basenpaar entspricht, eine gute, universelle $Co(NH_3)_6^{3+}$ -Bindungsstelle darstellt (Keel et al., 2007). Interessanterweise ist genau an dieser Stelle in der Röntgenstruktur ein gebundenes $Co(NH_3)_6^{3+}$ -Ion aufzufinden. Solche hochaffine, universelle $Co(NH_3)_6^{3+}$ -Bindungsstellen, die sich durch einen hohen Ordnungsparameter und eine hohe Besetzungswahrscheinlichkeit der gebundenen $Co(NH_3)_6^{3+}$ -Ionen auszeichnen, können durch das anormale Signal von Cobalt dazu beitragen, dass in der Röntgenkristallographie auftretende Phasenprobleme zu lösen und so zur Strukturaufklärung zu führen (Keel et al., 2007).

Der Vergleich der divalenten Kationbindungsstellen der beiden Purin-bindenden Riboswitche zeigt, dass alle im Adenin-bindenden Riboswitch identifizierten Bindungsstellen auch im Guanin-bindenden Riboswitch gefunden werden. Zwei dieser Bindungsstellen, eine in der

Schlaufen-Schlaufen-Wechselwirkung und die andere in der Ligand-bindenden Drei-Wege-Kreuzung, sind in phylogenetisch hoch konservierten Bereichen lokalisiert, was ihnen eine besonders wichtige Rolle zukommen lässt. Eine weitere in beiden Purin-bindenden Riboswitchen auftretende Bindungsstelle ist am unteren Ende von Helix III lokalisiert. In diesem nicht konservierten Bereich kommt es durch die parallele Anordnung der Helices II und III zu einer großen negativen Ladungsdichte, hervorgerufen durch die enge Nachbarschaft ihrer Phosphatrückgrate. Die Konserviertheit dieser Bindungsstelle in beiden Purin-bindenden Riboswitchen scheint weniger sequenzbasiert zu sein, sondern eher auf der äußerst ähnlichen dreidimensionalen Struktur der RNA in diesem Bereich zu basieren und der Ladungsabschirmung zu dienen. Da die Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen die Ligandbindungsaffinität erhöht (Batey et al., 2004; Lemay et al., 2006) und an der Ligandbindung keine divalenten Kationen direkt beteiligt sind, kommt allen beschriebenen divalenten Kationbindungsstellen eine stabilisierende Funktion für die Gesamtstruktur der RNA zu.

Konformationelle Änderungen in der gesamten Guanin-bindenden Riboswitch-RNA

Zur Untersuchung des postulierten Funktionsmechanismus des Guanin-bindenden Riboswitches wurden zwei unterschiedliche Konstrukte untersucht. Bei einem dieser Konstrukte handelt es sich um die vollständige Aptamerdomäne und Expressionsplattform des Guanin-bindenden Riboswitches (G-Switch-9-165-RNA) und bei dem anderen um ein Konstrukt, das am 3'-Ende verkürzt ist und den Transkriptionsterminator nicht mehr ausbilden kann (G-Switch-9-134-RNA). Die G-Switch-9-165-RNA liegt in der freien und der Ligand-gebundenen Form in der Terminatorkonformation vor. Die G-Switch-9-134-RNA kann je nach Faltungsprozedur die Aptamerdomäne vollständig ausbilden bzw. die Antiterminatorstruktur ausbilden. Die Möglichkeit, verschiedene Sekundärstrukturen auszubilden, wurde als eine Grundvoraussetzung des Funktionsmechanismus von Riboswitchen postuliert. Hier werden zwei unterschiedliche Sekundärstrukturen beobachtet, die sich unter verschiedenen Bedingungen bilden. Bei der Faltung der RNA werden durch Zufügen von thermischer Energie alle bestehenden Sekundärstrukturelemente aufgebrochen, da ihre freie Energie geringer ist, als die dem System zugefügte thermische Energie. Durch rasches Abkühlen bildet sich die kinetisch stabilste Sekundärstruktur aus, die im Fall der G-Switch-9-134-RNA die Antiterminatorkonformation ist. Davon unterscheidet sich der kotranskriptionale Faltungsweg, bei dem durch den sukzessiven Einbau von Nukleotiden sich die Länge der wachsenden RNA stetig ändert. Dadurch ändert sich auch ständig die thermodynamisch stabilste Konformation. Da mitunter die freie Energie der bereits

ausgebildeten Sekundärstrukturelemente größer ist, als die während der Transkription zur Verfügung stehende thermische Energie, können bereits ausgebildete Sekundärstrukturen nicht in jedem Fall aufgehoben werden. Während der Transkription wird zuerst die vollständige Aptamerdomäne und somit Helix I ausgebildet. Die ausgebildete Helix I ist unter den Bedingungen der *in vitro* Transkription stabil genug, um in der darauf folgenden Synthese des 3'-Endes des Antiterminators die Ausbildung des Antiterminators zuungunsten von Helix I zu verhindern. Da für die *in vitro* Transkription der RNA jedoch die RNA-Polymerase des Phagen T7 verwendet wird, die andere Eigenschaften als die RNA-Polymerase aus *B.subtilis* hat, ist die biologische Relevanz der unterschiedlichen erhaltenen Sekundärstrukturen nicht belegt. Dennoch führt auch die Ligandbindung an die G-Switch-9-134-RNA, die zuvor in der Antiterminatorkonformation vorlag zu keiner Veränderung der Sekundärstruktur. Dies ist im offensichtlichen Gegensatz zu den Annahmen über die Basis des Funktionsmechanismus von Riboswitchen.

Bislang konnte die genregulatorische Aktivität des Guanin-bindenden Riboswitches nur *in vivo* gezeigt werden. Hierbei konnte einerseits durch Zugabe des Liganden in die Kulturlösung eine Änderung der Aktivität eines Reportergens beobachtet werden, das unter der Kontrolle des Guanin-bindenden Riboswitches liegt (Mandal et al., 2003; Mandal und Breaker, 2004). Andererseits konnte durch quantitative RT-PCR der vorzeitige Abbruch der Transkription *in vivo* als Antwort auf eine erhöhte Ligandkonzentrationen in der Kulturlösung beobachtet werden (Mulhbacher und Lafontaine, 2007). Der Nachweis des Transkriptionsabbruchs bestätigt, dass der Guanin-bindende Riboswitch die Genexpression auf der Ebene der Transkription reguliert. *In-line Probing* wäre eine Methode, mit der die Ligand-induzierte Sekundärstrukturänderung *in vitro* nachgewiesen werden könnte. Die publizierten *in-line Probing* Daten zeigen jedoch nur den niedermolekularen Bereich der elektrophoretischen Auftrennung der RNA-Hydrolyseprodukte, in dem lediglich strukturelle Änderungen in der Aptamerdomäne beobachtet werden können. Es werden jedoch nie die höhermolekularen Bereiche aufgelöst, in denen man Sekundärstrukturänderungen der Expressionsplattform beobachten könnte (Mandal et al., 2003). Lediglich für den *pbuE* Adenin-bindenden Riboswitch wurden *in-line Probing* Daten für den Bereich der Expressionsplattform publiziert. Diese Daten zeigen eindeutig, dass die angenommene Sekundärstrukturänderung, die zur Genregulation führen soll, nicht beobachtet wird (Wickiser et al., 2005a). Somit sind derzeit keinerlei *in vitro* Daten verfügbar, die die angenommene Sekundärstrukturänderung demonstrieren, die für die genregulatorische Aktivität des Guanin-bindenden Riboswitches verantwortlich gemacht wird. Möglicherweise sind weitere zelluläre Komponenten an dem Mechanismus beteiligt oder es handelt sich um einen kotranskriptionalen Prozess, bei dem der zeitliche Ablauf der Transkription eine wichtige Rolle spielt. Diese Annahme ist nahe liegend für Transkriptionsregulierende Riboswitches. Dies würde erklären, warum die isolierte RNA die der Genregulation zu Grunde liegende Sekundärstrukturänderung nicht ausführen kann. Für den

FMN-bindenden Riboswitch konnte bereits gezeigt werden, dass RNA-Polymerase-Ruhestellen und die Assoziationskonstante des Metaboliten an die RNA und damit der zeitliche Ablauf der Transkription einen entscheidenden Faktor für den Wirkungsmechanismus dieses Transkriptions-regulierenden Riboswitches darstellt (Wickiser et al., 2005b). Die Geschwindigkeit der Transkription im Zusammenhang mit der Assoziationskonstante und der Bindungsaffinität von FMN an die RNA zeigen, dass es sich um einen kinetisch regulierten Riboswitch handelt. Die bestimmten Assoziationskonstanten des Liganden an die Guanin-bindende Aptamerdomäne (Gilbert et al., 2006) deuten darauf hin, dass auch hier der zeitliche Ablauf der Transkription wichtig ist. Zusätzlich werden auch im Guanin-bindenden Riboswitch, wie im *ribD* FMN-bindenden Riboswitch und im *pbuE* Adenin-bindenden Riboswitch, RNA-Polymerase-Ruhestellen gefunden (Wickiser et al., 2005a; Wickiser et al., 2005b). Im Guanin-bindenden Riboswitch existieren drei U-reiche Abschnitte (Nukleotide 107-112, 135-141 und 155-161), von denen zwei zwischen der Aptamerdomäne und dem mit dem Transkriptionsterminator assoziierten U-reichen Abschnitt (Nukleotide 155-161) liegen. Diese U-reichen Abschnitte entsprechen den Anforderungen von zuvor identifizierten RNA-Polymerase-Ruhestellen (Wickiser et al., 2005a; Wickiser et al., 2005b). Ohne eine Abschätzung der Lebensdauer dieser Ruhestellen kann jedoch keine Aussage darüber gemacht werden, ob es sich um einen kinetisch oder thermodynamisch regulierten Riboswitch handelt. Da die Lebensdauer der RNA-Polymerase-Ruhestellen abhängig von zellulären Faktoren, wie z.B. der Konzentration der Nukleotide und der Anwesenheit von Transkriptionsfaktoren wie NusA ist, können auf diese Weise weitere biologische Faktoren sondiert werden und entscheidend darüber sein, ob der Guanin-bindende Riboswitch kinetisch oder thermodynamisch reguliert wird. Unabhängig davon könnte ein Modell der Funktion des Guanin-bindenden Riboswitches folgendermaßen aussehen:

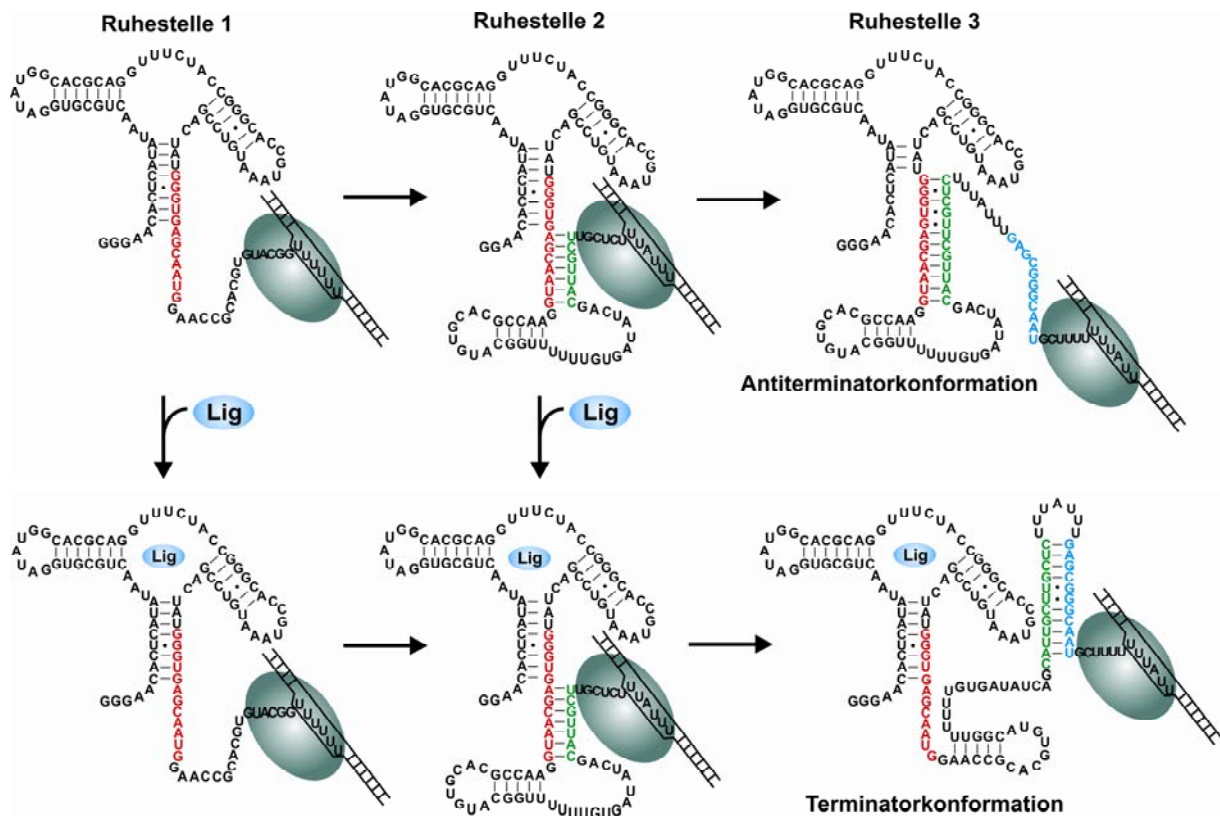


Abbildung 4.2

Modell für die genregulatorische Wirkung des Guanin-bindenden Riboswitches unter Einbeziehung von RNA-Polymerase-Ruhestellen. Die Ruhestellen 1 und 2 geben dem Liganden Zeit, an die vollständig ausgebildete Aptamerdomäne zu binden. Erst nach der zweiten Ruhestelle wird der genregulatorisch entscheidende Schritt vollzogen. In Abwesenheit des Liganden bildet sich der vollständige Antiterminator aus, wohingegen in Anwesenheit der Liganden die Ausbildung des Antiterminators unterdrückt wird und sich somit der Terminator ausbildet, der in Verbindung mit der dritten Ruhestelle zum vorzeitigen Abbruch der Transkription führt.

Im Zuge der Transkription erreicht die RNA-Polymerase die erste RNA-Polymerase-Ruhestelle (Nukleotide 107-112), wo die RNA-Synthese für einen unbekannten Zeitraum, der unter anderem von verschiedenen zellulären Faktoren abhängig ist, unterbrochen wird. Da die RNA-Polymerase aus *B.subtilis* nur die ersten 12 Nukleotide des wachsenden RNA-Moleküls verdeckt (Komissarova und Kashlev, 1998; Monforte et al., 1990), ist zu diesem Zeitpunkt die Aptamerdomäne bereits voll ausgebildet und in der Lage, den Liganden zu binden (Abb. 4.2, links). Somit hat die RNA-Polymerase-Ruhestelle die Funktion, dem Liganden Zeit zur Bindung an die Aptamerdomäne zu verschaffen. Das Fortschreiten der RNA-Polymerase bis zur zweiten Ruhestelle hat keinen Effekt auf die Struktur der Aptamerdomäne. Lediglich der untere Abschnitt des Transkriptionsantiterminators kann sich ausbilden und wiederum verharren die RNA-Polymerase und ermöglicht ein weiteres Mal die Ligandbindung an die Aptamerdomäne. Bei ausreichenden Ligandkonzentrationen findet die Bindung an die Aptamerdomäne statt, wodurch die Helix I stabilisiert wird, wie es durch die Bindung von

Hypoxanthin an die G-Switch-9-134-RNA gezeigt werden konnte (Abb. 4.2 Mitte). Die Ligand-induzierte Stabilisierung der Helix I führt dazu, dass bei weiterem Fortschreiten der RNA-Polymerase die weitere Ausbildung des Antiterminators unterdrückt wird. Somit kann sich der Transkriptionsterminator ausbilden, der in Verbindung mit der dritten RNA-Polymerase-Ruhestelle, die direkt stromabwärts von dem Transkriptionsterminator liegt, zum Abbruch der Transkription führt. Bei niedrigen Ligandkonzentrationen bindet der Ligand nicht an die Aptamerdomäne, wodurch die Stabilisierung der Helix I nicht gegeben ist, was zur Folge hat, dass bei fortschreitender Transkription der untere Teil der Helix I aufgebrochen wird und sich der komplette Antiterminator ausbilden kann. Die Ausbildung des Antiterminators unterdrückt die Ausbildung des Transkriptionsterminators, so dass die Transkription fortschreitet und das vollständige Gen transkribiert wird (Abb. 4.2 rechts). Mit den NMR-Daten kann die Ausbildung des Antiterminators und damit die Unterdrückung der Ausbildung des Terminators für die Transkription des gesamten Riboswitches nicht gezeigt werden. Das liegt möglicherweise an den gewählten Transkriptionsbedingungen und unter anderem an der eingesetzten T7-Phagen-RNA-Polymerase. Weiterhin ist die Gegenwart von RNA-Chaperonen möglicherweise eine Voraussetzung für das Aufbrechen der Helix I, so dass der Antiterminator nicht ausgebildet werden kann.

Xanthin-Aptamer bindet das N7-protonierte Tautomer des Hypoxanthins

Bislang ist mit der Guanin-bindenden Riboswitch-RNA in Komplex mit Hypoxanthin nur eine Struktur bekannt, in der Hypoxanthin von einem RNA-Molekül spezifisch erkannt wird (Batey et al., 2004). Aus ihr und den hierin vorgelegten NMR-Daten geht hervor, dass Hypoxanthin darin in der N9-protonierten tautomeren Form gebunden wird. Im Gegensatz dazu zeigen die NMR-Daten, dass das Hypoxanthin in der N7-protonierten tautomeren Form an das Xanthin-SELEX-Aptamers bindet. Somit handelt es sich hierbei um einen bislang unbeschriebenen Bindungsmechanismus von Hypoxanthin an ein RNA-Molekül. Lediglich in Hypoxanthin-Protein-Komplexen wurde bereits die Bindung des N7-protonierten Tautomers des Hypoxanthins beobachtet, wie beispielsweise in dem Komplex der Purinnukleotid-Phosphorylase mit Hypoxanthin. Hierin wird die Hoogsteen-Seite von Hypoxanthin spezifisch durch die Seitenkette eines Asparagins erkannt, indem je eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der N7H7-Iminogruppe und der terminalen Carbonylgruppe der Aminosäure bzw. der Carbonylgruppe des Hypoxanthins in Position 6 und der Asn γ -Aminogruppe ausgebildet wird (Koellner et al., 1997).

Die chemische Verschiebung der Hypoxanthin N1H1-Iminogruppe gebunden an die Xanthin-Aptamer-RNA ist ähnlich zu der des Hypoxanthins gebunden an die Guanin-bindende

Riboswitch-RNA. Das könnte ein Indiz sein, dass Hypoxanthin an die Xanthin-Aptamer-RNA über ein intermolekulares Watson-Crick Basenpaar bindet, wie es für die Guanin-bindende Riboswitch-RNA beobachtet wurde. Da auch die X-Aptamer-M1M3-RNA, in der das einzige Cytidin der inneren Schlaufe zu einem Uridin mutiert ist, nicht mehr Hypoxanthin bindet, spricht dies für die Ausbildung eines intermolekularen Watson-Crick Basenpaars zwischen der RNA und dem gebundenen Hypoxanthin. In diesem Falle wäre es denkbar, dass die X-Aptamer-M1M3-RNA nun Adenin binden kann, was jedoch nicht nachgewiesen werden konnte. Dadurch kann ein intermolekulares Watson-Crick Basenpaar noch nicht ausgeschlossen werden, da die Position 6 des Liganden durch weitere Reste der RNA erkannt werden könnte. Somit könnte durch den Austausch der Carbonylgruppe des Liganden mit einer Aminogruppe in Position 6 die Bindungsfähigkeit verloren gehen. Darauf deuten auch die biochemischen Daten hin (Kiga et al., 1998). Wahrscheinlich ist jedoch auch, dass das Cytidin in der inneren Schlaufe einen integralen Bestandteil der Ligandbindungstasche darstellt, dessen Mutation die Architektur der Bindungstasche zerstört. Da die Bindungstasche nur durch sieben Nukleotide ausgebildet wird, erscheint es plausibel, dass jedes Nukleotid eine unentbehrliche Aufgabe in der Architektur der Ligandbindungstasche ausführt, wie auch der Ligandbindungsverlust durch Deletion eines Uridins der inneren Schlaufe zeigt.

Das Xanthin-SELEX-Aptamer hat eine kleine innere Schlaufe und dadurch kein großes Maß an Komplexität. Die geringe Komplexität könnte auch dadurch begründet sein, dass ein Teil der inneren Schlaufe in der SELEX-Prozedur invariabel war, da es sich um den invariablen Bereich handelt, an den der PCR-Primer in der Selektionsprozedur bindet. Möglicherweise resultiert aus diesem invariablen Bereich in der Ligandbindungsregion die eher geringe Affinität von $\sim 2 \mu\text{M}$ für Guanin und Hypoxanthin an die Xanthin-Aptamer-RNA. Die innere Schlaufe des Guanin-bindenden Riboswitches (Ligand-bindende Drei-Wege-Kreuzung) weist im Gegensatz zur Xanthin-Aptamer-RNA durch ihre Größe und Konserviertheit ein größeres Maß an Komplexität auf, was ihre höhere Affinität für den gleichen Liganden und die gleichzeitige biologische Aktivität rechtfertigt.

Für einige Riboswitch-Aptamerdomänen kann eine Korrelation zwischen der Komplexität der Aptamerdomäne, der Affinität zu ihrem Liganden und der Beschaffenheit des Liganden beobachtet werden, wie es für SELEX-Aptamere beschrieben wurde (Carothers et al., 2004). Die Purin-bindenden Aptamerdomänen und die preQ1-bindende Aptamerdomäne haben im Vergleich zu anderen Riboswitch-Aptamerdomänen nur ein geringes Maß an Komplexität und binden ihren Liganden im nanomolaren Bereich. Ihre hohe Affinität trotz der vergleichsweise geringen Komplexität kann durch die Natur des Liganden begründet sein, der rigide, planar und polar ist. Im Gegensatz dazu sind die Aptamerdomänen des Glycin- und des Lysin-bindenden Riboswitches viel komplexer. Ihre Größe und ihr Maß an Konserviertheit ist ein Vielfaches von dem der Purin- und preQ1-bindenden Aptamerdomänen. Außerdem liegen die Affinitäten nur im mikromolaren Bereich. Somit wird auch bei den natürlich entstandenen

Riboswitch-Aptamerdomänen die Korrelation erkannt, die bereits für SELEX-Aptamere beschrieben wurde. Nach ihr erfordert die Bindung eines flexiblen Liganden, mit wenigen polaren Gruppen ein viel größeres Maß an Komplexität, als es für einen rigiden, planaren und polaren Liganden nötig ist.

Selektives Markieren mit NMR-aktiven Kernen

Das Problem der NMR-Signalüberlagerung ist ein allgemeines Problem bei der NMR-spektroskopischen Untersuchung großer Biomoleküle. Für Protein NMR-Messungen kann dieses Problem teilweise durch selektive Isotopenmarkierung von einzelnen Aminosäuren adressiert werden (Guignard et al., 2002; Reese und Dötsch, 2003; Weigelt et al., 2002). Auf ähnlich Weise kann in RNA-Molekülen eine oder mehrere Nukleotid-Sorten selektiv mit NMR-aktiven Isotopen markiert werden oder es können auch ganzen RNA-Segmente selektiv markiert werden und anschließend durch RNA-Ligation mit anderen Segmenten, die unterschiedliche Isotopenmarkierungsmuster aufweisen, zusammengefügt werden (Tzakos et al., 2007). Für homo- und heterooligomere Komplexe besteht auch die Möglichkeit, gezielt einzelne Bestandteile des Komplexes in isotopenmarkierter Form einzusetzen und somit selektiv für NMR-Experimente detektierbar zu machen. Dies konnte in dieser Arbeit eindrucksvoll für die Aptamerdomäne des Guanin-bindenden Riboswitches in Komplex mit ^{15}N -markiertem Guanin gezeigt werden, wodurch die Iminogruppen des Liganden Guanin sofort von den Iminogruppen der RNA unterschieden werden konnten, und zugeordnet werden konnten. Auch konnte durch einen Komplex aus ^{13}C , ^{15}N -markiertem Guanin mit der G-Switch-RNA, die für alle Cytidine ^{15}N -markiert war, in einem HNN-COSY Experiment eindeutig festgestellt werden, dass Guanin über eine intermolekulare Watson-Crick Basenpaarung an die RNA bindet, was durch intermolekulare NOEs bestätigt wurde.

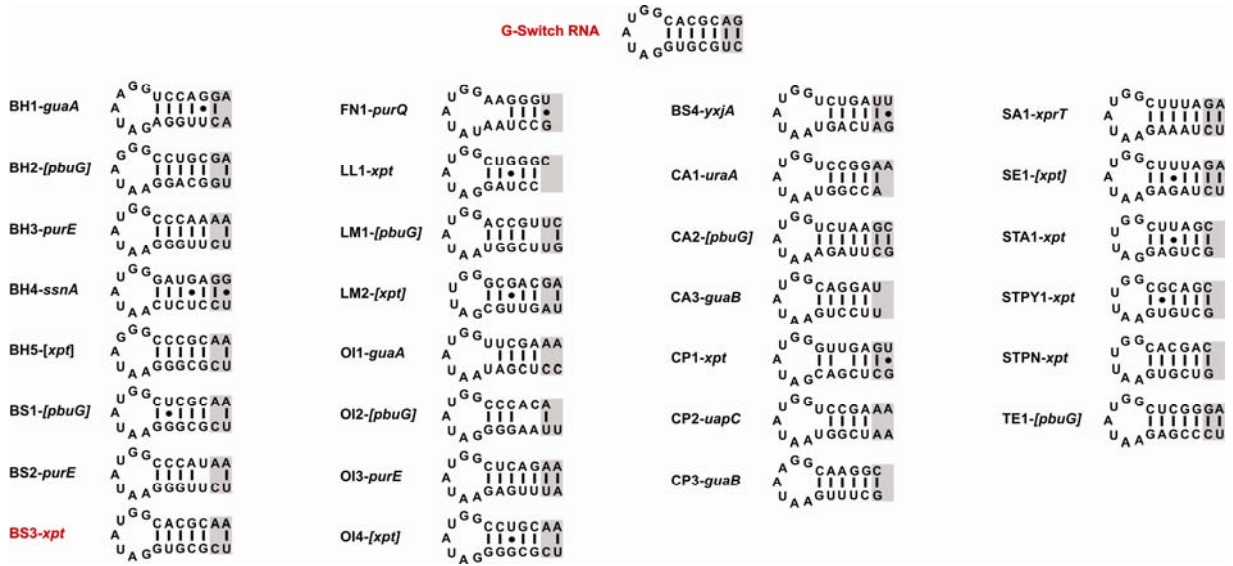
Da die 82 Nukleotide lange Aptamerdomäne des TPP-bindenden Riboswitches zu groß für standardmäßige NMR-basierte Strukturbestimmungsmethoden ist (Fürtig et al., 2003), konnte hier über spezielle NMR-Experimente gezielt das gebundene TPP betrachtet werden. Die beiden Phosphatgruppen des TPP stellen hierbei natürlich vorkommende Sonden für ^{31}P -NMR Experimente dar, wodurch sie selektiv Informationen über die Wechselwirkung zwischen dem gebundenen TPP und der RNA liefern können. Der chemische Verschiebungsbereich der Resonanzen der Phosphatgruppen des RNA-Rückgrats unterscheidet sich von dem der Phosphatgruppen des TPP, so dass es zu keiner Resonanzüberlagerung kommt. Auf diese Weise konnte die direkte Beteiligung von Mg^{2+} an der Bindung von TPP an die RNA aufgedeckt werden. Ähnliche Experimente mit einer spaltungsincompetenten Variante des glmS-Ribozyms wären denkbar, um das in der Röntgenstruktur sichtbare Mg^{2+} , das direkt an die Phosphatgruppe von GlcN6P koordiniert ist (Klein und Ferre-D'Amare, 2006),

aufzudecken. Der FMN-bindende Riboswitch bindet das phosphorylierte FMN 1000 mal besser als Riboflavin, das keine Phosphatgruppe trägt (Winkler et al., 2002b). Dadurch ist auch hier eine direkte Wechselwirkung der Phosphatgruppe des Metaboliten wahrscheinlich, die über ^{31}P -NMR Spektroskopie untersucht werden könnte. Für diesen Komplex sind derzeit keinerlei strukturelle Daten bekannt.

Auf ganz andere Weise kann durch selektives Markieren Auskunft über die Konformation des glykosydischen Bindungswinkel χ in Pyrimidinen erhalten werden. Der spezifische Einbau von ^{19}F -Kerne an der Position 5 in Pyrimidinen kann über Bestimmung der $^5J_{\text{H}1',\text{F}}$ -Kopplungskonstante Auskunft darüber geben, ob die Pyrimidinbase *syn* oder *anti* zu ihrer Ribose steht, wie es für die HIV *transactivation response element* (TAR)-RNA gezeigt wurde (Hennig et al., 2006). Hier kann durch den selektiven Einbau von NMR-aktiven Kernen sowohl die Resonanzüberlagerung minimiert werden, als auch die Sensitivität von NMR Experimenten erhöht werden.

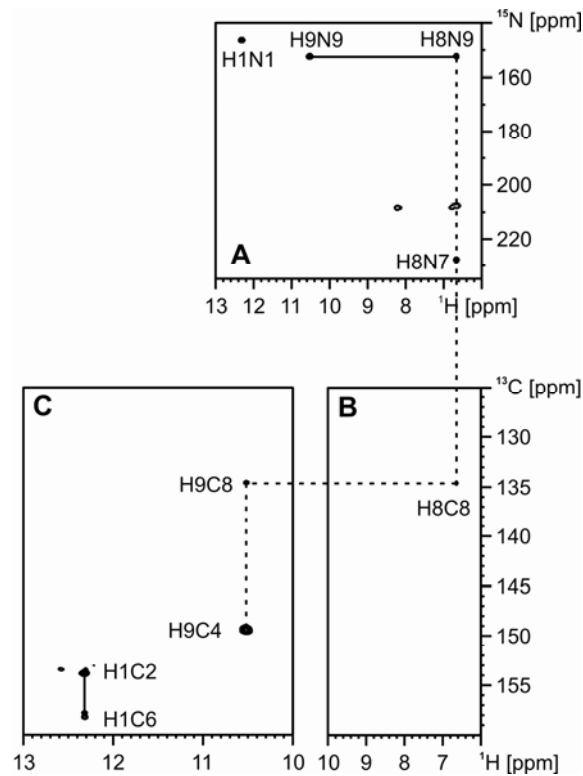
In der NMR-Spektroskopie, im Gegensatz zu anderen spektroskopischen Methoden, kann somit ein bestimmter Kern für NMR-spektroskopische Experimente nachweisbar gemacht werden, indem er spezifisch in isotope markierter Form eingebaut wird. Das ermöglicht die Vereinfachung stark überlagerter NMR-Spektren von makromolekularen Molekülen und Komplexen und die Fokussierung auf Teilbereiche und spezifische Aspekte des Moleküls. Im Gegenzug kann auch ein Teil eines Moleküls oder Komplexes selektiv nicht-detektierbar gemacht werden, indem spezifisch NMR-inaktive Isotope eingebaut werden. Das ist eine gängige Praxis für die Untersuchung von Komplexen, in denen nur eine Komponente des Komplexes untersucht werden soll. In der nicht zu untersuchenden Komponente werden die Protonen durch Deuterium ersetzt und sind somit für ^1H -basierte NMR-Experimente nicht nachweisbar. Die Möglichkeiten der selektiven Isotopenmarkierung sind sehr vielfältig und ihre geschickte Anwendung eröffnet unzählige Möglichkeiten, Informationen mit atomarer Auflösung zu erhalten, was speziell für makromolekularen Molekülen und Komplexen hilfreich ist.

ANHANG



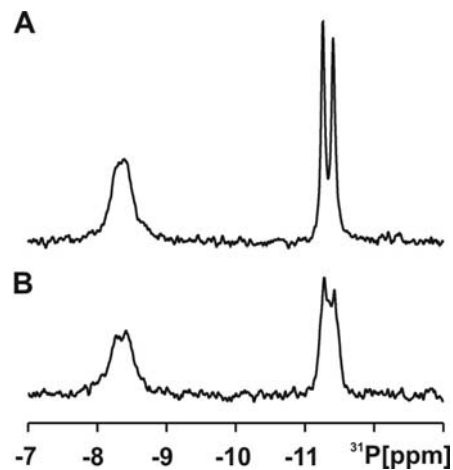
Anhang 1

Sekundärstrukturvorhersage der Helix II der Guanin-bindenden Riboswitches basierend auf einem Sequenzvergleich von Mandal et al. (Mandal et al., 2003). Die Sekundärstruktur von Helix II der G-Switch-RNA, die hier verwendet wurde, wird ganz oben gezeigt. Die beiden aus Stabilitätsgründen mutierten Basenpaare in Helix II sind grau hinterlegt. Die entsprechende wildtyp Sequenz der *xpt-pbuX* mRNA von *B.subtilis* (G-Switch-wt-RNA), die biochemisch von Breaker und seinen Mitarbeitern charakterisiert wurde, ist rot markiert. In allen Sequenzen sind die mutierten Basenpaare grau hinterlegt. Ungefähr ein Drittel aller Sequenzen tragen zwei Watson-Crich Basenpaare oder ein Watson-Crick und ein G:U Basenpaar an dieser Stelle.



Anhang 2

Zuordnung der Stickstoff- und der Kohlenstoffresonanzen von Guanin gebunden an die G-Switch-RNA. (A) $^2J_{\text{HN}}\text{-}^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum von ^{15}N -markiertem Guanin in Komplex mit G-Switch-RNA, die in allen Cytidinen $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -markiert ist. Der N-H Transfer wurde so optimiert, dass sich sowohl $^1J_{\text{HN}}$ - als auch $^2J_{\text{HN}}$ skalare Kopplungen ausbilden. Somit werden Korrelationen sowohl zwischen dem H8 und dem N7 bzw. dem N9 (gestrichelte Linie), als auch zwischen dem H1 und dem N1 und dem H9 und dem N9 beobachtet. Die ^{15}N -chemische Verschiebung von 228 ppm ist typisch für ein nicht-protoniertes N7 in einem Purinnukleotid (Wijmenga und van Buuren, 1998). Lediglich das N9 ist mit zwei Protonenresonanzen korreliert (H8 und H9, horizontale Linie). (B) $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC Spektrum von $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -markiertem Guanin in Komplex mit ^{15}N -markierter G-Switch-RNA. Eine einzige Korrelation wird für das H8C8 des gebundenen Liganden beobachtet, wodurch die ^{13}C -chemische Verschiebung des C8 identifiziert werden konnte. (C) 2D-H(N)C Spektrum (Muhandiram und Kay, 1994) von $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -markiertem Guanin in Komplex mit ^{15}N -markierter G-Switch-RNA. Es werden Korrelationen sowohl zwischen dem H1 und dem C2 bzw. dem C6 (vertikale Linie) als auch zwischen dem H9 und dem C8 bzw. dem C4 (gestrichelte vertikale Linie) des gebundenen Guanins beobachtet. Die chemische Verschiebung von 149 ppm ist typisch für C4-Kohlenstoffatome in Nukleotiden; C5-Kohlenstoffatome haben eine Resonanzfrequenz von ~ 118 ppm (Wijmenga und van Buuren, 1998).



Anhang 3

Vergleich der 1D- ^{31}P -NMR Spektren von TPP in NMR Puffer in Anwesenheit von 15 mM Mg^{2+} aufgenommen A) mit und B) ohne ^1H -Entkopplung unter sonst identischen Bedingungen. Beide ^{31}P Signale erscheinen als Duplett im ^1H entkoppelten Spektrum aufgrund der auftretenden ^{31}P - ^{31}P skalaren Kopplung. Aufgrund der großen Linienbreite ist diese Kopplung für das Signal bei -8,36 ppm kaum aufgelöst. Die zusätzliche Aufspaltung des Signals bei -11,34 ppm in B) ist der ^3J skalaren ^1H - ^{31}P Kopplung zuzuschreiben und identifiziert somit dieses Signal als die α -Phosphatgruppe des TPP.

Literatur

- Abreu-Goodger, C. und Merino, E. (2005). RibEx: a web server for locating riboswitches and other conserved bacterial regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* *33*, W690-692.
- Allain, F.H. und Varani, G. (1995). Divalent metal ion binding to a conserved wobble pair defining the upstream site of cleavage of group I self-splicing introns. *Nucleic Acids Res.* *23*, 341-350.
- Arjunan, P., Umland, T., Dyda, F., Swaminathan, S., Furey, W., Sax, M., Farrenkopf, B., Gao, Y., Zhang, D. und Jordan, F. (1996). Crystal structure of the thiamin diphosphate-dependent enzyme pyruvate decarboxylase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* *256*, 590-600.
- Atlung, T. und Ingmer, H. (1997). H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol. Microbiol.* *24*, 7-17.
- Babitzke, P. (2004). Regulation of transcription attenuation and translation initiation by allosteric control of an RNA-binding protein: the *Bacillus subtilis* TRAP protein. *Current opinion in microbiology* *7*, 132-139.
- Bain, A.D. (2003). Chemical exchange in NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* *43*, 63-103.
- Barrick, J.E., Corbino, K.A., Winkler, W.C., Nahvi, A., Mandal, M., Collins, J., Lee, M., Roth, A., Sudarsan, N., Jona, I., *et al.* (2004). New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 6421-6426.
- Bartels, C., Xia, T.-h., Billeter, M., Güntert, P. und Wüthrich, K. (1995). The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. *Journal of Biomolecular NMR* *6*, 1-10.
- Batey, R.T., Gilbert, S.D. und Montange, R.K. (2004). Structure of a natural guanine-responsive riboswitch complexed with the metabolite hypoxanthine. *Nature* *432*, 411-415.
- Begley, T.P., Downs, D.M., Ealick, S.E., McLafferty, F.W., Van Loon, A.P., Taylor, S., Campobasso, N., Chiu, H.J., Kinsland, C., Reddick, J.J., *et al.* (1999). Thiamin biosynthesis in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* *171*, 293-300.
- Bertini, I. und Luchinat, C. (1986). *NMR of paramagnetic molecules in biological systems* (Menlo Park, CA, U.S.A.).
- Blount, K.F. und Breaker, R.R. (2006). Riboswitches as antibacterial drug targets. *Nature biotechnology* *24*, 1558-1564.
- Buck, J., Fürtig, B., Noeske, J., Wöhnert, J. und Schwalbe, H. (2007). Time-resolved NMR methods resolving ligand-induced RNA folding at atomic resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 15699-15704.

- Butcher, S.E., Allain, F.H. und Feigon, J. (2000). Determination of metal ion binding sites within the hairpin ribozyme domains by NMR. *Biochemistry* *39*, 2174-2182.
- Carothers, J.M., Davis, J.H., Chou, J.J. und Szostak, J.W. (2006). Solution structure of an informationally complex high-affinity RNA aptamer to GTP. *RNA* *12*, 567-579.
- Carothers, J.M., Oestreich, S.C., Davis, J.H. und Szostak, J.W. (2004). Informational complexity and functional activity of RNA structures. *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 5130-5137.
- Cheah, M.T., Wachter, A., Sudarsan, N. und Breaker, R.R. (2007). Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature* *447*, 497-500.
- Corbino, K.A., Barrick, J.E., Lim, J., Welz, R., Tucker, B.J., Puskarz, I., Mandal, M., Rudnick, N.D. und Breaker, R.R. (2005). Evidence for a second class of S-adenosylmethionine riboswitches and other regulatory RNA motifs in alpha-proteobacteria. *Genome Biol.* *6*, R70.
- Cowan, J.A. (1993). Metallobiochemistry of RNA. Co(NH₃)₆(3+) as a probe for Mg²⁺(aq) binding sites. *Journal of inorganic biochemistry* *49*, 171-175.
- Cromie, M.J., Shi, Y., Latifi, T. und Groisman, E.A. (2006). An RNA sensor for intracellular Mg²⁺. *Cell* *125*, 71-84.
- Dann, C.E., 3rd, Wakeman, C.A., Sieling, C.L., Baker, S.C., Irnov, I. und Winkler, W.C. (2007). Structure and mechanism of a metal-sensing regulatory RNA. *Cell* *130*, 878-892.
- De la Pena, M., Gago, S. und Flores, R. (2003). Peripheral regions of natural hammerhead ribozymes greatly increase their self-cleavage activity. *EMBO J.* *22*, 5561-5570.
- Dickson, R.C., Abelson, J., Barnes, W.M. und Reznikoff, W.S. (1975). Genetic regulation: the Lac control region. *Science* *187*, 27-35.
- Dieckmann, T., Suzuki, E., Nakamura, G.K. und Feigon, J. (1996). Solution structure of an ATP-binding RNA aptamer reveals a novel fold. *RNA* *2*, 628-640.
- Dingley, A.J. und Grzesiek, S. (1998). Direct Observation of Hydrogen Bonds in Nucleic Acid Base Pairs by internucleotide 2J_{NN} Couplings. *J. Am. Chem. Soc.* *120*, 8293-8297.
- Dingley, A.J., Masse, J.E., Feigon, J. und Grzesiek, S. (2000). Characterization of the hydrogen bond network in guanosine quartets by internucleotide 3hJ(NC)' and 2hJ(NN) scalar couplings. *J. Biomol. NMR* *16*, 279-289.
- Edwards, T.E. und Ferre-D'Amare, A.R. (2006). Crystal Structures of the Thi-Box Riboswitch Bound to Thiamine Pyrophosphate Analogs Reveal Adaptive RNA-Small Molecule Recognition. *Structure* *14*, 1459-1468.
- Ellington, A.D. und Szostak, J.W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* *346*, 818-822.
- Epshtein, V., Mironov, A.S. und Nudler, E. (2003). The riboswitch-mediated control of sulfur metabolism in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 5052-5056.

- Famulok, M. (1999). Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *9*, 324-329.
- Famulok, M. und Faulhammer, D. (1994). Specific Binding of Antibodies to DNA through Combinatorial Antibody Libraries. *Angewandte Chemie (International ed)* *33*, 1827-1829.
- Fan, P., Suri, A.K., Fiala, R., Live, D. und Patel, D.J. (1996). Molecular recognition in the FMN-RNA aptamer complex. *J. Mol. Biol.* *258*, 480-500.
- Fan, Y., Gaffney, B.L. und Jones, R.A. (2005). RNA GG x UU motif binds K⁺ but not Mg²⁺. *J. Am. Chem. Soc.* *127*, 17588-17589.
- Fasman, G. (1975). *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Nucleic Acids, I*, 3 edn (CRC press).
- Feigon, J., Butcher, S.E., Finger, L.D. und Hud, N.V. (2001). Solution nuclear magnetic resonance probing of cation binding sites on nucleic acids. *Methods Enzymol* *338*, 400-420.
- Flatau, S., Fischer, G., Kleinpeter, E. und Schellenberger, A. (1988). ³¹P NMR investigations on free and enzyme bound thiamine pyrophosphate. *FEBS Lett.* *233*, 379-382.
- Fuchs, R.T., Grundy, F.J. und Henkin, T.M. (2006). The S(MK) box is a new SAM-binding RNA for translational regulation of SAM synthetase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 226-233.
- Fürtig, B., Richter, C., Wöhnert, J. und Schwalbe, H. (2003). NMR spectroscopy of RNA. *Chembiochem* *4*, 936-962.
- Gilbert, S.D., Love, C.E., Edwards, A.L. und Batey, R.T. (2007). Mutational Analysis of the Purine Riboswitch Aptamer Domain. *Biochemistry*.
- Gilbert, S.D., Stoddard, C.D., Wise, S.J. und Batey, R.T. (2006). Thermodynamic and kinetic characterization of ligand binding to the purine riboswitch aptamer domain. *J. Mol. Biol.* *359*, 754-768.
- Grundy, F.J. und Henkin, T.M. (1993). tRNA as a positive regulator of transcription antitermination in *B. subtilis*. *Cell* *74*, 475-482.
- Grundy, F.J. und Henkin, T.M. (2006). From ribosome to riboswitch: control of gene expression in bacteria by RNA structural rearrangements. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* *41*, 329-338.
- Grundy, F.J., Lehman, S.C. und Henkin, T.M. (2003). The L box regulon: lysine sensing by leader RNAs of bacterial lysine biosynthesis genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 12057-12062.
- Guignard, L., Ozawa, K., Pursglove, S.E., Otting, G. und Dixon, N.E. (2002). NMR analysis of in vitro-synthesized proteins without purification: a high-throughput approach. *FEBS Lett.* *524*, 159-162.

- Henkin, T.M. und Yanofsky, C. (2002). Regulation by transcription attenuation in bacteria: how RNA provides instructions for transcription termination/antitermination decisions. *Bioessays* *24*, 700-707.
- Hennig, M., Munzarova, M.L., Bermel, W., Scott, L.G., Sklenar, V. und Williamson, J.R. (2006). Measurement of long-range ^1H - ^{19}F scalar coupling constants and their glycosidic torsion dependence in 5-fluoropyrimidine-substituted RNA. *J. Am. Chem. Soc.* *128*, 5851-5858.
- Hermann, T. und Patel, D.J. (2000). Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* *287*, 820-825.
- Hud, N.V., Schultze, P., Sklenar, V. und Feigon, J. (1999). Binding sites and dynamics of ammonium ions in a telomere repeat DNA quadruplex. *J. Mol. Biol.* *285*, 233-243.
- Hurd, R.E., Azhderian, E. und Reid, B.R. (1979). Paramagnetic ion effects on the nuclear magnetic resonance spectrum of transfer ribonucleic acid: assignment of the 15--48 tertiary resonance. *Biochemistry* *18*, 4012-4017.
- Hwang, T. und Shaka, A. (1995). Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *J. Magn. Reson.* *112*, 275-279.
- Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A. und Polisky, B. (1994). High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* *263*, 1425-1429.
- Jiang, F., Kumar, R.A., Jones, R.A. und Patel, D.J. (1996). Structural basis of RNA folding and recognition in an AMP-RNA aptamer complex. *Nature* *382*, 183-186.
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M. und Cossart, P. (2002). An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* *110*, 551-561.
- Joyce, G.F. (1989). RNA evolution and the origins of life. *Nature* *338*, 217-224.
- Kang, R.S., Daniels, C.M., Francis, S.A., Shih, S.C., Salerno, W.J., Hicke, L. und Radhakrishnan, I. (2003). Solution structure of a CUE-ubiquitin complex reveals a conserved mode of ubiquitin binding. *Cell* *113*, 621-630.
- Keel, A.Y., Rambo, R.P., Batey, R.T. und Kieft, J.S. (2007). A general strategy to solve the phase problem in RNA crystallography. *Structure* *15*, 761-772.
- Khvorova, A., Lescoute, A., Westhof, E. und Jayasena, S.D. (2003). Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. *Nat. Struct. Biol.* *10*, 708-712.
- Kiga, D., Futamura, Y., Sakamoto, K. und Yokoyama, S. (1998). An RNA aptamer to the xanthine/guanine base with a distinctive mode of purine recognition. *Nucleic Acids Res.* *26*, 1755-1760.
- Klein, D.J. und Ferre-D'Amare, A.R. (2006). Structural basis of glmS ribozyme activation by glucosamine-6-phosphate. *Science* *313*, 1752-1756.

- Klug, S.J. und Famulok, M. (1994). All you wanted to know about SELEX. *Molecular biology reports* *20*, 97-107.
- Koellner, G., Luic, M., Shugar, D., Saenger, W. und Bzowska, A. (1997). Crystal structure of calf spleen purine nucleoside phosphorylase in a complex with hypoxanthine at 2.15 Å resolution. *J. Mol. Biol.* *265*, 202-216.
- Koizumi, M. und Breaker, R.R. (2000). Molecular recognition of cAMP by an RNA aptamer. *Biochemistry* *39*, 8983-8992.
- Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S. und Adhya, S. (1993). Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annual review of biochemistry* *62*, 749-795.
- Komissarova, N. und Kashlev, M. (1998). Functional topography of nascent RNA in elongation intermediates of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 14699-14704.
- Kubodera, T., Watanabe, M., Yoshiuchi, K., Yamashita, N., Nishimura, A., Nakai, S., Gomi, K. und Hanamoto, H. (2003). Thiamine-regulated gene expression of *Aspergillus oryzae* thiA requires splicing of the intron containing a riboswitch-like domain in the 5'-UTR. *FEBS Lett.* *555*, 516-520.
- Landick, R., Turnbough, C.L. und Yanofsky, C. (1996). Transcription attenuation. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, F.C. Neidhardt, ed. (Washington, ASM Press), pp. 1263-1286.
- Lease, R.A. und Belfort, M. (2000). Riboregulation by DsrA RNA: trans-actions for global economy. *Mol. Microbiol.* *38*, 667-672.
- Lemay, J.F., Penedo, J.C., Tremblay, R., Lilley, D.M. und Lafontaine, D.A. (2006). Folding of the adenine riboswitch. *Chem. Biol.* *13*, 857-868.
- Leulliot, N. und Varani, G. (2001). Current topics in RNA-protein recognition: control of specificity and biological function through induced fit and conformational capture. *Biochemistry* *40*, 7947-7956.
- Liu, A., Majumdar, A., Hu, W., Kettani, A., Skripkin, E. und Patel, D.J. (2000). NMR Detection of N-H...O=C Hydrogen Bonds in ¹³C,¹⁵N-Labeled Nucleic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* *122*, 3206-3210.
- Liu, M., Mao, X., Ye, C., Huang, H., Nicholson, J. und Lindon, J. (1998). Improved WATERGATE Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 125-129.
- Loewen, P.C. und Hengge-Aronis, R. (1994). The role of the sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation. *Annual review of microbiology* *48*, 53-80.
- Mandal, M., Boese, B., Barrick, J.E., Winkler, W.C. und Breaker, R.R. (2003). Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Cell* *113*, 577-586.
- Mandal, M. und Breaker, R.R. (2004). Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 29-35.

- Mandal, M., Lee, M., Barrick, J.E., Weinberg, Z., Emilsson, G.M., Ruzzo, W.L. und Breaker, R.R. (2004). A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science* *306*, 275-279.
- McDaniel, B.A., Grundy, F.J., Artsimovitch, I. und Henkin, T.M. (2003). Transcription termination control of the S box system: direct measurement of S-adenosylmethionine by the leader RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 3083-3088.
- McDaniel, B.A., Grundy, F.J. und Henkin, T.M. (2005). A tertiary structural element in S box leader RNAs is required for S-adenosylmethionine-directed transcription termination. *Mol. Microbiol.* *57*, 1008-1021.
- McDaniel, B.A., Grundy, F.J., Kurlekar, V.P., Tomsic, J. und Henkin, T.M. (2006). Identification of a mutation in the *Bacillus subtilis* S-adenosylmethionine synthetase gene that results in derepression of S-box gene expression. *J. Bacteriol.* *188*, 3674-3681.
- Milligan, J.F., Groebe, D.R., Witherell, G.W. und Uhlenbeck, O.C. (1987). Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res.* *15*, 8783-8798.
- Miranda-Rios, J., Navarro, M. und Soberon, M. (2001). A conserved RNA structure (thi box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 9736-9741.
- Mironov, A.S., Gusarov, I., Rafikov, R., Lopez, L.E., Shatalin, K., Kreneva, R.A., Perumov, D.A. und Nudler, E. (2002). Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell* *111*, 747-756.
- Monforte, J.A., Kahn, J.D. und Hearst, J.E. (1990). RNA folding during transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase analyzed by RNA self-cleavage. *Biochemistry* *29*, 7882-7890.
- Montange, R.K. und Batey, R.T. (2006). Structure of the S-adenosylmethionine riboswitch regulatory mRNA element. *Nature* *441*, 1172-1175.
- Mori, S., Abeygunawardana, C., Johnson, M.O. und van Zijl, P.C. (1995). Improved sensitivity of HSQC spectra of exchanging protons at short interscan delays using a new fast HSQC (FHSQC) detection scheme that avoids water saturation. *J. Magn. Reson. B* *108*, 94-98.
- Morita, M.T., Tanaka, Y., Kodama, T.S., Kyogoku, Y., Yanagi, H. und Yura, T. (1999). Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev* *13*, 655-665.
- Muhandiram, D.R. und Kay, L.E. (1994). Gradient-Enhanced Triple-Resonance Three-Dimensional NMR Experiments with Improved Sensitivity. *J. Magn. Reson. Ser. B* *103*, 203-216.
- Mulhbachter, J. und Lafontaine, D.A. (2007). Ligand recognition determinants of guanine riboswitches. *Nucleic Acids Res.* *35*, 5568-5580.

- Murchie, A.I., Thomson, J.B., Walter, F. und Lilley, D.M. (1998). Folding of the hairpin ribozyme in its natural conformation achieves close physical proximity of the loops. *Mol. Cell* *1*, 873-881.
- Nahvi, A., Sudarsan, N., Ebert, M.S., Zou, X., Brown, K.L. und Breaker, R.R. (2002). Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem. Biol.* *9*, 1043.
- Noeske, J., Buck, J., Fürtig, B., Nasiri, H.R., Schwalbe, H. und Wöhnert, J. (2007a). Interplay of 'induced fit' and preorganization in the ligand induced folding of the aptamer domain of the guanine binding riboswitch. *Nucleic Acids Res.* *35*, 572-583.
- Noeske, J., Richter, C., Grundl, M.A., Nasiri, H.R., Schwalbe, H. und Wöhnert, J. (2005). An intermolecular base triple as the basis of ligand specificity and affinity in the guanine- and adenine-sensing riboswitch RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 1372-1377.
- Noeske, J., Richter, C., Stinal, E., Schwalbe, H. und Wöhnert, J. (2006). Phosphate-group recognition by the aptamer domain of the thiamine pyrophosphate sensing riboswitch. *Chembiochem* *7*, 1451-1456.
- Noeske, J., Schwalbe, H. und Wöhnert, J. (2007b). Metal-ion binding and metal-ion induced folding of the adenine-sensing riboswitch aptamer domain. *Nucleic Acids Res.* *35*, 5262-5273.
- Nou, X. und Kadner, R.J. (2000). Adenosylcobalamin inhibits ribosome binding to *btuB* RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 7190-7195.
- Ohlenschläger, O., Wöhnert, J., Bucci, E., Seitz, S., Hafner, S., Ramachandran, R., Zell, R. und Görlich, M. (2004). The structure of the stemloop D subdomain of coxsackievirus B3 cloverleaf RNA and its interaction with the proteinase 3C. *Structure* *12*, 237-248.
- Pai, E.F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K.C., John, J. und Wittinghofer, A. (1989). Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* *341*, 209-214.
- Pan, T., Artsimovitch, I., Fang, X.W., Landick, R. und Sosnick, T.R. (1999). Folding of a large ribozyme during transcription and the effect of the elongation factor NusA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 9545-9550.
- Pingoud, A., Fliess, A. und Pingoud, V. (1989). HPLC of oligonucleotides. In *HPLC of macromolecules* (IRL Press at Oxford University Press), pp. 183-208.
- Piotto, M., Saudek, V. und Sklenar, V. (1992). Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *Journal of Biomolecular NMR* *2*, 661-665.
- Reese, M.L. und Dötsch, V. (2003). Fast mapping of protein-protein interfaces by NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 14250-14251.
- Rieder, R., Lang, K., Graber, D. und Micura, R. (2007). Ligand-induced folding of the adenosine deaminase A-riboswitch and implications on riboswitch translational control. *Chembiochem* *8*, 896-902.

- Rösch, P., Wittinghofer, A., Tucker, J., Sczakiel, G., Leberman, R. und Schlichting, I. (1986). *Biochem. Res. Commun.* *135*, 549-555.
- Roth, A., Winkler, W.C., Regulski, E.E., Lee, B.W., Lim, J., Jona, I., Barrick, J.E., Ritwik, A., Kim, J.N., Welz, R., *et al.* (2007). A riboswitch selective for the queuosine precursor preQ(1) contains an unusually small aptamer domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 308-317.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sazani, P.L., Larralde, R. und Szostak, J.W. (2004). A small aptamer with strong and specific recognition of the triphosphate of ATP. *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 8370-8371.
- Schulman, M.P. und Buchanan, J.M. (1951). Biosynthesis of Purines. *J. Biol. Chem.* *196*, 513-526.
- Serganov, A., Polonskaia, A., Phan, A.T., Breaker, R.R. und Patel, D.J. (2006). Structural basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch. *Nature* *441*, 1167-1171.
- Serganov, A., Yuan, Y.R., Pikovskaya, O., Polonskaia, A., Malinina, L., Phan, A.T., Hobartner, C., Micura, R., Breaker, R.R. und Patel, D.J. (2004). Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs. *Chem. Biol.* *11*, 1729-1741.
- Shaka, A., Barker, P. und Freeman, R. (1987). 3-Spin Effects in Broad-Band Decoupling. *J. Magn. Reson.* *71*, 520-531.
- Shine, J. und Dalgarno, L. (1975). Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature* *254*, 34-38.
- Sklenar, V. und Bax, A. (1987). Spin-Echo Water Suppression for the Generation of Pure-Phase Two-Dimensional NMR Spectra. *J. Magn. Reson.* *74*, 469.
- Stoldt, M., Wöhnert, J., Ohlenschläger, O., Görlach, M. und Brown, L.R. (1999). The NMR structure of the 5S rRNA E-domain-protein L25 complex shows preformed and induced recognition. *EMBO J.* *18*, 6508-6521.
- Stryer, L. (1995). *Biochemie* (Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag GmbH).
- Sudarsan, N., Barrick, J.E. und Breaker, R.R. (2003a). Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *RNA* *9*, 644-647.
- Sudarsan, N., Hammond, M.C., Block, K.F., Welz, R., Barrick, J.E., Roth, A. und Breaker, R.R. (2006). Tandem riboswitch architectures exhibit complex gene control functions. *Science* *314*, 300-304.
- Sudarsan, N., Wickiser, J.K., Nakamura, S., Ebert, M.S. und Breaker, R.R. (2003b). An mRNA structure in bacteria that controls gene expression by binding lysine. *Genes Dev.* *17*, 2688-2697.
- Tempest, D.W., Meers, J.L. und Brown, C.M. (1970). Influence of environment on the content and composition of microbial free amino acid pools. *Journal of general microbiology* *64*, 171-185.

- Thore, S., Leibundgut, M. und Ban, N. (2006). Structure of the eukaryotic thiamine pyrophosphate riboswitch with its regulatory ligand. *Science* *312*, 1208-1211.
- Tzakos, A.G., Easton, L.E. und Lukavsky, P.J. (2007). Preparation of large RNA oligonucleotides with complementary isotope-labeled segments for NMR structural studies. *Nature protocols* *2*, 2139-2147.
- Vilela, C. und McCarthy, J.E. (2003). Regulation of fungal gene expression via short open reading frames in the mRNA 5'untranslated region. *Mol. Microbiol.* *49*, 859-867.
- Vitreschak, A.G., Rodionov, D.A., Mironov, A.A. und Gelfand, M.S. (2003). Regulation of the vitamin B12 metabolism and transport in bacteria by a conserved RNA structural element. *RNA* *9*, 1084-1097.
- Voet, D. und Voet, J.G. (1995). *Biochemistry*, second edn (New York, John Wiley & Sons, Inc.).
- Wabiko, H., Ochi, K., Nguyen, D.M., Allen, E.R. und Freese, E. (1988). Genetic mapping and physiological consequences of metE mutations of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *170*, 2705-2710.
- Waldminghaus, T., Heidrich, N., Brantl, S. und Narberhaus, F. (2007). FourU: a novel type of RNA thermometer in *Salmonella*. *Mol. Microbiol.* *65*, 413-424.
- Weigelt, J., van Dongen, M., Uppenberg, J., Schultz, J. und Wikstrom, M. (2002). Site-selective screening by NMR spectroscopy with labeled amino acid pairs. *J. Am. Chem. Soc.* *124*, 2446-2447.
- White, H.B.I. (1976). Coenzymes as fossils of an earlier metabolic state. *J. Mol. Evol.* *7*, 101-104.
- Wickiser, J.K., Cheah, M.T., Breaker, R.R. und Crothers, D.M. (2005a). The kinetics of ligand binding by an adenine-sensing riboswitch. *Biochemistry* *44*, 13404-13414.
- Wickiser, J.K., Winkler, W.C., Breaker, R.R. und Crothers, D.M. (2005b). The speed of RNA transcription and metabolite binding kinetics operate an FMN riboswitch. *Mol. Cell* *18*, 49-60.
- Wijmenga, S.S. und van Buuren, B.N.M. (1998). The use of NMR methods for conformational studies of nucleic acids. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* *32*, 287-387.
- Winkler, W., Nahvi, A. und Breaker, R.R. (2002a). Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* *419*, 952-956.
- Winkler, W.C. (2005). Metabolic monitoring by bacterial mRNAs. *Arch. Microbiol.* *183*, 151-159.
- Winkler, W.C. und Breaker, R.R. (2003). Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *ChemBiochem* *4*, 1024-1032.
- Winkler, W.C., Cohen-Chalamish, S. und Breaker, R.R. (2002b). An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 15908-15913.
- Winkler, W.C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J.A. und Breaker, R.R. (2004). Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* *428*, 281-286.

Winkler, W.C., Nahvi, A., Sudarsan, N., Barrick, J.E. und Breaker, R.R. (2003). An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine. *Nat. Struct. Biol.* *10*, 701-707.

Wöhnert, J., Dingley, A.J., Stoldt, M., Görlach, M., Grzesiek, S. und Brown, L.R. (1999). Direct identification of NH...N hydrogen bonds in non-canonical base pairs of RNA by NMR spectroscopy. *Nucleic Acids Res.* *27*, 3104-3110.

Wüthrich, K. (1986). *NMR of Proteins and Nucleic Acids* (New York, Wiley).

Yamauchi, T., Miyoshi, D., Kubodera, T., Nishimura, A., Nakai, S. und Sugimoto, N. (2005). Roles of Mg²⁺ in TPP-dependent riboswitch. *FEBS Lett.* *579*, 2583-2588.

Zimmermann, G.R., Jenison, R.D., Wick, C.L., Simorre, J.P. und Pardi, A. (1997). Interlocking structural motifs mediate molecular discrimination by a theophylline-binding RNA. *Nat. Struct. Biol.* *4*, 644-649.

Danksagung

Zum Abschluss meiner Doktorarbeit möchte ich mich bei den Personen, die am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren, für ihre Unterstützung danken.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Harald Schwalbe für seine hervorragende und ambitionierte Betreuung, seine Hilfestellungen und beratenden Gespräche bedanken. Durch seine unermüdlichen Anstrengungen hatte ich die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in einem erstklassig ausgestatteten Umfeld durchzuführen, wo es an nichts mangelte.

Ein besonderer Dank gebührt meinem Betreuer Jens Wöhnert, der maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit beteiligt war. Jens war immer mein erster Ansprechpartner. Seine unermüdlichen Ideen, Ratschläge, Hinweise und sein riesiges Wissen zum Thema RNA verhalfen mir dazu, die Fragestellungen effektiv und zielorientiert zu bearbeiten. Eine sehr gute Erfahrung konnte ich durch einen sechs monatigen Aufenthalt in Jens' jetzigem Labor in San Antonio, Texas, sammeln, worüber ich sehr dankbar bin.

Elke Stinal möchte ich für die schnelle und kompetente Durchführung von sämtlichen HPLC-Arbeiten danken.

Christian Richter und Boris Fürtig danke ich für die Hilfe an den Spektrometern und beim Prozessieren von meinen Spektren.

Hamid Nasiri danke ich für die Synthese von isotopenmarkierten Purinliganden.

Sabine Häfner und Matthias Görlach möchte ich dafür danken, dass ich mit ihnen in Jena das Aufreinigen von T7 RNA-Polymerase lernen durfte.

Helena Kovacs danke ich dafür, dass ich mit ihr in Fällanden, Schweiz, ^{31}P -NMR-Messungen machen durfte.

Während meiner Zeit in San Antonio habe ich viel Hilfe von Belinda Leal und den Leuten aus dem Hinck-Lab erfahren, wofür ich ihnen allen sehr dankbar bin.

Anna Paulus und Elena Hartmann danke ich für die hervorragenden organisatorischen Arbeiten, die sie im Sekretariat des Arbeitskreises leisten.

Martin Hähnke danke ich für seine umgehende Hilfe bei allen Computerangelegenheiten.

Dann möchte ich mich bei den Mitgliedern des Middle Rooms, mit denen ich über drei Jahre in einem Raum saß, für die gemeinsame Zeit, die gegenseitige Hilfe und Unterstützung danken. Dazu zählen Karin Abarca-Heidemann, Jitendra Kumar, Stephan Rehm und Sridhar Sreeramulu.

Auch möchte ich mich bei allen Mitgliedern der anderen Räume für die gute Zusammenarbeit danken. Dazu zählen Hashim Al-Hashimi, Aphrodite Anastasiadis-Pool, Neda Bakhtiari, Katja Barthelmes, Holger Berk, Janina Buck, Emily Collins, Elke Duchardt, Jan Ferner, Christian Gerum, Jürgen Graf, Steffen Grimm, Henry Jonker, Sergey Ilin, Vijayalaxmi Manoharan, Daniel Mathieu, Sarah Mensch, Gerd Nielsen, Senada Nozinovic, Anke Reining, Jörg Rinnenthal, Kai Schlepckow, Christian Schlörb, Nicole Schmut, Max Stadler, Karla Werner, Julia Wirmer und Gottfried Zimmermann.

Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern, die nur für kurze Zeit im Arbeitskreis gearbeitet haben, allen neuen Mitarbeitern und all denjenigen, die ich vergessen habe namentlich zu erwähnen, für die gute Kooperation danken.

Euch allen möchte ich für die gute Zusammenarbeit, im Labor und im Büro, das angenehme Arbeitsklima, die gegenseitige Unterstützung und die geselligen Zeiten entweder im Seminarraum, bei Konferenzen oder auf unseren legendären Arbeitskreisfahrten danken.

Meiner Familie danke ich für ihre ausnahmslose Unterstützung während des Studiums und der Doktorarbeit, ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre.

Publikationen

Noeske, J., Richter, C., Grundl, M., Nasiri, H., Schwalbe, H., Wöhnert, J. (2005)

An intermolecular base triple as the basis of ligand specificity und affinity in the guanine- und adenine- sensing riboswitch RNAs.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **102** (5):1372-7.

PMID: 15665103

Noeske J, Richter C, Stirmal E, Schwalbe H, Wöhnert J. (2006)

Phosphate-group recognition by the aptamer domain of the thiamine pyrophosphate sensing riboswitch.

Chembiochem., **7** (9):1451-6.

PMID: 16871614

Noeske J, Buck J, Fürtig B, Nasiri HR, Schwalbe H, Wöhnert J. (2007)

Interplay of 'induced fit' und preorganization in the ligand induced folding of the aptamer domain of the guanine binding riboswitch.

Nucleic Acids Res., **35** (2):572-83.

PMID: 17175531

Schwalbe H, Buck J, Fürtig B, Noeske J, Wöhnert J. (2007)

Structures of RNA switches: insight into molecular recognition und tertiary structure.

Angew. Chem. Int. Ed. Engl., **46** (8):1212-9.

PMID: 17226886

Noeske J, Schwalbe H, Wöhnert J. (2007)

Metal-ion binding und metal-ion induced folding of the adenine-sensing riboswitch aptamer domain.

Nucleic Acids Res., **35** (15):5262-73.

PMID: 17686787

Buck J, Fürtig B, Noeske J, Wöhnert J, Schwalbe H. (2007)

Time-resolved NMR methods resolving ligand-induced RNA folding at atomic resolution.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **104** (40):15699-704.

PMID: 178953

Jonas Noeske



PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 29. Oktober 1978
Geburtsort: Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit: deutsch

PROMOTION

05/2004 – 11/2007 *Universität Frankfurt am Main*
Doktorarbeit unter Prof. Dr. Harald Schwalbe
„Strukturelle Untersuchungen an Metabolit-bindenden Riboswitch-RNAs mittels NMR“
01/2007 – 07/2007 *University of Texas Health Science Center San Antonio*
Abschnitt der Doktorarbeit unter Prof. Dr. Jens Wöhnert
San Antonio, Texas, USA

STUDIUM

11/2003 - 05/2004 *Universität Frankfurt am Main*
Diplomarbeit unter Prof. Dr. Harald Schwalbe
„Biochemische und strukturelle Untersuchungen an Riboswitch-RNA“
10/1999 – 05/2004 *Universität Frankfurt am Main*
Studium der Biochemie
10/2001 *Universität Frankfurt am Main*
Vordiplom
02/2002 – 07/2002 *Université d'Évry Val d'Éssonne*
Studium der Zellbiologie und Physiologie
Évry, Val d'Éssonne, Frankreich

ZIVILDIENTST

07/1998 - 07/1999 *Diakoniestation des evangelischen Regionalverbands Frankfurt am Main*
Mobiler Sozialer Hilfsdienst

SCHULBILDUNG

08/1995 - 06/1998 *Friedrich-Dessauer-Oberstufengymnasium, Frankfurt am Main*
Oberstufe
01/1996 – 08/1996 *Derrinallum College*
Austauschschüler
Derrinallum, Victoria, Australien
08/1989 - 07/1995 *Integrierte Gesamtschule, Kelsterbach*
Unter- und Mittelstufe
08/1985 - 07/1989 *August Gräser Grundschule, Frankfurt am Main*
Grundschule