

Biophysikalische Untersuchungen an RNS

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von

Tom Landgraf

aus Karl-Marx-Stadt

Frankfurt am Main, 2022

(D30)

vom Fachbereich 14 der
Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: **Prof. Dr. Clemens Glaubitz**

Erstgutachter: **Prof. Dr. Harald Schwalbe**
Zweitgutachter: **Prof. Dr. Alexander Heckel**

Datum der Disputation:

Erklärung und Versicherung

Erklärung

Ich, Tom Landgraf, erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung im mathematisch-naturwissenschaftlichen Bereich unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den 22. August 2022

Tom Landgraf

Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel

„Biophysikalische Untersuchungen an RNS“

selbstständig verfasst und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass schriftliche Entlehnungen nicht stattgefunden haben, soweit sie in dieser Arbeit nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der entsprechenden Schrift bezeichnet sind.

Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen habe.

Frankfurt am Main, den 22. August 2022

Tom Landgraf

Inhalt

Verwendete Akronyme	8
Zusammenfassung.....	10
1 Biochemischer Hintergrund.....	14
1.1 Die Struktur von RNS.....	14
1.1.1 Die sekundäre Struktur der RNS.....	14
1.1.2 Die Helix.....	15
1.1.3 Stamm-Schleifen.....	16
1.1.4 Interne Schleifen	16
1.1.5 Einzelsträngige RNS Abschnitte.....	17
1.1.6 Die Tertiäre Struktur der RNS.....	17
1.1.7 Mehrfachübergänge.....	17
1.1.8 Dreier Basenpaarung und Bindung in die kleine Furche: A-klein Motiv	17
1.1.9 Langreichweiteninteraktionen: Pseudoknoten und verbundene Schleifeninteraktionen...	18
1.1.9.1 Tetraschleifenempfängermotive.....	18
1.2 Der Sekundär Botenstoff c-di-GMP	19
1.3 Riboschalter.....	21
1.3.1 Der transkriptionale Mechanismus	25
1.4 Co-Transkriptionale Faltung	26
1.5 Riboschalter der sekundären Botenstoffe	26
1.5.1 c-di-GMP Riboschalter.....	28
1.5.2 Clostridium Difficile und seine c-di-GMP Riboschalter	30
2 Material und Methoden	33
2.1 DNS Präparation	33
2.1.1 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	33
2.1.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese.....	34
2.2 RNS Präparation	35
2.2.1 Test Transkription.....	35
2.2.2 Präparative Transkription.....	35
2.2.3 Mutationen des Cd1 Riboschalters	36
2.3 RNS Aufreinigung.....	36
2.3.1 DEAE-Säule	36
2.3.2 HPLC.....	37
2.3.3 Aufreinigung mit zentrifugaler Konzentration	37
2.4 Gelelektrophorese.....	38

2.4.1	Agarose-Gelelektrophorese	38
2.4.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.4.3	Natürliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.5	UV/vis Spektroskop	38
2.6	Isotherme Titrationskalorimetrie	39
2.7	NMR-Spektroskopie.....	40
2.7.1	1D ^1H 1-1 jump and return	40
2.7.2	$^1\text{H}/^1\text{H}$ 1-1 Jump and return NOESY	41
2.7.3	$^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC	42
2.7.4	Best-TROSY	42
2.7.5	$^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -sfHMQC ^{189,190} und Ir- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -sfHMQC.....	43
2.7.6	x-Filter 1D und X-Filter NOESY.....	44
2.7.6	NMR Spektrometer	45
2.8	Markov Modellierung.....	45
3	Ergebnisse und Diskussion ¹⁹⁵	46
3.1	Bindungsverhalten von c-di-GMP an den Cd1 Riboschalter	46
3.1.1	Magnesiumbedarf des Cd1 Riboschalters	46
3.1.2	Start und Endpunkt der c-di-GMP Bindungsfähigkeit von Cd1	47
3.2	Sekundär- und Tertiärstruktur des Cd1-Riboswitches	49
3.2.1	Sekundär- und Tertiär--Struktur der Aptamerdomäne	49
3.2.2	Tertiärstruktur der Aptamerdomäne	54
3.2.3	Strukturelemente der Cd1 Expressionsplattform	56
3.3	Der regulatorische Mechanismus des Cd1 Riboschalters	60
3.4	Ausblick	64
4	^{19}F Ligandenscreening ²⁰⁵	65
4.1	Screening und RNS Bibliothek	65
4.2	Material und Methoden	66
4.2.1	RNS Herstellung.....	66
4.2.2	NMR Proben Zusammensetzung.....	66
4.2.3	T_2 -Relaxationsmessungen und Auswertung.....	66
4.3	Ergebnis und Diskussion	67
5	Licht geschalteter RNA Doppelstrang.....	70
5.1	Lichtschaltung in biologischen Systemen.....	70
5.1.1	Licht gesteuerte Doppelstranghybridisierung.....	71
5.1.2	Projekt Übersicht.....	72

5.2 Material und Methoden	73
5.2.1 RNS Synthese.....	73
5.2.2 Licht geschaltete 1D und 2D NMR Messungen	74
5.3 Ergebnis und Diskussion.....	74
5.3.3 Zusammenfassung und Ausblick	79
6 SARS-CoV-2 RNA Sekundärstruktur Aufklärung RNA 5_SL1 und 5_SL7	80
6.1 Biochemischer Hintergrund	80
6.1.1 Covid-19 und seine RNA	80
6.2 Material und Methoden	82
6.2.1 RNA Herstellung ²⁵⁴	82
6.2.3 ¹ H/ ¹ H-TOCSY	82
6.2.4 Best-TROSY- ¹ H/ ¹⁵ N-HNN-COSY	83
6.3 Ergebnis und Diskussion.....	84
6.3.1 Sekundärstruktur von 5_SL1	84
6.3.2 Sekundärstruktur von 5_SL7	86
7 Quellen	89
Appendix.....	108
A1: ¹⁹ F Fragmentbibliothek	108
A2: Beispiel Mathematica Markov Modeling Script.....	117
A3: Tabellen der verwendete Raten im Markov Modeling.....	130
This thesis contains collaborative work	132
Veröffentlichungen	133
Konferenzbeiträge.....	134
Danksagung	135
Lebenslauf	136

Verwendete Akronyme

AdoCbl: Adenosylcobinamid

ATP: Adenosintriphosphat

AqCbl : Aquocobalamin

c-di-AMP: Cyclisches Adenosinmonophosphat

c-di-GMP: Cyclisches Guanosinmonophosphat

c-GAMP: Cyclic Guanosine Monophosphate–Adenosine Monophosphate

CPMG: Carr-Purcell-Meiboom-Gill -Pulssequenz

DEAE: Diethylaminoethylcellulose

DNS: Desoxyribonukleinsäure

DGC: Diguanylatcyclase

dNTP: Desoxyribonukleosidtriphosphat

DI-RNS: Defective Interfering RNA; Unterbrechend Eingreifende RNS

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

ETC: equilibration time curve, Gleichgewichts Zeit Kurve

FMN: Flavinmononukleotid

GlcN6P: Glucosamin-6-phosphat

HPLC: Hochdruckflüssigkeitschromatographie

HH-Ribozym: Hammerhead ribozyme

MeAqCbl: Methylcobalamin

MoCo: Molybdän Cofaktor

mRNS: Boten-Ribonukleinsäure

NTP: Nukleosidtriphosphate

ORF: Open reading frame; Offener Leserahmen

PAA: Polyacrylamid

PES: Polyethersulfon

PDE: Phosphodiesterase

RBS: Ribosom Bindestelle

RNS: Ribonukleinsäure

SAM: S-Adenosylmethionin

TAE: TRIS-Acetat-EDTA-Puffe

TBE: TRIS-Borat-EDTA-Puffer

TPP: Thiamin-pyrophosphat

THF: Tetrahydrofolsäure

UTR: untranslatierte Region

TRIS: Tris(hydroxymethyl)aminomethan

WCo: Wolfram Cofaktor

ZMP: 5-amino-4-imidazol carboxamid ribosid 5'-monophosphat

Zusammenfassung

mRNA ist einer der wichtigsten Informationsträger in lebenden Zellen. Mit ihr wird die in der DNS gespeicherte Information zu aktiven Zellprozessen umgesetzt. Dabei finden erste regulatorische Prozesse, die den Phänotyp eines Organismus bestimmen können, bereits über Strukturelemente auf der mRNA statt. Diese, als Riboschalter bezeichneten Strukturen, können spezifisch, kleine Moleküle binden und dadurch ihre Struktur ändern. Durch diese dynamische Änderung der Struktur, in An- oder Abwesenheit des Liganden, wird reguliert, ob nachfolgende Gene vom Ribosom abgelesen werden können. Der Cd1-Riboschalter aus *Clostridium Difficile* ist schon während der Transkription aktiv und ein Teil des regulatorischen Netzwerkes, das bestimmt, ob das Bakterium einen mobilen oder stationären Lebensstil einnimmt. Das zentrale Signalmolekül in diesem Netzwerk ist der sekundäre Botenstoff c-di-GMP, der gleichzeitig auch der Ligand des Cd1-Riboschalters ist. In der folgenden Arbeit wurde der zeitliche und strukturelle Ablauf des Cd1 Regulationsmechanismus und die Bindung von c-di-GMP untersucht. Auch ohne einen Riboschalter in der Sequenz ist strukturierte mRNA ein interessanter Forschungsgegenstand. Wie die Covid-19 Pandemie und die Forschungen, mRNA Abschnitte als Krebsmedikamente zu gebrauchen¹, zeigen, gewinnt RNA immer mehr an Bedeutung für die medizinische Forschung und Anwendung. Mit dieser Motivation im Hintergrund wurden drei weitere RNA Projekte bearbeitet. Im ersten wurde ein ¹⁹F-Screening für die Erkennung von RNA bindenden Fragmenten etabliert. Im zweiten wurde ein RNA Doppelstrang untersucht, der mit Hilfe verschiedener, kovalent gebundener Spiropyrene reversibel gefaltet und entfaltet werden sollte. Im abschließenden Projekt wurden im Rahmen der COVID-19-NMR Initiative zwei Sekundärstrukturelemente der Covid-19 RNA untersucht.

Kapitel 1 behandelt den biochemischen Hintergrund für das Cd1-Riboschalter Projekt. Das erste Unterkapitel beschäftigt sich mit der Struktur der RNA. Hier wird vertieft auf Sekundärstrukturelemente wie Helix, interne Schleifen, Stammschleifen und Basenpaarung sowie tertiäre Strukturelemente wie Dreierbasenpaare, Pseudoknoten und Tetraschleifenempfängermotive eingegangen. In Abschnitt 1.2 wird dargelegt wie c-di-GMP abhängig von der K⁺-Ionen Konzentration als Dimer oder G-Quadruplex vorliegt und mit welchen Proteindomänen c-di-GMP interagiert um regulatorisch aktiv zu werden oder auf- und abgebaut zu werden. Als nächstes folgt eine Übersicht der bekannten Riboschalter und ihrer Liganden sowie eine Erklärung des transkriptionellen Regulationsmechanismus und der cotranskriptionellen Faltung. Im Abschnitt „Riboschalter der sekundären Botenstoffe“ wird dargelegt, wie die Architektur der Riboschalter für die sekundären Botenstoffe c-GAMP, c-di-AMP und ZMP aufgebaut ist. Im folgenden Abschnitt wird die Architektur der bekannten c-di-GMP Riboschalter erklärt und die bisherigen Untersuchungen an c-di-GMP Riboschaltern in anderen Bakterien außer *C.Difficile* zusammengefasst. Es folgt eine Übersicht des bisherigen Stands der Forschung, die an c-di-GMP Riboschaltern in *C.Difficile* durchgeführt wurde.

In **Kapitel 2** werden die verwendeten Methoden und Protokolle zur Herstellung von DNS Vorlage, für die Transkription, sowie RNA Präparation, Aufreinigung und Qualitätskontrolle erläutert. Des Weiteren werden die während der Arbeit verwendeten Messmethoden wie ITC und NMR-Spektroskopie erläutert. Die DNS Vorlagen verschiedener Längen wurden durch selektive Methoxy-Primer mittels PCR, mit Plasmid als Vorlage, hergestellt. Aus der DNS Vorlage wurde nach Optimierung der Transkriptionsbedingungen mittels T7-Polymerase RNA transkribiert. Die erhaltene RNA wurde durch zentrifugale Konzentration, DEAE-Säule und HPLC aufgereinigt. Die Länge und Sauberkeit von DNS wurde mittels Agerose- und PAA-Gelelektrophorese überprüft. Für RNA wurden denaturierende und natürliche PAA-Gelelektrophorese verwendet. Die Konzentration der RNA wurde durch UV/VIS-Spektroskopie am NanoDrop™ ermittelt. Zur Bestimmung von K_D, K_{ON} und K_{OFF} Raten der c-di-GMP Bindung wurde ITC eingesetzt. Um die Struktur der hergestellten RNA Konstrukte zu

untersuchen, wurde NMR-Spektroskopie als Methode eingesetzt. Daher wird in den Unterkapiteln ab 2.7 dargelegt, welche Signale für verschiedene Pulssequenzen in der Iminoregion von RNS zwischen 9 und 15 ppm, zu erwarten sind. Als Pulssequenz wurden jump and return ^1H -1D, jump and return NOESY, $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC, $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HMQC, $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY und ^1H -xfilter Experimente eingesetzt. Jump and return ^1H -1D dienen vor allem als schnelle Messung um Veränderungen im ^1H -NMR-Spektrum von RNS zu beobachten. Bei allen Pulssequenzen mit einem jump and return Element dient dies zur Unterdrückung des Wassersignals. Die $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY Pulssequenz ist eine zentrale Messmethode in der Aufklärung der Sekundärstruktur der RNS, da durch sie Protonen in bis zu 5 Å Abstand miteinander korreliert werden. Dies ermöglicht die sequenzielle Zuordnung von helicalen Strukturen in der RNS. $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC, $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HMQC und $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY dienen im RNS Kontext der Korrelation von Protonen- und Stickstoffsignalen und der damit einhergehenden Unterscheidung von Guanin und Uridin Signalen. X-filter Elemente dienen in einer Pulssequenz dazu, die Signale von an Isotop markierten Atomen gebundenen Atomen auszufiltern oder zu selektieren, so dass diese Signale leicht zugeordnet werden können. Abschließend wird beschrieben, wie die Simulation aufgebaut wurde, durch die der zeitliche Verlauf der Cd1 Schaltung modelliert wurde.

Kapitel 3 behandelt die Ergebnisse die bei der Untersuchung des Cd1-Riboschalters erreicht wurden und die Diskussion dieser gegeneinander und anhand der Literatur. In Unterkapitel 3.1.1 wird gezeigt, dass die Bindung von c-di-GMP an das Cd1-Aptamer ein konzentrationsabhängiges Magnesiumverhältnis braucht. Dieses Verhältnis wurde ausgehend von initialen Messungen als 1/40 (RNS/Ligand) bestimmt. Spätere ITC Messungen geben aber Hinweise darauf, dass dieses Verhältnis bei niedrigen RNS Konzentrationen höher liegt und bei größeren RNS Konzentrationen niedriger. Die Bestimmung des Start- und Endpunktes der c-di-GMP Bindung wird in Unterkapitel 3.1.2 behandelt. Es wurde ermittelt, dass Cd1 bei 83 Nukleotiden eine alternative schwach Ligand bindende Konformation einnimmt, die wahrscheinlich durch eine P1 Helix bis zum Erreichen von Cd1-87 stabilisiert wird. Ab Cd1-87 bildet sich die reguläre von der Literatur vorhergesagte Bindetasche. Das Ende der c-di-GMP Bindung wird mit Cd1-148 erreicht, auch wenn hier noch Reste der Reportersignale für Bindung zu sehen sind. Diese Reste werden aber aller Wahrscheinlichkeit nach durch eine Cd1-83 entsprechende Konformation der Bindetasche erzeugt. In Kapitel 3.2 wird gezeigt, wie durch NMR Messungen die Zuordnung der Sekundärstruktur des Cd1-Riboschalters vollzogen wurde. Durch diese Messungen konnte bestätigt werden, dass in allen Längen eine P2 und P3 Helix vorhanden ist. Im Aptamer wird die Ligandbindung durch zwei Interaktionen zwischen P2 und P3 stark stabilisiert und der untere Abschnitt der P3 erst dann nicht mehr dynamisch, wenn c-di-GMP gebunden wird. Durch x-filter Experimente und Mutationen konnte nachgewiesen werden, dass C87 das basenpaarende Nukleotid an einem G des Liganden ist. Die Anwesenheit des HP1 Stamms konnte in den Längen 147, 148 und 160 nachgewiesen werden, wobei besonders der Vergleich der NOESY Spektren von Cd1-147 und Cd1-148 die Änderung der Sekundärstruktur hin zum Antiterminator zeigen. Der Verlauf der Bindungsaffinitäten wurde auch durch ITC Messungen an Cd1-83, 86, 87, 88, 135 und 146 bestätigt. Für die volle Länge (Cd1-160) des Riboschalters konnte gezeigt werden, dass der Terminatorstamm ausgeformt ist. Die erreichten Ergebnisse wurden in einem Modell zusammengefasst und der zeitliche Verlauf der Cd1 Regulation simuliert. Die Simulation wird in Kapitel 3.3 beschrieben. Aus der Simulation ist zu erkennen, dass Cd1, wie erwartet, Ligand abhängig schaltet. Dabei ist der Aus-Zustand bei hoher Ligandkonzentration zu 90% populiert und der An-Zustand zu 100% bei niedriger Konzentration. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsgeschwindigkeit bei hohen Ligandkonzentrationen einen starken Einfluss auf die Regulationseffizienz des Riboschalters hat. So ist bei einer Transkriptionsgeschwindigkeit von 100 nt/s nach 1 s eine Gleichverteilung von An- und Aus-Zustand zu erkennen. Dieses Verhalten kann durch einen Stopp der Transkription an der potentiellen Pausierstelle U141-145 aufgehoben werden. Unter den Rahmenbedingungen des Modells erwiesen sich Transkriptionsgeschwindigkeiten von um

die 20 nt/s als optimal und bei niedrigen Ligandkonzentrationen hatte die Transkriptionsgeschwindigkeit faktisch keine Auswirkungen auf die Regulation. Ein interessantes Ergebnis der Modellierung ergab sich aus der Notwendigkeit der Verwendung einer Rate für konkurrenzlose Basenpaarschließungen. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Rate von 400 nt/s ausreicht um einen voll funktionsfähigen Riboschalter zu beschreiben. Die Diskussion der Funktionsweise des Cd1-Riboschalters wird mit einem Ausblick in Kapitel 3.4 abgeschlossen. Hier werden Möglichkeiten diskutiert, wie das Verständnis der Struktur durch NMR, Kristallographie oder Cryo-EM verbessert oder Cd1 in einen Binder für andere zyklische sekundäre Botenstoffe transformiert werden kann. Weiterhin wird auf die Möglichkeiten eingegangen, das kinetische Modell durch Messungen mittels fotogeschützter RNS oder Liganden zu verfeinern.

In **Kapitel 4** werden die Hintergründe, Methoden und Ergebnisse des ^{19}F Screenings von 101 Fragmenten, die alle ein oder mehrere ^{19}F Atome besaßen, an Cd1-98 dargestellt. Es werden kurz die gängigen Screeningstrategien erläutert und die Unterschiede zur verwendeten Fragmentstrategie erklärt. Im Anschluss werden die Quantifizierung und die Messung der T_2 -Relaxation NMR Experimente erläutert, auf die Zusammensetzung der NMR Proben wird eingegangen. Insgesamt wurden 9 Fragmente gefunden die an Cd1-98 binden. Diese sind größtenteils planar mit Ausnahme von 2 Fragmenten bei denen die eine Hälfte des Moleküls nicht aromatisch ist. Des Weiteren besitzen alle Fragmente, außer einem, mindestens eine Aminogruppe im Molekül. Die daraus resultierende Vermutung, dass die Fragmente in die RNS interkalieren, konnte durch RNS beobachtende NMR Messungen nicht überprüft werden, da keine Signaländerung im Imino-Bereich zu erkennen war. Durch Verdrängungsexperimente konnte gezeigt werden, dass die Fragmente, nicht wie c-di-GMP, die RNS Faltung homogenisieren und auch nicht in der Bindetasche gebunden werden.

Kapitel 5 behandelt die Vermessung eines RNS Doppelstrangs, der mit einem kovalent eingebauten Spiropyran, das durch drei unterschiedliche Verbindungsstücke mit der RNS verbunden ist, modifiziert wurde. Es wird auf veröffentlichte Literatur eingegangen, die sich mit der Fotomodifikation von biologischen Systemen beschäftigt. Diese enthält zu großen Teilen Studien in denen nicht reversible Lichtschaltung eingesetzt wurde. Als durch Licht schaltbare Gruppen wurden in diesen Studien Perylen, O-Nitrobenzyl, p-Hydroxyphenacyl, Coumarinyl-4-methyl, Benzoin, Nitroindoline, Perylene, Rutheniumkomplexe und Nitrophenylethyle eingesetzt. Modifikationen zur reversiblen Fotoschaltung von RNS Systemen werden bevorzugt an oder als Ersatz für die Nukleobase angebracht. Dabei wurden bereits erfolgreich Spiropyrane, Azobenzole, Diarylethene, Stilbene und Hydrazone eingesetzt. Um den Einfluss der drei unterschiedlichen Verbindungsstücke, Serinol, Threoinol und Aminoglycol, auf die Struktur des RNS Doppelstrangs zu bestimmen, wurden diese mit einem Serinolkonstrukt verglichen, bei dem das Spiropyran durch eine Acetyl-Gruppe ersetzt wurde. Im unbelichteten Zustand wurde festgestellt, dass in 5' und 3' Richtung zwei A:U Basenpaare rund um die Modifikation gestört sind. Des Weiteren wurde gezeigt, dass im Aminoglycolkonstrukt eine Haupt- und eine Nebenkongformation vorhanden ist. Nach Belichtung wurde festgestellt, dass mit keinem der gemessenen Konstrukte eine vollständige reversible Doppelstrangfaltung vollzogen werden konnte, was wahrscheinlich auf eine mangelnde Integration von Verbindungsstück und Spiropyran in die Sekundärstrukturabfolge zurückzuführen ist. Im Ausblick werden die Implikationen dieses Befundes diskutiert. Als wichtigster Punkt ist festzuhalten ist, dass das Aminoglycolkonstrukt den größten Effekt bei der Fotoschaltung aufwies. Künftig könnte es günstiger sein, den Fotoschalter starrer in ein RNS Konstrukt einzubauen, um so eine Positionierung in der Helix zu forcieren.

In **Kapitel 6** wird die Studie von zwei Sekundärstrukturelementen, 5_SL1 und 5_SL7, aus dem 5'-UTR (untranslatierte Region) der COVID-19 RNS dargestellt. Diese Studie erfolgte im Rahmen der COVID-19-NMR Initiative mit vielen internen und externen Kollegen. Die 5'-UTR der SARS-CoV-2 Viren

besteht aus 8 Stammschleifenstrukturen, die wichtige regulatorische Funktionen übernehmen. So werden von der ersten Stammschleifenstruktur Langreichweiteninteraktionen in die 3'-UTR vermittelt und so regulatorisch in die Virusreplikation eingegriffen. Mutationen an 5_SL1 hatten immer Störungen in der Virusreplikation oder tote Viren zur Folge. Ein interessanter Mechanismus befindet sich in ORF1. Hier wird durch die Strukturen at-HP (Abschwächerhaarnadel) und PK (Pseudoknoten), eine Leserahmenverschiebung um ein Nukleotid gesteuert. In diesem Projekt wurden andere Protokolle, als im Cd1 Projekt, zur RNS Herstellung verwendet. Daher wird auf diese Änderung noch einmal in einem Methodenteil eingegangen. Da für einige der vermessenen Strukturelemente später Strukturrechnungen folgen, wurden einige neue Pulssequenzen wie HNN-COSY oder TOCSY verwendet. Beim HNN-COSY werden die Atome in einer basengepaarten Wasserstoffbrücke über 1J und 2J Kopplungen direkt miteinander korreliert. In Pulssequenzen mit TOCSY Elementen werden alle Protonen eines Spinsystems miteinander korreliert. Für 5_SL1 konnten über NOESY, $^1H/^{15}N$ -TROSY, und HNN-COSY die GH1, UH3, GN1, GN3 und die basenpaarenden AN1 und CN3 Atome komplett zugeordnet werden. Aus den NOESY Daten konnten ebenfalls alle basengepaarten CH41/CH42 Protonen zugeordnet werden. Die Zuordnung aller AH2 Protonen und verbundenen N3 und N1 Resonanzen geschah über Ir- $^1H/^{15}N$ -HMQ Messungen. Aus den $^1H/^{15}N$ -TOCSY Messungen konnten alle H5/H6 Signale für Uridine und Citidine zugeordnet werden. Insgesamt konnten für SL_1 zwei helicale Bereiche zugeordnet werden. Für die Zukunft verbleiben die Ausbuchtung zwischen den zwei Helices und die Schleife der Haarnadelstruktur sowie die ^{13}C Zuordnung. Für das Konstrukt 5_SL7 konnte nur eine, weitaus unvollständigere Zuordnung erreicht werden. Insgesamt konnten GH1, UH3, GN1, GN3, AN1, CN3, AH2, AN1, AN3, CH41 und H42 für ein Viertel der Atome, der langen helicalen Struktur von SL7, eindeutig zugeordnet werden. Dies liegt vor allem daran, dass Anfang und Ende der Helix sequenziell komplementär sind und so zwei der gefundenen NOESY Pfade nicht eindeutig zuzuordnen waren. Des Weiteren gibt es instabile Abschnitte in der Struktur von SL7, wahrscheinlich daraus folgend, besetzt SL7 zwei leicht verschiedene Konformationen, was für Signalverdopplung und -überlagerung sorgt.

1 Biochemischer Hintergrund

1.1 Die Struktur von RNS

Als primäre Struktur der Ribonukleinsäure (RNS) wird die Abfolge der einzelnen Nucleotide bezeichnet. Ein Nucleotid besteht dabei aus einer Nucleobase, die durch einen Zucker mit einer Phosphatgruppe verbunden ist. RNS wird durch eine RNS-Polymerase von der archivierten DNS in RNS überschrieben und besteht aus den Nucleobasen Guanin (G), Adenin (A), Cytosin (C) und Uracil (U). DNS besteht dagegen aus Guanin, Adenin, Cytosin und Thymin (T). Ein weiterer Unterschied von RNS zu DNS ist die Zuckereinheit, die an die einzelnen Nucleobasen gebunden ist, um ein Nucleosid zu formen. Ist in DNS Desoxyribose verbaut, so ist es in RNS die Ribose. Diese beiden Zucker unterscheiden sich nur darin, dass die Ribose eine OH Gruppe an der 2' Position besitzt. Dieser kleine Unterschied ermöglicht der RNS allerdings eine größere strukturelle Flexibilität als der DNS. Diese strukturelle Flexibilität ist auch nötig, damit die RNS ihre zahlreichen Aufgaben im Stoffwechsel übernehmen kann. Dient die DNS nur als Archiv der Erbinformation, ist RNS als Regulator, Co-Faktor, Informationsträger und Katalysator aktiv. Die strukturelle Vielfalt der RNS wird allerdings mit einer deutlicheren Instabilität der RNS erkauft. Durch die 2'-OH Gruppe kann es zu einer Addition des Sauerstoffs an das Phosphoratom, der Phosphatgruppe des vorausgegangenen Nucleotides, kommen. In dieser sogenannten Inline-Konformation kommt es zu einer Abspaltung der Phosphatgruppe vom vorausgegangenen Nucleotid und der Ausbildung einer Phosphatbrücke zwischen dem 2' und 3' Sauerstoff des angreifenden Nucleotids, was einen Bruch des RNS-Strangs bedeutet. Diese Reaktion wird durch Mg^{2+} -Ionen, wie sie in vielen Puffern und Zellen vorkommen, begünstigt².

1.1.1 Die sekundäre Struktur der RNS

Durch die Ausformung von Basenpaaren beginnen sich strukturierte Abschnitte in der RNS zu formen. Diese strukturierten Abschnitte können verschiedene Formen annehmen, die in den folgenden Unterkapiteln diskutiert werden. Prinzipiell können sich Basenpaare an drei verschiedenen Seiten einer Nucleobase formen, Watson-Crick-Seite, Hoogsteen-Seite und Zucker-Seite³. Neben den zwei, bei weitem am häufigsten vorkommenden, Watson-Crick Basenpaaren G:C und A:U, kommen in RNS auch seltenere Basenpaare regelmäßig vor, was weiter zu der strukturellen Vielfalt von RNS beiträgt. Das am häufigsten vorkommende nicht Standard Basenpaar ist das, über die Watson-Crick Seite interagierende, G:U Basenpaar. Zwischen G und U werden zwei Wasserstoff-Brücken ausgebildet. Des Weiteren weisen G:U Basenpaare eine, mit dem A:U Basenpaaren vergleichbare, thermodynamische Stabilität auf. G:U Basenpaare sind in vielen funktionellen RNAs wie tRNA oder dem Gruppe I selbst schneidendem Intron an essenziellen Positionen vorhanden und über zahlreiche Organismen konserviert⁴.

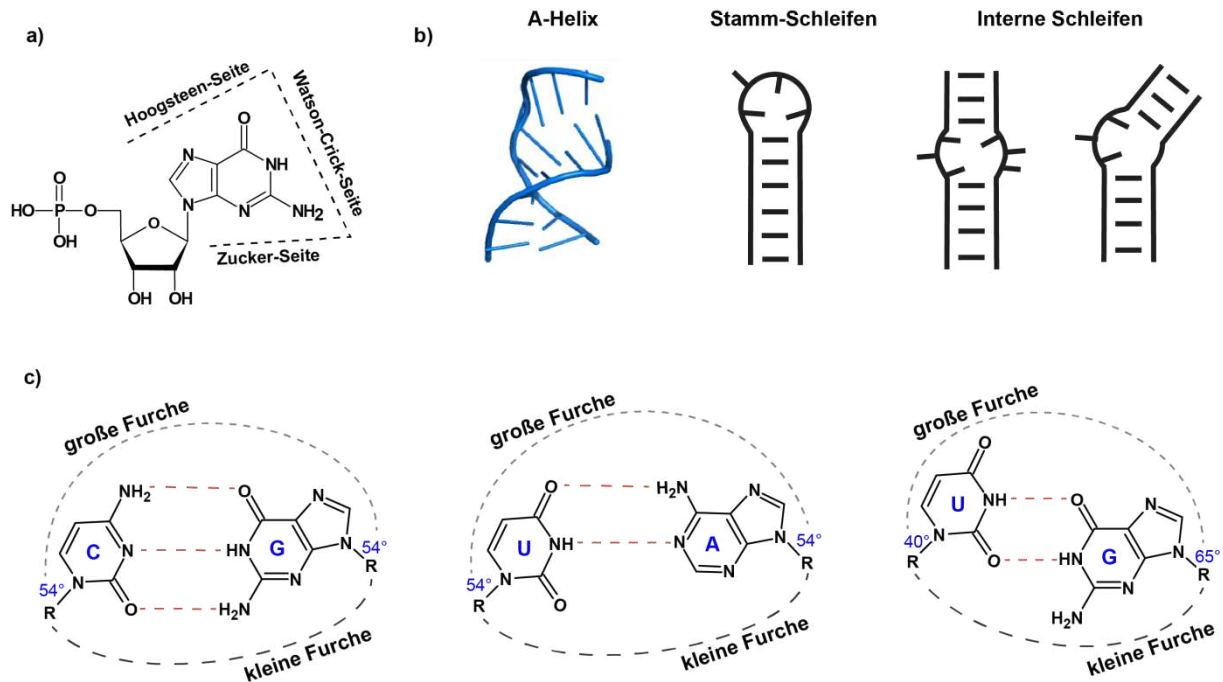


Abbildung 1: a) Benennung der einzelnen Seiten einer Nukleinbase über die Basenpaare geformt werden können. b) Schematische Darstellung der gängigsten Sekundärstrukturmotive in RNS c) Repräsentation der drei häufigsten Basenpaare in RNS.

Durch den geometrischen Aufbau des G:U Basenpaares werden einzigartige Eigenschaften für die lokale Struktur der RNS erzeugt. So wird eine ungebundene Aminogruppe in der kleinen Furche für Interaktionen verfügbar, die bei einem G:C Paar in einer Wasserstoffbrücke gebunden wäre. In der großen Furche wird, durch Guanin N7, O6 und Uridin O4, eine partiell negativ geladene Bindungsstelle für Metallionen geschaffen⁴. Andere, bei weitem instabilere, Paarungen wie G:G, U:U oder A:C können ebenfalls in RNS beobachtet werden, doch sind diese meist eher in flexiblen Abschnitten der RNS Struktur zu finden.

1.1.2 Die Helix

RNS liegt in den meisten Strukturen vorwiegend in einer A-Helix vor. Die A-Helix besteht aus zwei antiparallelen Abschnitten der RNS, die sich in einer rechtsdrehenden Spirale zusammengefügt haben. Durch die unterschiedliche Distanz zwischen der 3'- und der 5'-Positionen entlang der Kanten eines Basenpaares, entsteht ein ungleichmäßiger Abstand zwischen den Phosphatrückgraten der beiden Stränge. Es kommt zur Bildung einer kleinen und einer großen Furche. Durch die Bindung von zwei, zuvor weitestgehend frei beweglichen, RNS Abschnitten in die weitaus unflexiblere Struktur einer Helix wird viel Entropie eingebüßt, was ungünstig für die Thermodynamik der Faltung ist. RNS kann in einer Helix weit weniger mit dem umgebenden Wasser interagieren, als in einer geöffneten Konformation. Daher kann der Entropieverlust, durch das Falten einer Helix, teilweise durch einen Gewinn an Entropie durch das frei werdende Wasser wieder ausgeglichen werden. Um nach der Faltung ein niedrigeres Energieniveau einzunehmen, braucht es weitere Faktoren, die die Ausbildung einer Helix energetisch begünstigen. Die zwei Faktoren, die diese Aufgabe in einer RNS/DNS Helix erfüllen, sind die van-der-Wals-Anziehung der übereinander liegenden Basenpaare und die Wasserstoff-Brückenbindungen in den Basenpaaren. Der Bindungswinkel zwischen dem C1' Zucker Atom und der Base beträgt für G:C und A:U Basenpaare in einer regulären A-Helix ca. 54° für jede der Basen. Durch die Einführung eines G:U Basenpaares wird diese einheitliche Geometrie gestört, da in

einem G:U Paar die Bindungswinkel zwischen dem C1' Zuckeratom und der Base beim G ca. 40° und ca. 65° beim U betragen⁴.

1.1.3 Stamm-Schleifen

Die Stamm-Schleifen-Struktur oder Haarnadelstruktur (Abb.1 b) besteht aus einer Helix, deren beiden RNS Abschnitte durch eine Schleife bestehend aus 2-14 Basen verbunden sind. Anfang und Ende der Schleife wird durch das erste geformte Watson-Crick-Basenpaar definiert. Dieses Abschlussbasenpaar ist ein entscheidender Faktor für die Stabilität der Schleife. Die stabilsten, häufigsten und am weitesten erforschten Stamm-Schleifen-Strukturen besitzen vier Basen in der Schleife⁵. Stamm-Schleifen-Struktur motive werden nach der Abfolge und Anzahl der Basen in der Schleife benannt. Die beiden häufigsten und stabilsten Motive für die Viererschleifen sind die Motive GNRA und UNCG. Wobei N für G, A, U oder C und R für G oder A steht^{5,6}. Bei den UNCG Motiven ist UUCG die mit Abstand stabilste Viererschleifen Sequenz⁶, was vor allem daran liegt, dass sich zwischen G-5' und U-3' ein zusätzliches Basenpaar ausbildet.⁷ GNRA Schleifen sind vor allem für ihre Rolle in der Erkennung und Bindung von Proteinen und RNS bekannt. Durch eine bei 80% aller GNRA Schleifen ähnliche Geometrie, die U-Wende, wird die Watson-Crick-Seite von Base 2-4 für Interaktionen mit Molekülen außerhalb der Schleife bereitgestellt⁸.

1.1.4 Interne Schleifen

Interne Schleifen sind Abschnitte zwischen zwei helicalen Teilen in der RNS Struktur, bei denen keine Watson-Crick-Basenpaare vorliegen. Diese Bereiche liegen somit meist schwach oder komplett ungepaart vor (Abb.1 b). Interne Schleifen können symmetrisch oder unsymmetrisch vorliegen. Bei symmetrischen internen Schleifen sind auf beiden gegenläufigen Abschnitten der RNS die gleiche Anzahl an Basen ungepaart. Symmetrische interne Schleifen mit drei Basen, die A:G und UU Fehlpaarungen bilden können, besitzen dabei eine größere Stabilität als interne Dreierschleifen, die nur A:A, C:C, A:C oder U:C Basenpaare ausgebildet können⁹. Unsymmetrische interne Schleifen besitzen auf einer der beiden RNS Abschnitte kein oder zumindest eine Base weniger als der Gegenstrang. Durch diese ungepaarten Basen können unsymmetrische interne Schleifen als Scharnier fungieren und Richtungsänderungen in ansonsten geraden helicalen Abschnitten erzeugen^{5,10}. Da in internen Schleifen per Definition keine stabile Basenpaarung stattfindet, werden diese Abschnitte vor allem durch Stapelinteraktionen zwischen den Basen und einzelne nicht kanonische Wasserstoffbrücken stabilisiert. Die Basenstapelung ist zwar die stärkste stabilisierende Wechselwirkung in internen Schleifen, doch ist die häufigste dynamische Bewegung der Basen in internen Schleifen das Ausklappen aus der gestapelten Konformation. Mit steigender Mg²⁺ Ionenkonzentration wird die gestapelte Konformation deutlich häufiger populiert. Der Winkel mit dem zwei Helices gegeneinander verkippt sind, hängt dabei im Wesentlichen von der Länge der unsymmetrischen internen Schleifen und der Salzkonzentration ab. In erster Näherung wird der Kippwinkel mit steigender Schleifenlänge und sinkender Mg²⁺ Konzentration größer, was wahrscheinlich durch eine größere konformationelle Flexibilität, durch die steigende Anzahl an ungepaarten Basen und einer besseren Interaktion mit Mg²⁺ Ionen sowie einer Öffnung der Basenstapelung, zu erklären ist^{11,12}. Weitere Faktoren, die die Konformation einer internen Schleife bestimmen, sind die Basenpaarsequenz und die Länge der 5' und 3' angeschlossenen Helices¹³. Die flexible Struktur und die freie Verfügbarkeit von Akzeptor- und Donor-funktionellen-Gruppen in internen Schleifen macht sie auch zu einem Ziel für RNS bindende Liganden und deren Entwicklung^{14,15}.

1.1.5 Einzelsträngige RNS Abschnitte

Einzelsträngige RNS Abschnitte fungieren als wichtige Verbindungselemente in RNS Strukturen und werden als ein sehr flexibler Abschnitt der RNS Struktur betrachtet. Genauere Untersuchungen der Konformation von einzelsträngigen RNS Abschnitten, die auf das 3'-Ende einer Helix folgen, konnten zeigen, dass die ersten zwei Basen stabil an das Ende der Helix gestapelt sind. Durch diese Wechselwirkung wird das Ende der Helix Struktur stabilisiert. Die nachfolgenden Basen des Einzelstranges weisen eine hohe Flexibilität auf, sind aber im Durchschnitt in der Form einer A-Helix angeordnet. Die größte dynamische Bewegung des Einzelstranges besteht aus einem Verlassen der koaxialen Anordnung mit der Helix, wobei allerdings die annähernd helicale Anordnung der Basen beibehalten wird. Am 3'-Ende des Einzelstrangs sind die Basen deutlich mobiler als am 5'-Ende, da hier das RNS Konstrukt endet^{16,17}.

1.1.6 Die Tertiäre Struktur der RNS

Tertiäre Struktur Interaktionen verbinden Sekundärstrukturelemente untereinander und formen so die finale dreidimensionale Struktur der RNS. Diese finalen Interaktionen ermöglichen erst den Aufbau einer funktionalen RNS-Struktur. Dabei werden funktionale Gruppen, die noch nicht über Wechselwirkungen in der Sekundärstruktur abgesättigt wurden, verbaut und so die RNS weiter stabilisiert.

1.1.7 Mehrfachübergänge

Mehrfachübergänge entstehen in Bereichen der RNS in dem mehr als zwei helicale Abschnitte aufeinandertreffen. Diese Helices werden durch einzelsträngige RNS Abschnitte miteinander verbunden, wobei die Verbindung im Minimalfall nur aus dem Phosphatrückgrat zwischen zwei Basen, die in einer jeweils anderen Helix verbaut sind, bestehen kann. Die am häufigsten vorkommenden mehrfachen Übergänge beinhalten 3 oder 4 Helices. Mehrfach Übergänge sind ein wichtiger struktureller Knotenpunkt für die RNS, da hier Sekundärstrukturelemente zwangsweise im Raum angeordnet werden müssen¹⁸. Eine typische Interaktion, die durch Mehrfachübergänge ermöglicht wird, ist das koaxiale Stapeln zweier Helices, wie es z. B. in der Struktur der tRNS beobachtet werden kann^{5,19}. Beim koaxialen Stapeln von zwei Helices formen diese faktisch eine lange Helix, bei der beide Helices über Basenstapelung Ende zu Ende verknüpft sind. Für Mehrfachübergänge aus drei Helices stapeln üblicherweise Helices mit einem Übergang aus 0 Nukleotiden aneinander, wenn die dritte Helix eine längere Verbindung aufweist. Ist die Verbindung zwischen allen drei Helices gleichlang, bestimmt die günstigste Stapelenergie die Interaktion der Helices^{18,20}.

1.1.8 Dreier Basenpaarung und Bindung in die kleine Furche: A-klein Motiv

Zu den häufigsten Tertiärinteraktionen in RNS gehört die A-klein Bindung. Namensgebend für diese Interaktion ist die Ausformung von Kontakten eines Adenins in die kleine Furche einer Helix in einem anderen Abschnitt der RNS. Bei diesen Kontakten können vier verschiedene Geometrien an Tripelbasenpaaren mit den Standard Watson-Crick-Basenpaaren ausgebildet werden, die sich jeweils durch die Orientierung der 2'OH Gruppe am Adenin unterscheiden (Abb.2)^{18,21}.

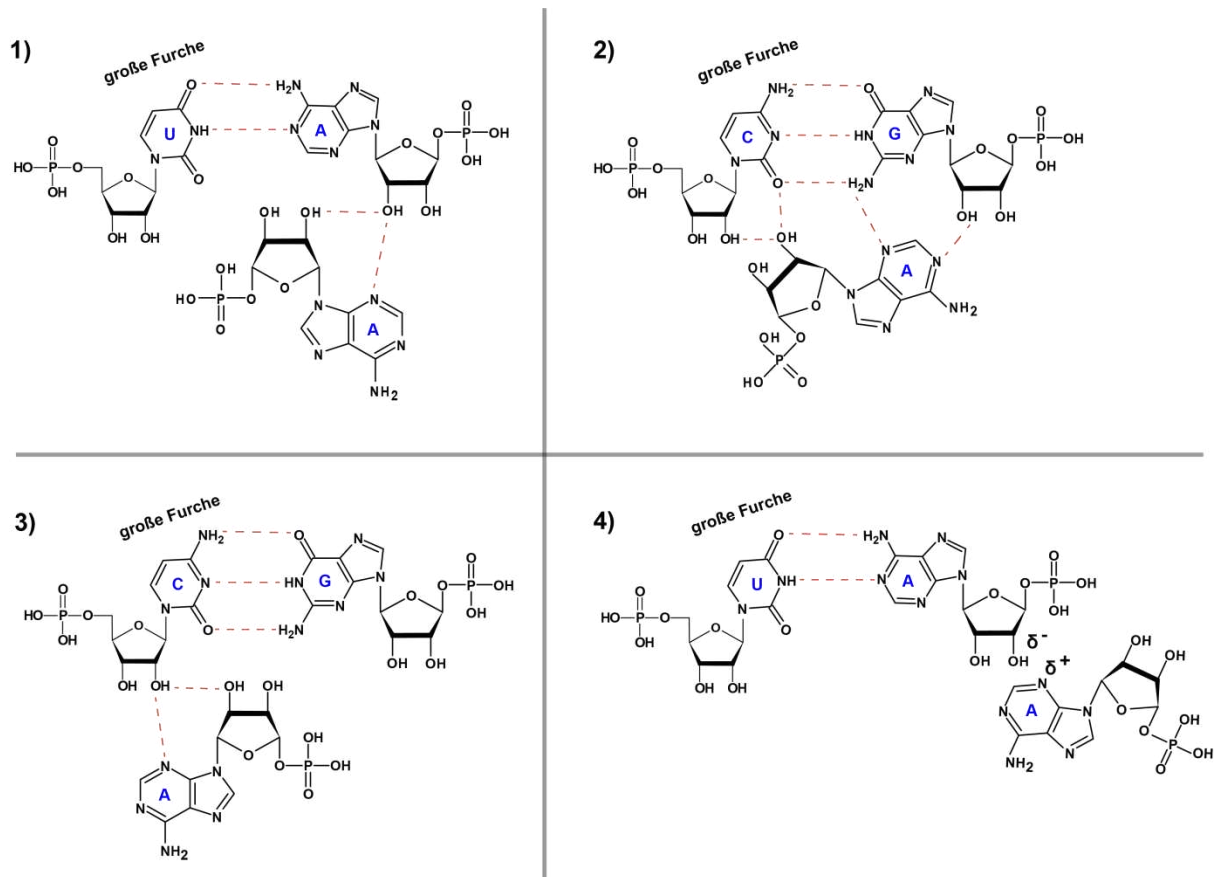


Abbildung 2: Basenpaarungsmuster des A-klein Motives wie sie in *H. marismortui* 50S gefunden wurden¹⁸.

1.1.9 Langreichweiteninteraktionen: Pseudoknoten und verbundene Schleifeninteraktionen

Pseudoknoten bilden sich zwischen den ungepaarten Schleifen Nukleotiden einer Stammschleifenstruktur und einem komplementären RNS Abschnitt über Watson-Crick-Basenpaare. Aus dieser Interaktion entsteht eine neue kurze Helix, die sich koaxial zur Stammschleifenstruktur anordnet¹⁸. Verbundene Schleifeninteraktionen entstehen durch Watson-Crick-Basenpaarung zwischen den ungepaarten Schleifennukleotiden zweier Stammschleifenstrukturen. Für diese Art der Interaktion zwischen zwei verschiedenen Stammschleifenstrukturen reicht schon die Ausformung von zwei Basenpaaren zwischen den Schleifen¹⁸.

1.1.9.1 Tetraschleifenempfängermotive

Tetraschleifenempfängermotive sind eine häufige Wechselwirkung mit der RNS Tertiärstrukturen stabilisiert werden. Dabei binden Nukleotide aus der Schleife einer Haarnadelstruktur an spezifische helicale Bereiche in der RNS. So wird im 11-Nukleotid-Motiv eine spezielle Helixsequenz, die unter anderem zwei 1 Nukleotide Schleifen und ein G:U Basenpaar enthält, für die Erkennung und Bindung von GAAA Schleifen benötigt (Abb.3 a). Beim IC3 Motiv handelt es sich um eine leichte Abwandlung des 11-Nukleotid-Motivs, das so eine Bandbreite von GNRA-Schleifen binden kann (Abb.3 b)²². Durch die spezielle U-Wende Geometrie der GNRA-Tetraschleifen ist es möglich, dass zwei U-Wende Motive miteinander interagieren, indem eine Base einer Schleife an die vierte Position in der anderen GNRA Schleife interkaliert, diese Interaktion ist als T-Schleife bekannt (Abb.3 c)¹⁸.

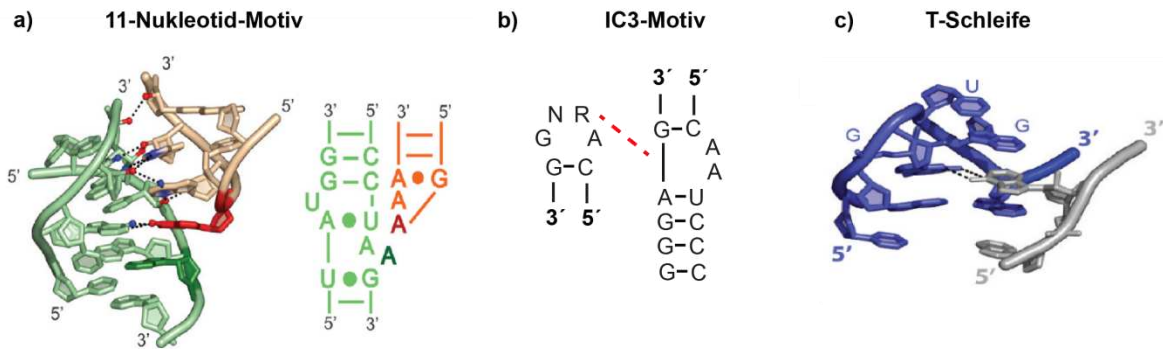


Abbildung 3: Tetraschleifen Empfänger Motive a) 11-Nukleotid-Motiv Abbildung entnommen aus ¹⁸ b) IC3-Motiv aus tRNA^{Leu} von cyanobacterium *Synechococcus* PCC 6301¹⁷² N = A,G,C oder U R = A oder G c) T-Schleifen Motiv aus der RNase P Spezifitätsdomäne, PDB ID 1NBS Abbildung entnommen aus ¹⁸

1.2 Der Sekundär Botenstoff c-di-GMP

Primärbotenstoffe sind Signalmoleküle, die an Rezeptoren von Zellen oder Bakterien von außen andocken. Dabei dringen sie allerdings nicht in den Innenbereich von Zellen oder Bakterien vor. Sekundärbotenstoffe sind die Signalmoleküle im Inneren von Zellen und Bakterien. Diese werden nach dem Andocken der primären Botenstoffe ausgeschüttet um Änderungen im Stoffwechsel auszulösen. In Bakterien sind sekundäre Botenstoffe besonders mit der Anpassung der Lebensweise von Bakterien auf äußere Umstände assoziiert²³. Die von c-di-GMP (Abb. 4) beeinflussten Lebensstiländerungen sind im Bereich der bakteriellen Beweglichkeit zu finden. C-di-GMP ist ein wichtiger Regulator beim Wechseln von einzelnen schwimmenden zu Kolonie oder Sporen bildenden Bakterien²⁴. Um in diesen Lebensstiländerungen regulatorisch aktiv wirken zu können, muss c-di-

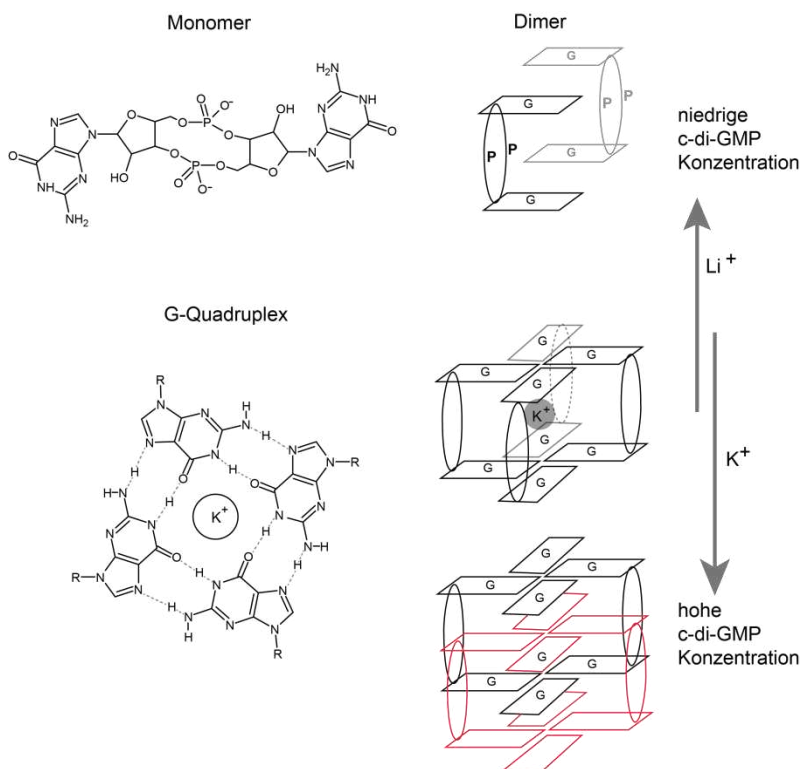


Abbildung 4: C-di-GMP und seine verschiedenen Polymere sind abhängig von Li^+ und K^+ Ionen Konzentration.

GMP von zahlreichen Proteinen und RNS Sequenzen gebunden werden. Protein Domänen die c-di-GMP, vor allem als Teil eines größeren Proteinkomplexes binden, sind PilZ, GGDEF, EAL und HD-GYP. GGDEF dient dabei in Proteinkomplexen als Diguanylatcyclase (DGC) deren Aktivität von anderen Proteinen im Komplex reguliert wird²⁵. Diguanylatcyclase verbinden monomeres GTP zu c-di-GMP. Die EAL-Domäne fungiert als Phosphodiesterase (PDE) und baut somit c-di-GMP ab²⁶. Es finden sich Proteinkomplexe die sowohl GGDEF als auch EAL zugleich beinhalten wie das Beispiel von Sbal_3235 aus *Shewanella baltica* zeigt²⁷. HD-GYP ist eine weitere Proteindomäne die c-di-GMP abbaut. Dabei wird in einem

ersten Schritt c-di-GMP zu pGpG zerlegt und im zweiten pGpG zu zwei GMP Molekülen. Bei Untersuchungen von HD-GYP Proteinen aus *Pseudomonas aeruginosa* wurde festgestellt, dass pGpG als alternatives Substrat zu c-di-GMP verwendet werden kann und sogar eine höhere Affinität aufweist²⁸. Insgesamt sind GGDEF-, EAL- und HD-GYP-Domänen in Bakterien omnipräsent. In der DNS angelegt können, je nach Bakterium, oft dutzende Proteine gefunden werden, die eine oder mehrere unterschiedliche der c-di-GMP verarbeitenden Domänen enthalten. So werden für *Clostridium difficile* 18 unterschiedliche DGC und 19 unterschiedliche PDE Enzyme angenommen²⁹. PilZ wurde als eine der ersten c-di-GMP bindenden Domänen entdeckt und scheint außer c-di-GMP Bindung keine weitere Funktion zu besitzen. PilZ dient somit als neutraler Rezeptor für c-di-GMP ohne direkt in den c-di-GMP Stoffwechsel einzugreifen³⁰. Durch NMR und Kristallographie konnte die Struktur der PilZ-Domäne gelöst werden und so die komplexe Umfaltung entdeckt werden, die bei der Bindung von c-di-GMP an die PilZ-Domäne geschieht^{31,32}. C-di-GMP bindende Proteine dienen in zahlreichen Bakterien als Transkriptionsfaktoren und sind Bestandteil von komplexen Regulationsnetzwerken. Dabei wird die c-di-GMP Bindung oft nicht neu erfunden sondern bedient sich oft bekannter Motive wie PilZ und EAL³³. Neue Bindungsmotive lassen sich aber auch finden wie z.B. VpsT³⁴ zeigt. Die bekannten Transkriptionsfaktoren und ihre Wirkungsweise sind in Tabelle 1 zusammengefasst. C-di-GMP bindende RNS wird in Kapitel 1.5.1 und 1.5.2 beschrieben. Neben den weitreichenden regulatorischen Eigenschaften von c-di-GMP in Bakterien, weist dieses auch einige interessante chemische Eigenschaften auf. Als Dinukleotid kann c-di-GMP über das negativ geladene Phosphatrückgrat mit Metallionen interagieren. Abhängig von vor allem der Kalium-Ionen Konzentration liegt c-di-GMP als Monomer, Dimer oder G-Quadruplex vor³⁵. G-Quadruplexe benötigen K⁺ zum Stabilisieren und können im Falle von c-di-GMP bis 75°C stabil sein³⁶. Bei sehr hohen K⁺ Konzentrationen konnten für c-di-GMP oktamolekulare Komplexe in Form von zwei ineinander geschachtelten G-Quadruplexen nachgewiesen werden³⁷.

Transkriptionsfaktor	Motiv	Organismus	Regulation
Alg44	PilZ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Produktion von Alginat ^{38,39}
PlzA	PilZ	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Beweglichkeit, Infektiosität ^{40,41}
DgrA	PilZ	<i>Caulobacter crescentus</i>	Beweglichkeit ⁴²
BcsA	PilZ	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	Cellulosesynthase ^{43,44}
PlzD	PilZ	<i>Vibrio cholerae</i>	Beweglichkeit, Biofilm Bildung, Virulenz ⁴⁵
MrkH	PilZ	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	mrkA Aktivierung, Biofilm Bildung ⁴⁶
FleQ	FleQ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Biofilm Bildung ⁴⁷
FliA	FleQ	<i>Vibrio cholerae</i>	Flagellum Biosynthese ⁴⁸
Clp	-	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	Wahrscheinlich Virulenz ⁴⁹
XcClp	Interaktion zwischen DNS und c-di-GMP bindender Domäne	<i>Xanthomonas campestris</i>	Virulenz ^{50,51}
Bcaml349	-	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Biofilm Bildung, Virulenz ⁵²
FimX	EAL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Zuckende Beweglichkeit ⁵³⁻⁵⁶

Transkriptionsfaktor	Motiv	Organismus	Regulation
PeID	RxxD	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Exopolysaccharid Produktion ⁵⁷
PopA	RxxD	<i>Caulobacter crescentus</i>	Fortschritt des Zellzykluses ^{58,59}
PNPase	Unknown	<i>Escherichia coli</i>	RNS Prozessierung ⁶⁰
VpsT	Interaktion zwischen VpsT und Dimer B	<i>Vibrio cholerae</i>	Extrazelluläre Matrix Produktion, Mobilität ³⁴
VpsR	unbekannt	<i>Vibrio cholerae</i>	Aktivierung von VpsT und aphA ⁶¹
BrIR	BrIR Dimer	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BrIR DNS bindung, Aktivierung Multi Medikamentenpumpen ⁶²

Tabelle 1: Übersicht c-di-GMP bindender Transkriptionsfaktoren, ihre Bindungsmotive und ihre regulatorischen Auswirkungen. Tabelle erweitert und modifiziert nach C.D. Boyd and G. O'Toole (2012)³³.

1.3 Riboschalter

Riboschalter sind Nukleotidsequenzen in der untranslatierten 5'-mRNA, die sich in unterschiedliche dreidimensionalen Strukturen falten können, um die Expression von auf der DNS sequenziell nachfolgenden Proteinen zu regulieren. Ein Faltungszustand sorgt dabei für die Aktivierung der sequenziell nachfolgenden Genexpression, während ein anderer dieses verhindert. Das besondere an Riboschaltern ist, dass die Entscheidung, welche Faltungszustände eingenommen werden, von der Anwesenheit spezifischer niedermolekularer Moleküle abhängt^{63,64,65}. Diese Liganden werden von Riboschaltern gebunden und sorgen für eine Umfaltung der dreidimensionalen Struktur, wodurch die Regulation erfolgt. Für die Liganderkennung ist nicht die gesamte Riboschalter-Sequenz im gleichen Maß notwendig. Riboschalter können formal in eine Ligand bindende Aptamerdomäne und eine regulierende Expressionplattform eingeteilt werden. Die Bindung des Liganden sorgt für eine Umfaltung der Aptamerdomäne. Diese Umfaltung beeinflusst die Faltung der Expressionplattform, die so eine andere Konformation einnimmt. Wie die Umfaltung der Expressionplattform mit der Ligandbindung zusammenhängt, ist von Riboschalter zu Riboschalter unterschiedlich. Generell lässt sich das Ergebnis der Riboschalter Regulation aber als ein An oder Aus der Proteinexpression beschreiben. Als An-Schalter werden dabei Riboschalter bezeichnet, die bei Ligandbindung zu Genexpression führen. Als Aus-Schalter werden Riboschalter bezeichnet, die bei Ligandbindung die Genexpression verhindern. Eine weitere wichtige Unterscheidung im Regulationsmechanismus von Riboschaltern ist der Zeitpunkt an dem sie in der Genexpression wirksam werden. So werden translationale Riboschalter erst während des Ablesens der mRNA durch das Ribosom wirksam. Bei diesen geschieht die Regulation indem der Zugang zur Shine-Dalgarno-Sequenz blockiert oder geöffnet wird. So wird reguliert, ob das Ribosom überhaupt den Start eines zu translatierenden Gens erkennen kann. Transkriptionale Riboschalter werden dagegen schon während der Transkription von DNS zu RNS aktiv, indem die RNS-Polymerase von der DNS abfällt (Abschnitt 1.3.1).

Riboschalter entfalten ihre regulatorische Wirkung auf der RNS Ebene, was ein energetischer Vorteil sein kann, wenn nicht erst Proteine hergestellt werden müssen, um den Stoffwechsel zu regulieren. Es wird davon ausgegangen, dass die Stoffwechselregulation über Riboschalter sich historisch teilweise weit vor der Proteinregulation entwickelt hat^{66,67}. Daher ist es bemerkenswert, dass sich Riboschalter vor allem in Prokaryoten finden, während dieser Regulationsmechanismus in Eukaryoten fast ausgestorben ist. In Prokaryoten lassen sich die Liganden für Riboschalter in sechs Kategorien unterteilen: Aminosäuren (Glycin, Lysin und Glutamin), Coenzyme (z.B. TPP und SAM),

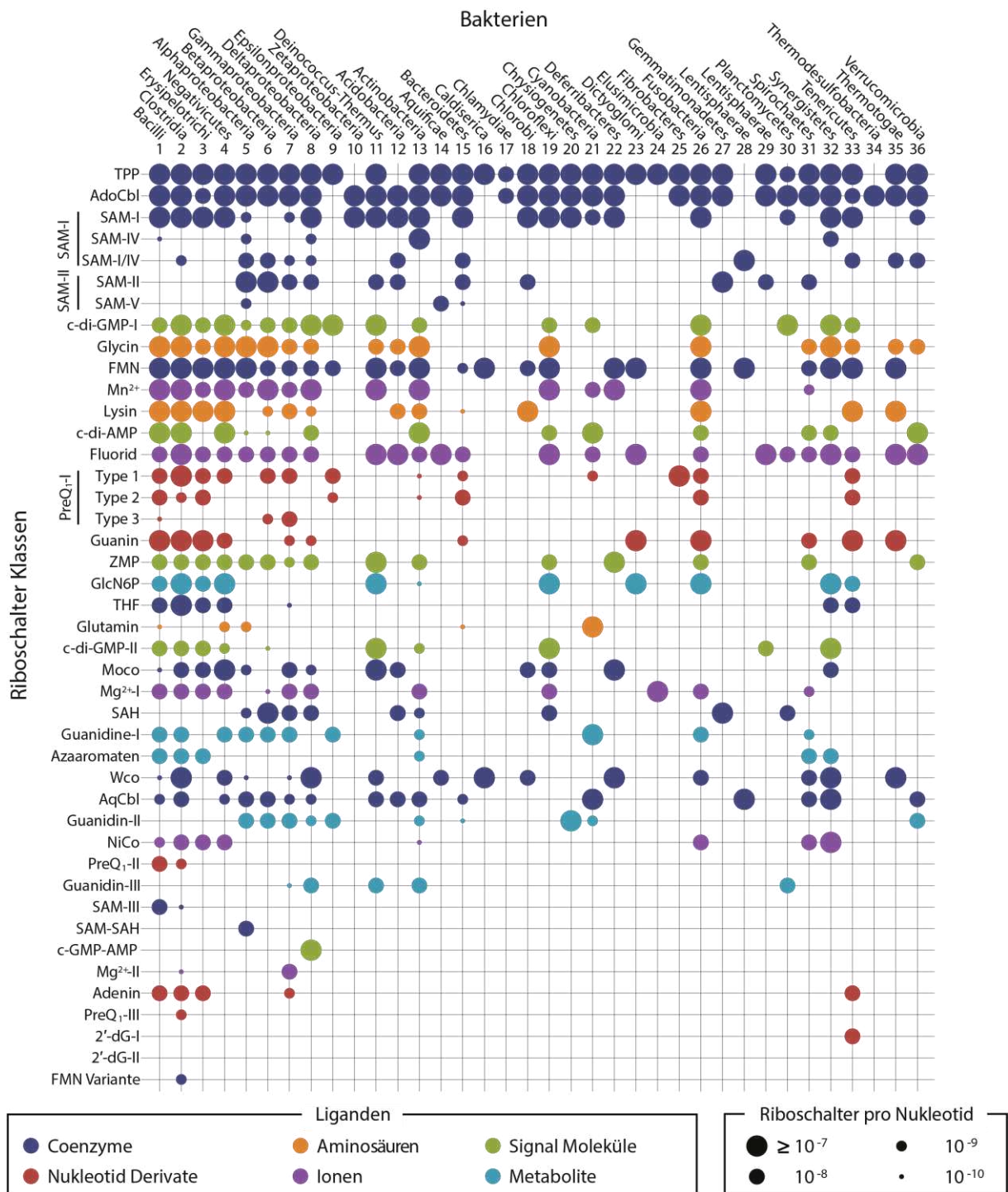


Abbildung 5: Übersicht der Verteilung der einzelnen Riboschalterklassen im Genom von 36 Bakterienfamilien. Abbildung modifiziert aus Mccown et al. 2017⁶⁸.

Signal-moleküle (z. B. ZMP und c-di-GMP), Ionen (F^+ , Mg^{2+} und $Ni^{2+}Co^{2+}$), Nukleotid-derivate (z.B. Adenin und Guanin) und Metabolite (z.B. Guanidin und GlcN6P)⁶⁸ (Abb. 5). Bisher konnte der TPP-Riboschalter als einziges in allen drei Domänen des Lebens gefunden werden^{69,70,71}. Alle anderen Riboschaltersequenzen wurden bisher nur in Bakterien entdeckt. Wie in Abb. 5 zu sehen, sind Riboschalter, die Coenzyme wie TPP, AdoCbl und SAM regulieren, besonders weit verbreitet. AdoCbl (Adenosylcobinamid) Riboschalter sind dabei z.B. in *Desulfitobacterium hafniense* in der Regulation des Corrin-stoffwechsels beteiligt⁷². Der bekannteste Vertreter dieser Stoffklasse ist Vitamin B12. Da Vitamin B12 für viele Organismen eine lebenswichtige Bedeutung hat, ist es nicht verwunderlich, dass weitere Derivate des Corrin-stoffwechsels, nämlich AqCbl (Aquocobalamin) und MeAqCbl (Methylcobalamin), als Ligand für weitere Riboschalter dienen⁷³. FMN (Flavinmononukleotid) Riboschalter sind im Stoffwechsel von mehreren Bakterienklassen für die Kontrolle des Transports von Riboflavin (Vitamin B2) verantwortlich. Nachdem festgestellt wurde, dass das natürlich von

Streptomyces davawensis produzierte RoF (Roseoflavin) antimicrobial wirkt^{74,75}, wurden FMN Riboschalter auch als Ziel für die Antibiotika-Entwicklung erkannt. THF (Tetrahydrofolsäure) ist ein Derivat der als Vitamin B9 bekannten Folsäure. Diese ist in allen Lebewesen essenziell für die Produktion von Methionin, Thymin und Purinen. Daher bieten auch die THF-Riboschalter ein lohnendes Ziel für die Entwicklung von Antibiotika⁷⁶⁻⁷⁸. Bisher sind zwei Klassen von THF Riboschaltern bekannt die entweder in grampositiv oder gramnegativen Bakterien vorkommen⁷⁹. SAM (S-Adenosylmethionin) ist ein enzymatisches Substrat, das fast so häufig wie ATP in zahlreichen Stoffwechselprozessen eingesetzt wird und z.B zum Transfer von Methylgruppen dient⁸⁰. Strukturell sehr ähnlich und ebenfalls am Schwefelstoffwechsel beteiligt ist SAH (S-Adosylhomocystein). Daher müssen die in diesen Stoffwechselwegen eingesetzten Riboschalter beide Substrate gut voneinander unterscheiden können. Unter diesen Bedingungen haben sich alleine sechs unterschiedliche SAM-Riboschalter und interessanterweise nur ein SAH und sogar ein SAM-SAH Riboschalter entwickelt^{68,80}. Weitere Coenzyme, die als Ligand für Riboschalter fungieren, sind MoCo (Molybdän Cofaktor) und WCo (Wolfram Cofaktor). Diese beiden Arten von Riboschaltern sind dabei strukturell eng verwandt, was für eine Evolution des einen Strukturmotivs aus dem anderen spricht. So unterscheidet sich der WCo Riboschalter nur durch das Fehlen der P3 Stamm-Schleife vom MoCo Riboschalter⁸¹.

Riboschalter, die in der Regulation des Purin Metabolismus beteiligt sind, fallen in die Kategorie der Purin Riboschalter. Zu dieser Kategorie gehören Riboschalter, die Guanin, Adenin und 2'-Desoxyguanosin binden. Während Guanin Riboschalter immerhin in einem Drittel aller Bakterienklassen vorkommen, sind Adenin Riboschalter nur noch in fünf Klassen zu finden. Der 2'-Desoxyguanosin Riboschalter ist einer der seltensten Riboschalter überhaupt und wurde bisher nur in *Mesoplasma florum* gefunden^{68,82}. Trotz der teilweise geringen Verbreitung dienen diese Riboschalter als Modellsysteme, um die Umfaltung und die Selektivität der Ligandbindung zu studieren, da alle drei Kategorien an Riboschaltern eng strukturell verwandt sind⁸³⁻⁸⁷. Die PreQ Riboschalter binden einen Vorgänger vom Nucleotid Queuosin. Dieses modifizierte Guanin wird in die t-RNA eingebaut und spielt somit eine essenzielle Rolle im Stoffwechsel so gut wie aller Lebewesen⁸⁸. Das PreQ Aptamer-I ist besonders bemerkenswert, da es sich um eines der kleinsten bekannten Aptamere handelt^{82,89}.

Auch wenn Riboschalter als Vorgänger der Enzymregulation gelten, sind sie doch auch als Regulatoren im Aminosäure Stoffwechsel vertreten. Bisher sind nur drei von 20 Aminosäuren als Ligand für Riboschalter bekannt. Dies hängt wahrscheinlich zu großen Teilen damit zusammen, dass in grampositiven Bakterien, Aminosäuren, die bereits an t-RNS gebunden sind, von RNS-Elementen in der T-box erkannt werden, die spezifische t-RNS erkennen⁹⁰. Glycin Riboschalter besitzen in den meisten Fällen zwei Bindestellen in der Aptamerdomäne. Wurde zunächst ein Kooperations-effekt bei der Bindung nachgewiesen⁹¹, stellt dieser Mechanismus wahrscheinlich ein Artefakt der Verkürzung des Riboschalters dar⁹². Die weit verbreitete Klasse der Lysin Riboschalter wurde zuerst 2003 in *Bacillus subtilis* entdeckt, wo sie für die Reduktion der Lysin Produktion sorgen, wenn genügend Lysin in der Umgebung vorhanden ist^{93,94}. Glutamin Riboschalter sind vor allem in Cyanobakterien weit verbreitet. Dort sind sie ein wichtiger Teil des Regulationssystems der Glutaminsynthetase. Diese ist ein essenzielles Werkzeug dieser Bakterien, um Stickstoff aus der Umgebung aufzunehmen^{95,96}.

Magnesium ist eines der wichtigsten Ionen um RNS und Proteine korrekt zu falten. So kann z.B. die RNS-Polymerase ohne Magnesiumionen nicht funktionieren. Mg²⁺ kann dabei direkt gebunden werden oder bei z. B. RNS über kurzzeitige Bindung an das Phosphatrückgrat die Faltung

beeinflussen. Daher haben alle Lebewesen Mechanismen entwickelt, um die Mg^{2+} Ionenkonzentration in bestimmten Teilen der Zelle oder des Körpers genau zu regulieren. Die meisten Magnesiumriboschalter wurden in Bakterien vor Genen gefunden die für MgtE oder MgtA/B codieren. MgtE ist ein Mg^{2+} Kanal Protein und MgtA/B sind aktive Magnesiumtransporter⁹⁷. Die M-Box RNS, die diese Gene kontrolliert, scheint dabei schon auf sehr geringe Magnesiumkonzentrationen reagieren zu können, indem mehrere Mg^{2+} Ionen kooperativ gebunden werden und so die Präzision erhöht wird⁹⁸.

Dem weitverbreiteten Riboschaltermotiv *yybP-ykoY* konnte lange Zeit kein Ligand zugeordnet werden, obwohl es in 18 von 36 verschiedenen Bakterienklassen vorhanden ist⁶⁸. Erst 2015 konnte diesem Riboschaltermotiv Mn^{2+} als Ligand zugeordnet und die Struktur des Riboschalters über eine Kristallstruktur gelöst werden⁹⁹. Erste Ergebnisse zeigen, dass in *Streptococcus pneumoniae* dieser Riboschalter als Notfallregulator fungiert, der eine Vergiftung des Bakterium mit Mangan verhindern soll¹⁰⁰.

Ein weiteres Ion, das in 24 der bekannten Bakterienklassen und besonders in Archaeen als Ligand für das *crcB* Riboschalter Motiv zu finden ist, ist Fluorid. F^- als Anion an RNS zu binden, birgt eine gewisse Herausforderung. Da RNS über das negativ geladene Phosphatrückgrat eine große Menge an negativen Ladungen besitzt, können Kationen einfach über ionische Wechselwirkungen gebunden werden. Anionen werden aber von den negativen Ladungen des Phosphatrückgrats abgestoßen. Um dieses Hindernis zu umgehen, müssen Fluorid bindende Aptamere mit einer Hülle aus Magnesiumionen arbeiten, die es ermöglichen, F^- zu binden. Aus *Thermotoga petrophila* konnte ein F^- Riboschalter mit gebundenem Fluorid kristallisiert werden. In der Kristallstruktur ist zu erkennen, dass Fluorid von drei Magnesiumionen umgeben ist, die wiederum mit fünf Phosphaten aus dem RNS-Rückgrat aus allen Teilen der Struktur interagiert. Diese komplexe Faltung ermöglicht eine selektive Bindung auch gegenüber anderen Halogenid Ionen¹⁰¹.

Ni^{2+} und Co^{2+} bilden eine gemeinsame Kategorie an Riboschalterliganden, da sie vom selben Aptamer gebunden werden. NiCo Riboschalter binden kooperativ vier Kobalt oder Nickel Ionen und können somit schon auf geringe Konzentrationen dieser auch in geringen Mengen giftigen Ionen reagieren. Insgesamt wurden diese Riboschalter aber bisher nur in 7 von 36 Bakterienfamilien gefunden^{68,102}.

Das sehr weit verbreitete Riboschaltermotiv *ykkC* ist das neueste Riboschaltermotiv, dem ein Ligand zugeordnet werden konnte. 2017 gelang es, die Struktur von drei Untermotiven der *ykkC* Familie mit dem nativen Ligand Guanidin zu kristallisieren¹⁰³⁻¹⁰⁵. 2020 konnte die Existenz einer vierten Variante der Guanidin Riboswitch festgestellt werden¹⁰⁶. Dieses RNS-Element kontrolliert Gene, die für die Produktion der Guanidincarboxylase und von Guanidintransportern zuständig sind. Guanidin ist eine wichtige Komponente im Stoffwechsel, um Produkte wie Guanin und Kreatin herzustellen. Gleichzeitig ist Guanidin eine starke Base und somit in höheren Konzentrationen für Zellen giftig. Daher ist die Regulation der Guanidincarboxylase wichtig, da durch diese der erste Schritt im Abbau von Guanidin erfolgt¹⁰⁷.

Glucosamin-6-phosphat (GlcN6P) ist ein wichtiger Faktor für den Aufbau einer Zellwand in grampositiven Bakterien. GlcN6P wird durch das Enzym Glutamin-Fructose-6-Phosphate-Amidotransferase, aus Fructose-6-Phosphat und Glutamin, hergestellt. Die Kontrolle der Produktion dieses Enzyms geschieht in der 5'-UTR der mRNS des *glmS* Genes durch einen Ribozym-Riboschalter, der GlcN6P bindet¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Durch die Bindung von GlcN6P wird das vorgeformte katalytische Zentrum des Ribozyms aktiviert und die mRNS spaltet sich selber. Dadurch kann die mRNS abgebaut werden,

sodass bei hohen GlcN6P Konzentrationen die Produktion desselben runterreguliert wird. GlcN6P spielt bei der säurekatalysierten Spaltung der mRNS die Rolle des Protonendonors im Zentrum der Katalyse und fungiert somit als Signal- und Koenzym gleichermaßen¹¹¹⁻¹¹³.

Die Riboschalterfamilie, die das Gen *yjdF* kontrolliert, ist ein ungewöhnlicher Fall, da bisher kein einzelner Ligand gefunden wurde, der diese Riboschalter aktiviert sondern nur eine Reihe an strukturell ähnlichen Molekülen, die mehr oder weniger gleich gut für die Aktivierung dieser Riboschalter sorgen. Diese Moleküle besitzen alle ein azoaromatisches Gerüst, was vermuten lässt, dass *yjdF* für die Entsorgung diverser Giftstoffe verantwortlich ist¹¹⁴.

1.3.1 Der transkriptionale Mechanismus

Bei der Rho unabhängigen transkriptionalen Regulation von Riboschaltern wird schon während der Transkription der mRNS darüber entschieden, ob die 5'-untranslatierte Region der DNS komplett transkribiert wird, oder die RNS-Polymerase vorzeitig vom DNS-Strang abfällt. Diese Art der Regulation spart Energie und ist sehr stark zeitabhängig im Gegensatz zum translationalen Mechanismus. Um die Transkription rechtzeitig beenden zu können, muss am Entscheidungspunkt die Dissoziation der RNS Polymerase schneller vonstatten gehen, als die RNS verlängert wird. Daher sind in vielen transkriptionalen Riboschaltern Sequenz Abschnitte (pausing sites) eingebaut, in denen sich die Geschwindigkeit der Transkription drastisch verlangsamt. In diesen oft Uridin reichen Sequenzabschnitten pausiert die RNS-Polymerase für Sekunden bis Minuten und gibt dem Riboschalter so die Zeit sich in eine funktionale Konformation zu falten¹¹⁵⁻¹¹⁷. Um die RNS-Polymerase vorzeitig von der DNS zu lösen, wird, abhängig von einer Liganden Bindung in der Aptamerdomäne, eine Terminator Haarnadelstruktur ausgebildet. Der Terminator besteht meistens aus einem G:C reichen Stamm mit um die 7 oder 8 Basenpaaren. In 3' Richtung wird der Terminator abgeschlossen von einem nicht basengepaartem Einzelstrang aus 7 oder 8 Nukleotiden, die vor allem Uridine sind¹¹⁸. Die U reiche Sequenz sorgt dabei für ein Pausieren der RNS-Polymerase, was der RNS genug Zeit gibt den Terminator zu falten. Um die Transkription zu stoppen, muss der Terminator ein unumkehrbares Hindernis für die RNS-Polymerase darstellen^{115,119-121}. Wie genau dies geschieht, ist noch nicht endgültig geklärt. Die beiden wahrscheinlichsten Modelle sind das Eindringen der Terminator Haarnadelstruktur in das aktive Zentrum oder dass der Terminator dafür sorgt, dass die 3' Nukleotide das aktive Zentrum verlassen und so keine Verlängerung stattfinden kann¹²²⁻¹²⁴.

Bei der Rho abhängigen Transkriptionsregulation wird Rho, das als Translocase und Helicase fungiert, von Erkennungssequenzen (*rut*-Sequenz) auf der RNS gebunden. Diese Erkennungssequenzen bestehen aus C reichen und G armen Abschnitten auf der RNS, die wenig Sekundärstruktur aufweisen und ca. 80-90 Nukleotide lang ist^{125,126}. Diese Länge ermöglicht es der RNS an alle sechs Untereinheiten von Rho zu binden, was erst die nachfolgende Verlegung der RNS ermöglicht. Nachdem Rho an die RNS gebunden hat, faltet sich Rho zu einem Ring und beginnt die RNS aus dem aktiven Zentrum der Polymerase zu ziehen und durch die zentrale Pore von Rho zu verlegen. Dieser Prozess erfordert Energie, die durch die Umwandlung von ATP in ADP gewonnen wird. Ist die gesamte RNS vor der Polymerase verlegt worden, dissoziiert die RNS-Polymerase von der DNS¹¹⁸. Der Punkt auf der RNS, bei dem Rho die Transkription beendet, liegt ungefähr bei 10-20 Nukleotide nach der *rut*-Sequenz¹²⁷. Insgesamt muss Rho somit mit ca. 90-110 Nukleotiden interagieren, um die Transkription zu beenden. Dieser Prozess erfordert Zeit, was dazu führt, dass Elongation und Termination im Falle von Rho kinetisch gekoppelt sind. Ist die Elongation schneller als die Termination durch Rho ist Rho wirkungslos. Daher ist die Transkription von RNS-Sequenzen, die zu Pausen in der Transkription neigen, gut durch Rho zu beenden, da dies Rho Zeit zum Aufholen gibt¹²⁸.

1.4 Co-Transkriptionale Faltung

RNS-Faltung muss in einem bestimmten Zeitraum abgeschlossen sein, damit Riboschalter ihre Wirkung entfalten können. Für translationale Riboschalter muss die Faltung abgeschlossen sein bis das Ribosom an der Startsequenz nach dem Riboschalter ankommt. Diese Zeit kann von Organismus zu Organismus stark variieren. So ist für *E.Coli* bekannt, dass das Ribosom der RNS-Polymerase in einem kurzen Abstand folgt und Translation und Transkription regulatorisch eng gekoppelt sind. Für *B.subtilis* hingegen wurde keine regulatorische Kopplung von Ribosom und RNS-Polymerase gefunden. In *B. subtilis* entfernt sich die RNS-Polymerase sehr weit vom Ribosom und läuft diesem faktisch davon¹²⁹, was wiederum der mRNA mehr Zeit geben würde sich zu falten. Da allerdings davon auszugehen ist, dass sich RNS Faltung in erster Näherung unabhängig vom Organismus auf gleichen Zeitskalen abspielt, muss die RNS Faltung eigentlich schneller sein als die Schreibrate der RNS-Polymerase, wenn transkriptionale Riboschalter funktionieren sollen¹³⁰. Für den Fall der translationalen Riboschalter bedeutet dies, dass auch mit einem geringen Abstand zum Ribosom auf jeden Fall genug Zeit für die Faltung vorhanden ist. Typische Transkriptionsraten liegen hierbei zwischen 2-30 Nukleotiden/s^{131,132}, was bei einem Riboschalter von 160 Nukleotiden Länge in eine Zeit zum Falten von 80 – 6 s resultiert. Diese Zeit kann bei vielen Riboschaltern noch verlängert werden indem die Transkription pausiert. Hierbei gibt es zwei verschiedene Mechanismen, wie es zum Pausieren der Transkription kommen kann. Zum ersten ist die Transkriptionsrate der Polymerase nicht gleichmäßig, so kommt es zur Verlangsamung bei lokalem Nukleotid Mangel wenn z.B. sehr viele gleiche Nukleotide aufeinander folgen^{133,134}. Zum zweiten gibt es dedizierte Pausierstellen, die oft aus Uridin reichen Sequenzen bestehen, an denen die Polymerase für mehrere Sekunden verweilt^{116,117}. Besonders diese definierten Pausen können für transkriptionale Riboschalter von essenzieller Bedeutung sein, da so Strukturelemente, die für die Regulation wichtig sind, rechtzeitig gefaltet werden können^{116,133,135}. Die Faltung der RNS beginnt sobald genug Nukleotide die Polymerase verlassen haben. Dabei wird die RNS nicht zufällig in tausende unterschiedliche Strukturen gefaltet bis eine funktionierende Struktur entsteht. Es existieren definierte Faltungswege in denen Sekundärstrukturelemente auf- und abgebaut werden^{133,136}. Ein Faktor, der die RNS auf bestimmte Faltungswege lenken kann, sind Mg^{2+} Ionen, die durch ihre Bindung an RNS Strukturelemente stabilisieren und so bestimmte Faltungswege begünstigen¹³⁷. Auf eine ähnliche Weise können auch Liganden in die Faltung von RNS eingreifen¹³⁴. Eine weitere Triebkraft der RNS Faltung ist die blitzartige Ausformung von Helices. Helices von 5-8 Basenpaaren können innerhalb von 10-100 μ s Struktur annehmen, während Umfaltungen im Sekundenmaßstab ablaufen¹³⁸. Diese schnelle Faltung wird mit einem Reißverschlussmodell beschrieben, bei dem die Ausformung eines Basenpaares die Bildung weiterer Basenpaare in die Helix erleichtert¹³⁹. Weitere Faktoren der RNS Faltung sind Temperatur, pH-Wert, Chaperone und Helikasen oder andere RNS. Der größte zeitliche Faktor in der Geschwindigkeit der RNS-Umfaltung ist das Aufbrechen bereits ausgebildeter Basenpaare. Dieser Umstand wird deutlich dadurch, dass schon das Umfalten einer 5 Basenpaar großen Helix Sekunden dauert. Um also eine schnelle Faltung oder strukturelle Übergänge zu gewährleisten, werden auf den einzelnen Faltungswegen metastabile Strukturen durch Faltungsfaktoren stabilisiert. Diese stabilisierten metastabilen Strukturen können dann schnell und gezielt weiter falten und werden durch die Faltungsfaktoren gleichzeitig daran gehindert Fehlpaarungen einzugehen. Insgesamt entsteht so ein System, dessen Energieniveaus durch die Stabilität der RNS-Konstrukte definiert wird, kombiniert damit, dass die energetische Hürde zwischen diesen Konstrukten durch äußere Faktoren reguliert werden kann¹³⁸.

1.5 Riboschalter der sekundären Botenstoffe

Der Begriff GEMM (Genes for the Environment, Membranes and Motility) - Gene für Umwelt, Membran und Beweglichkeit - beschreibt für viele Riboschalter der sekundären Botenstoffe die

Funktion der Gene, die diese regulieren. Daher können die assoziierten Riboschalter in der Literatur oft unter dem Begriff GEMM-Motiv gefunden werden²³.

Das RNS-Motiv *ydaO* war lange eines der bekannten verwaisten Riboschaltermotive, dem kein Ligand zugeordnet werden konnte. Es konnte schon vor der Entdeckung des nativen Liganden für das *ydaO*-Motiv festgestellt werden, dass die Gene, die dieser Riboschalter kontrolliert, für Zellwandbildung, osmotischem Stress und Sporenbildung verantwortlich sind^{140,141}. Der native Ligand für den *ydaO*-Riboschalter konnte schließlich an einem mRNS Modell Essay für *Bacillus subtilis*, als c-di-AMP identifiziert werden. In *B. subtilis* scheint der Riboschalter als transkriptionaler Aus-Schalter zu fungieren¹⁴². C-di-AMP Riboschalter konnten mittlerweile auch vor anderen Genabschnitten gefunden werden, wie z. B der 2019 gefundene c-di-AMP Riboschalter, der den Kalium Transporter kdpFABC in *Bacillus thuringiensis* reguliert¹⁴³. Durch die Kristallstruktur des c-di-AMP Riboschalters aus *B. subtilis* ist zu erkennen, dass dieser aus sechs Helices besteht die sich pseudosymmetrisch in Kreisform anordnen. Es wird jeweils ein Moleküle c-di-AMP zwischen Helix P1 und P6 sowie P3 und P4 gebunden¹⁴⁴. C-di-AMP Riboschalter aus *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* und *Thermovirga lienii* zeigen eine ähnlich verzweigte Struktur mit zwei gebundenen Molekülen c-di-AMP¹⁴⁵.

ZTP (5- amino-4-imidazol carboxamid ribose-5'-triphosphate) und sein Vorgänger ZMP (5- amino-4-imidazol carboxamid ribose-5'-monophosphat) sind Signalmoleküle für den Mangel an 10f-THF (10-formyl-tetrahydrofolat), ein Derivat der Folsäure, in Bakterien. Das bekannte *pfl*-Motiv konnte 2015 als Riboschalter, der ZTP und ZMP nanomolar bindet, identifiziert werden¹⁴⁶. Das Gen, das der ZMP/ZTP-Riboschalter reguliert, so wie das *pfl*-Motiv sind nach der Pyruvat Format Lyase benannt, die in der Purin Biosynthese und dem Folsäure Stoffwechsel eine wichtige Rolle spielt¹⁴⁷. Der ZMP/ZTP Riboschalter besteht aus drei Helices von denen P1 und P2 über einen großen nicht Basen gepaarten ausgebuchteten Bereich verbunden sind. Die P3 Haarnadelstruktur ist über einen ungepaarten Strang mit P2 verbunden. Um ZTP und ZMP zu binden, bildet sich zwischen dem C reichen Bogen von P3 und dem G reichen ausgebuchteten Bereich ein Pseudoknoten, in den ZTP/ZMP bindet und den Pseudoknoten so stabilisiert¹⁴⁸. Wird die m-RNS von der RNS-Polymerase über P3 hinaus verlängert, kommt es zu einer Umfaltung von P3 in eine Terminatorstruktur. Interessanterweise ist die ungepaarte Verbindung von P2 und P3 weder in Länge noch in Sequenz konserviert. Die Verbindung kann sogar ganz entfernt werden, sodass P3 separat in Lösung vorhanden ist, ohne dass der Riboschalter die Bindungskompetenz für ZTP/ZMP in Gänze verliert¹⁴⁷. Mittels NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass der Pseudoknoten auch ohne ZTP/ZMP vorgeformt ist und schon Ansätze einer gefalteten Terminator Ligandbindung verhindern¹⁴⁹.

C-GAMP ist ein anderes Beispiel für einen sekundären Botenstoff, der mit GEMM-Motiv Riboschaltern verbunden ist. C-GAMP wurde über seine Synthase (DncV) bekannt, die in *Vibrio cholerae* mit stark erhöhter Infektiosität assoziiert wird. Diese Assoziation konnte von Severin et al. weiter aufgeklärt werden. Es wurde gezeigt das die Bindung von c-GAMP, im pathogenen El Tor Stamm von *Vibrio cholerae*, die CapV Phospholipase aktiviert, die zum Angriff auf Zellwände genutzt wird^{150,151}. Für das Feld der Riboschalter wurde c-GAMP interessant, als entdeckt wurde, dass der Sekundärbotenstoff mit GEEM Riboschaltern in verschiedenen *Geobacter* Familien wie *sulfurreducens* und *metallireducens* interagiert¹⁵². Der *Geobacter sulfurreducens* Riboswitch für 3',3'-cGAMP besteht aus 3 Helices, die in eine Stimmgabel ähnliche Struktur falten. Die Struktur wird durch eine Bogen-Bogen Interaktion der Helices P2 und P3 stabilisiert. Helix P1 führt die RNS am 5' und 3' Ende zusammen. Die Bindetasche für 3',3'-cGAMP liegt im Übergang zwischen den Helices. Der Ligand wird vor allem über Wasserstoffbrückenbindungen erkannt. G_β des Liganden bildet ein G:C Basenpaar mit C75 der RNS

und wird zusätzlich durch Wasserstoffbrücken mit A12 und A41 im Komplex stabilisiert. A_α wird über ein Hoogsteen Basenpaar zu A14 und durch eine weitere Wasserstoffbrücke zu A42 gebunden. Bemerkenswerterweise kann dieser Riboschalter ebenfalls c-di-GMP mit hoher Affinität binden. Dies ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf Stapel Interaktionen mit P2 zurückzuführen, die die eine fehlende Wasserstoffbrücke zu A14 ausgleichen¹⁵³. Die wichtige Rolle von P2 in der Erkennung und Stabilisierung der Bindung des Liganden konnte mittels MD Simulationen bekräftigt werden¹⁵⁴. Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen c-GAMP und c-di-GMP Riboschaltern, die sich durch wenige Mutationen ineinander umwandeln lassen, ist bei weitem nicht nur auf *Geobacter* beschränkt, sondern kann auch in anderen Bakterien Familien beobachtet werden¹⁵⁵.

1.5.1 c-di-GMP Riboschalter

C-di-GMP Riboschalter kommen in zwei Hauptarchitekturen vor: Typ I und Typ II.

Typ I weist starke strukturelle Ähnlichkeiten mit den bekannten c-GAMP Riboschaltern auf. Die c-di-GMP Typ I Riboschalter bestehen aus 3 Helices, die in eine Stimmgabel ähnliche Struktur falten. Die Struktur wird ebenfalls durch eine Bogen-Bogen Interaktion der Helices P2 und P3 stabilisiert. Helix P1 führt die RNS am 5' und 3' Ende zusammen und bildet so den "Griff" der Stimmgabel. Die Bindetasche für c-di-GMP liegt in der Verbindung zwischen den Helices¹⁵⁶ (Abb. 6).

Typ II c-di-GMP Riboschalter bestehen aus drei Helices die nacheinander durch eine 14 Nukleotide große Ausbuchtung J2-1 und einen scharfen Knick verbunden sind. Helix P3 wird durch einen großen Bogen abgeschlossen, dessen konservierter Bereich mit J2-1 einen Pseudoknoten formt¹⁵⁷ (Abb. 6).

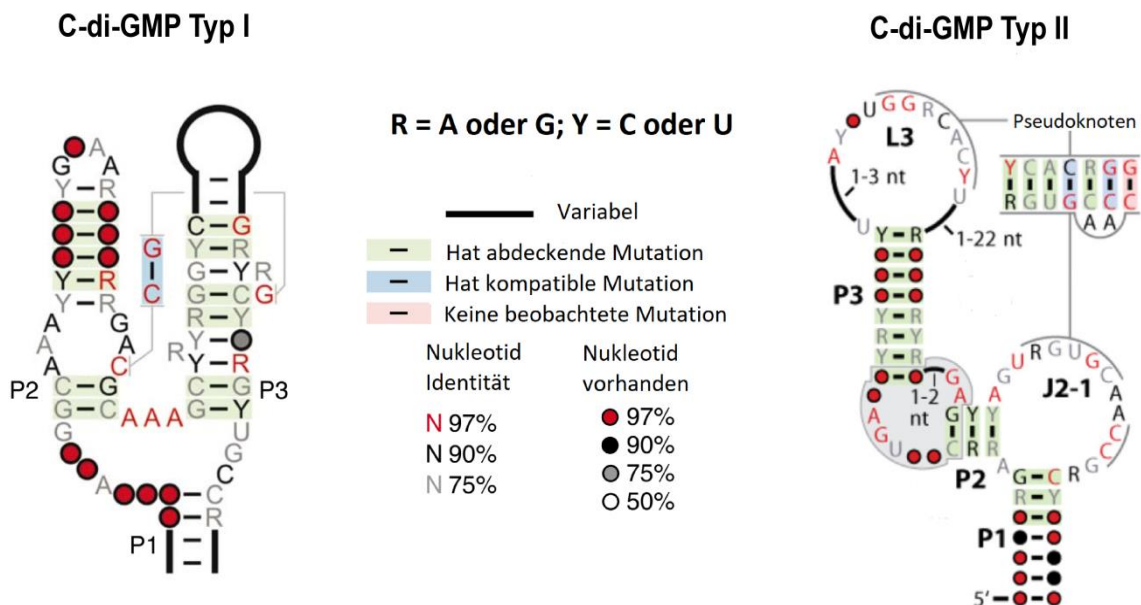


Abbildung 6: Konservierte Struktur motive der c-di-GMP Riboschalter vom Typ I A) und Typ II B). Abbildung modifiziert aus Smith et al. 2009¹⁵⁶ und Lee et al. 2010¹⁵⁷.

C-di-GMP bindende Riboschalter des Typ I sind in allen Bakterienstämmen weit verbreitet. Durch computergestützte Sequenzanalyse der bekannten Bakteriengenome konnten 322 unterschiedliche Sequenzen für Typ I Riboschalter identifiziert werden. In *Geobacter uraniireducens* Rf4 allein konnten 30 dieser Sequenzen identifiziert werden²⁴. Die Charakterisierung dieser zahlreichen Riboschalter stellt allerdings noch ein weiteres weitestgehend unerforschtes Forschungsfeld dar. Insgesamt wurden bisher nur 9 der Typ I Riboschalter genauer untersucht. Mittels Gleichgewichtsmicrodialyse und Electrophoretic Mobility Shift Assay wurden Riboschalter aus den Bakterien *Clostridium Tetani* (Ct-E88), *Clostridium Botulinum* (Cb-17B, Cb-E43) und *Clostridium difficile* (Cd-630) auf ihre

Bindungsaffinität zu 2'F und unmodifiziertem c-di-GMP getestet. Unter den Testbedingungen banden Ct-E88 und Cb-43 c-di-GMP mit einem K_d im nM Bereich. Für Cd-630 und Cb-18B wurde hingegen nur ein K_d im μ M Bereich gemessen. Das unterschiedliche Bindungsverhalten von Cb-E43 und Ct-E88 zu 2'-F-c-di-GMP lässt vermuten, dass die Bindungstaschen nicht in allen Typ I Aptameren gleich aufgebaut sind¹⁵⁸. In der initialen Publikation von Sudarsan et al. 2008 wurden auch zwei Riboschalter aus *Bacillus cereus* Bc1 und Bc2 untersucht. Bc1 wurde als Anschalter und Bc2 als Ausschalter bei höheren c-di-GMP Konzentrationen charakterisiert¹⁵⁹. Die beiden literaturbekannten Riboschalter aus *Clostridium difficile* Cd1 und Cdi2 werden im Abschnitt 1.5.2 beschrieben. Die beiden letzten der neun untersuchten Riboschalter stammen aus dem Bakterium *Vibrio cholerae*, das nach der Choleraerkrankung benannt wurde, die es auslöst. Beide Riboschalter beinhalten das Vc2 Aptamer. Dessen bekannte Kristallstruktur macht es zu einem beliebten Modellsystem für c-di-GMP bindende Riboschalter^{156,160} (Abb. 7). Der erste Riboschalter befindet sich oberhalb des Gens für den Transkriptionsfaktor *TfoY*. Der Vc2 Riboschalter agiert hier als ein Ausschalter bei mittleren bis hohen c-di-GMP Konzentrationen. In *Vibrio Cholerae* scheint dieser Riboschalter zusammen mit weiteren Faktoren eine Rolle in der Regulation der Mobilität zu spielen. Abhängig von den c-di-GMP Konzentrationen lassen sich für *Vibrio Cholerae* drei Lebensweisen finden. Bei niedrigem c-di-GMP Level bewegen sich die Bakterien mit großem Abstand zueinander, bei mittlerem c-di-GMP Level verringert sich dieser Abstand untereinander und bei hohem Level bilden sich Biofilme¹⁶¹.

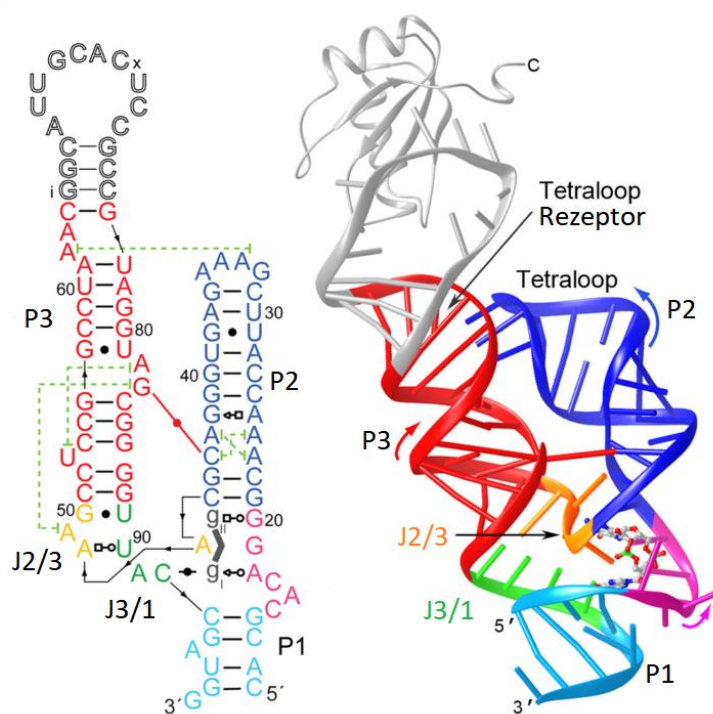


Abbildung 7: Sekundärstruktur und Kristallstruktur des c-di-GMP Vc2 Riboschalters modifiziert aus Kulshina et al. 2009¹⁶⁰.

Die konservierten Strukturmotiven der Typ I c-di-GMP Riboschalter zu erwarten waren (Abb.6). So existieren Helix P1-P3, und c-di-GMP wird in der Kreuzung der drei Helices gebunden. Durch die Kristallstruktur wird allerdings gezeigt, dass das Vc2 Aptamer durch zahlreiche tertiäre Strukturelemente zusammengehalten wird. So wird die gesamte Struktur durch eine Tetraloop Interaktion zwischen P2 und P3 sowie zwei zwischen Helixbasenpaaren zusammengehalten. C-di-GMP wird primär durch ein kanonisches G:C und ein nicht kanonisches G:G Basenpaar gebunden. Stabilisiert wird die Bindung durch eine Stapel-Wechselwirkung von G19 mit G11 des Liganden und der Interaktion von A33 mit dem Phosphatgerüst von c-di-GMP. In den initialen in vivo Studien des Vc2

Die RNS Sequenzen, die für die Kristallstrukturen des Vc2 Aptamers verwendet wurden, stammen aus einem Riboschalter, der die Produktion des Proteins *TfoX* in *Vibrio cholerae* kontrolliert. *TfoX* so wie das homologe *TfoY* dient in fast allen *Vibrio* Bakterien als Regulationsfaktor für die Produktion des Typ VI Segregationssystems (T6SS). T6SS wird in *Vibrio cholerae* mit Virulenz in Verbindung gebracht und ist Teil des Abwehrsystems von fremden Bakterien¹⁶². Die Kristallstruktur von Vc2 (Abb.7) zeigt Strukturen, wie sie aus den

Riboschalters ist dieser als ein transkriptionaler Anschalter beschrieben¹⁵⁹, doch neuere Studien scheinen diese Ergebnisse zu widerlegen. So wurde gezeigt, dass über die c-di-GMP abhängige Stabilität der P1 Helix, die nächstgelegene Ribosom Bindestelle (RBS) maskiert oder geöffnet werden kann. Ist c-di-GMP gebunden, ist P1 vorhanden und die RBS ist maskiert. Ist hingegen P1 nicht vorhanden, formen die P1 Basen zwei andere Helices in der Expressionsplattform und die RBS ist zugänglich^{163,164}.

Typ II c-di-GMP Riboschalter sind weniger weit verbreitet als die Typ I Riboschalter. So konnten bisher nur Sequenzen für Typ II Riboschalter in 9 von 36 Bakterienklassen gefunden werden. Diese Sequenzen wurden unter der Annahme vorhergesagt, dass sie in eine Struktur falten, die identisch zum Einheitsmodell (Abb. 6) ist oder mindestens eine 50% Sequenz Identität mit dem Einheitsmodell besitzen^{24,68}. Das einzige Literatur bekannte Beispiel für einen explizit untersuchten Typ II c-di-GMP Riboschalter stammt aus *C.Difficile*, wo dieser für die Regulation unterschiedlicher Spleißmuster verantwortlich ist^{157,165,166}.

1.5.2 Clostridium Difficile und seine c-di-GMP Riboschalter

C.Difficile ist ein weit verbreitetes anaerob wachsendes, grampositives Stäbchenbakterium, das im Darm von Menschen und Tieren verbreitet ist. Normalerweise wird *C.Difficile* von weiteren, im Darm lebenden Bakterien an einem übermäßigem Wachstum gehindert. Bei einer lang andauernden Behandlung mit Antibiotika, wie sie z.B. nach einer Chemotherapie notwendig ist, gewinnt *C.Difficile* aber durch seine Resistenz gegen viele Breitbandantibiotika einen Vorteil und kann sich langfristig als eine der wenigen noch im Darm lebenden Bakterienarten durchsetzen. Dies führt zu einer großflächigen Kolonialisierung des Darms mit *C.Difficile* Bakterien, was zu Darmentzündungen bis zu blutigem Durchfall führt¹⁶⁷. Insgesamt werden 15-20% aller Antibiotika assoziierten Durchfallerkrankungen mit einer Überkolonialisierung des Darms mit *C.Difficile* Bakterien zurückgeführt¹⁶⁸.

Eng mit der Antibiotikaresistenz und der Virulenz von *C.Difficile* ist die Fähigkeit von *C.Difficile* assoziiert, Biofilme zu bilden. In diesen leben die Bakterien in vernetzten Kolonien, die fest an der besiedelten Oberfläche anhaften. Die physische Stabilität solcher Biofilme sorgt allein schon für Probleme bei der Dekontaminierung von besiedelten Oberflächen mit den üblichen alkoholischen Desinfektionsmitteln¹⁶⁷. Des Weiteren ist in *C.Difficile* aber auch noch die Produktion der Pili-Proteine, die für die Vernetzung und Oberflächenhaftung in Biofilmen notwendig ist, mit der Ausschüttung von TcdA und TcdB verbunden, welche die entzündungsauslösenden Toxine aus *C.Difficile* sind^{169,170}.

Mit dem Wechsel der Lebensweise von einzelnen frei schwimmenden Bakterien, zu vernetzten Biofilmen, ist in Bakterien ein Anstieg des c-di-GMP Spiegels verbunden^{24,171}. Es stellt sich nun die Frage, wie c-di-GMP in *C.Difficile* für diesen Wechsel in der Lebensweise sorgt. Bei der Untersuchung des Genoms von *C.Difficile* wurden zwei c-di-GMP bindende Riboschalter vor Operonen entdeckt, die für die Expression von Flagellen im Fall von flgB und Pili im Fall von pilA1 notwendig sind. Vor dem flgB Operon befindet sich der Cd1¹⁵⁹ Typ 1 Riboschalter und vor pilA1 der Typ 2 Riboschalter Cdi-2_4^{172,173}. Der Cd1 Riboschalter konnte durch in vitro Versuche als transkriptionaler Ausschalter charakterisiert werden. Das bedeutet, dass sich c-di-GMP induziert, eine Terminator Haarnadelstruktur ausbildet, die dafür sorgt, dass die RNS-Polymerase das Transkript vorzeitig verlässt¹⁵⁹. Cd1 spielt in der Flagellenexpression die Rolle eines Auswahl Schalters. Nach dem Riboschalter folgt eine Sequenz auf der DNS die erneut entscheidet, ob die Flagellenproteine exprimiert werden. Cd1 verhindert bei einem hohen c-di-GMP Niveau die Expression der Flagellen unabhängig von der nachfolgenden Sequenz, da die Transkription abgebrochen wird. Erfolgt dieser Abbruch aufgrund eines Fehlers nicht, kann, wenn auf Aus geschaltet ist, die DNS Sequenz noch

einmal für einen Abbruch sorgen. Im Fall einer niedrigen c-di.GMP Konzentration wird über die DNS Sequenz erneut über die Flagellen Expression entschieden¹⁷⁴.

Ausgehend von der RNS Sequenz gehört der Cd1 Riboschalter zu den GEMM-1 Motiven und sollte somit eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit dem Vc2 (Abb.7) Riboschalter aufweisen. In der Tat finden sich auch im Cd1 Riboschalter strukturell ähnlich aufgebaute P2 und P3 Helices. Allerdings wird in der Literatur bisher davon ausgegangen, dass keine P1 Helix existiert¹⁷¹ (Abb.8). Es wurde bereits die Interaktion von Helix P2 und P3 über ein GC Basenpaar durch G79 und C35 nachgewiesen¹⁵⁹. Die bisherigen Sekundärstrukturmodelle des Cd1 Riboschalters basieren auf der Analogie zum Vc2 Riboschalter, daher wird ein ähnlicher Bindungsmodus für den Liganden angenommen. C-di-GMP soll durch ein GC Basenpaar aus C87 zu einem G des Liganden, der Interaktion von A38 mit dem Phosphatrückgrat und eines Hoogsteen-Basenpaares aus G11 und dem zweiten Liganden G, stabilisiert durch eine Stapelinteraktion mit G12, gebunden werden (Abb. 8).

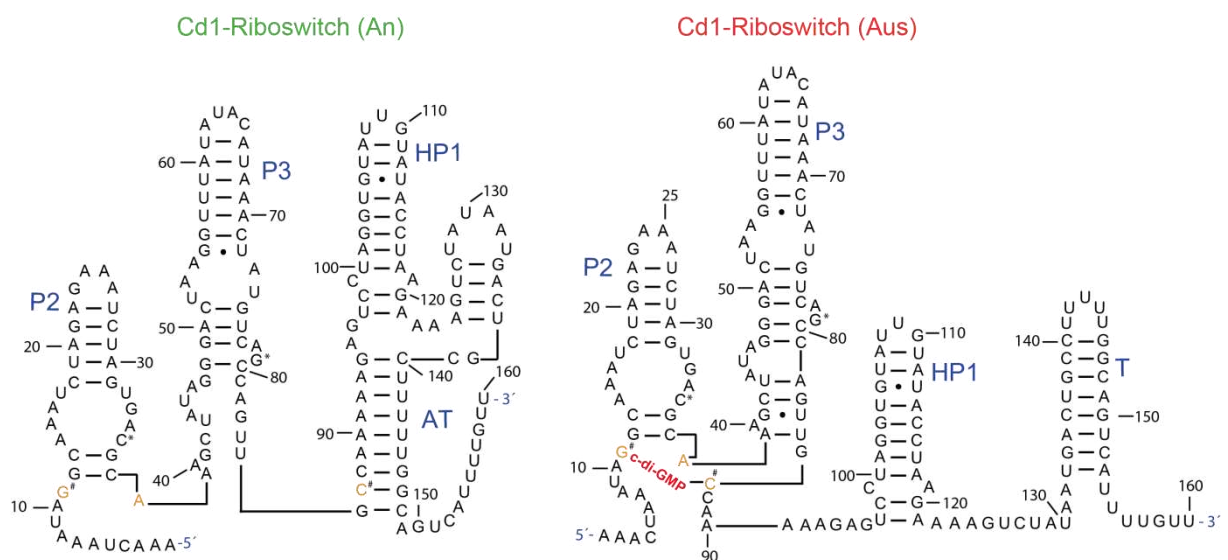


Abbildung 8: Sekundärstrukturmodell des Cd1 Riboschalters in voller Länge nach Literatur.

Das von Lee et al. entdeckte c-di-GMP II Aptamer¹⁵⁷ (Abb. 9 a) im CD3246 Transkript aus *C.Difficile* liegt über 600 Nukleotide von der nächsten ORF entfernt. Das wirft die Frage auf, wie dieses Aptamer regulatorisch aktiv werden kann. Es wurde entdeckt, dass dieses c-di-GMP bindende Aptamer mit einem selbstschneidenden Rybozym in einer Tandemkonstruktion verbunden ist. Diese Konstruktion ermöglicht es *C.Difficile* bei der Anwesenheit von c-di-GMP ein anderes Transkript zu generieren als in Abwesenheit von c-di-GMP (Abb.9 b). Bei der Anwesenheit von c-di-GMP bleiben das Aptamer und die RBS im Transkript erhalten, was es ermöglicht, dass c-di-GMP II Aptamer hier als translationaler Riboschalter agieren kann. Bei Abwesenheit von c-di-GMP erfolgt eine GTP induzierte Spaltung des Transkripts, die eine weitere Translation verhindert, da die RBS aus dem Transkript entfernt wird¹⁶⁵.

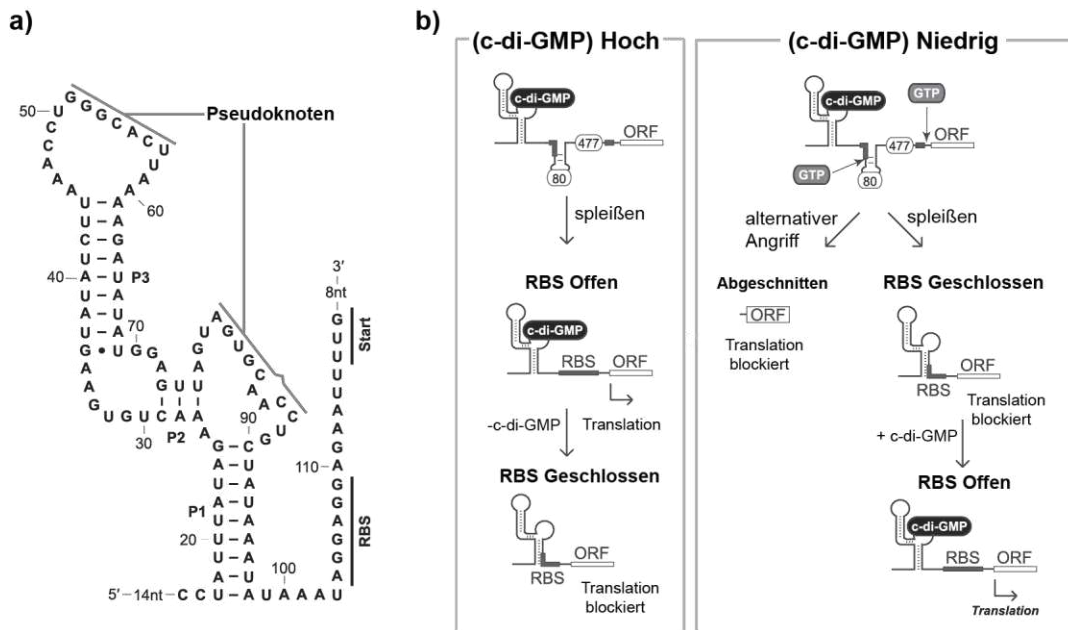


Abbildung 9: a) Sekundärstrukturmodell des Cdi2 Riboschalters nach Inline Probing. b) Regulation der Translation bei hoher und niedriger c-di-GMP Konzentration. Abbildung wurde entnommen und überarbeitet aus Chen et al. 2011.¹⁶⁵

Der Typ 2 Riboschalter Cdi-2_4, der die Expression von Type IV Pili Proteinen reguliert, ist nicht mit einem Ribozym verbunden, sondern reguliert, c-di-GMP abhängig, die Verhinderung der Ausbildung eines Terminators und fungiert somit als transkriptioneller Einschalter¹⁷². Weitere c-di-GMP Riboschalter in *C. Difficile*, die mit der Oberflächenbeschaffenheit und/oder der Toxin-Produktion des Bakteriums zusammenhängen, konnten identifiziert werden. Von diesen konnten 16 in vivo als funktionsfähig bestätigt werden¹⁷³. Somit gibt es noch einige weitere Riboschalter, die erforscht werden müssen, um die c-di-GMP Regulation in *C. Difficile* zu verstehen.

2 Material und Methoden

2.1 DNS Präparation

Als Grundlage der DNS Präparation diente ein in DH5 α Zellen kloniertes Plasmid, das die gesamte Sequenz des Cd1 Riboschalters enthält.

TAATACGACTCACTATA**GGGAGACCTATTTAGTTTCTGATGAGAGCGAAAGCTCGAAACAGCTGTG**
AAGCTGTCAAACTAAATAGGCAAATCTAGAGAAATCTAGTGACGCAAAGCTATAGGGACTAAGGTTTATATAC
ATAAACTATGTCAGCCAGTTGCCAAAAAGAGTCCTAGGTGTATTGTATACCTAAGAAAAGTCTATAATGACTGC
CTTTTGGCAGTCATTTTGT**CCCGGG**

T7-Promotor, **Künstlicher GG-start**, HH-Ribozym, Cd1 Riboschalter Sequenz, **SmaI-Schnittstelle**

2.1.1 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die Polymerase Ketten Reaktion wurde entwickelt, um schnell, gezielt und genau definierte DNS Sequenzen vervielfältigen zu können. Dabei werden nur winzige Mengen an DNS Vorlage gebraucht. Durch den Einsatz von kurzen DNS Fragmenten, die jeweils in 5'-3' (vorwärts) und 3'-5' (rückwärts) Richtung um die Zielsequenz an den DNS-Doppelstrang binden, wird die Zielsequenz mit jedem weiterem Zyklus der PRC vervielfältigt. Diese Zyklen sorgen für eine annähernd exponentielle Vermehrung der Zielsequenz. Dabei wird zuerst der DNS Doppelstrang bei ~95 °C denaturiert und dann auf 35-65 °C heruntergekühlt, um die Anlagerung der Primer zu ermöglichen. Nach Anlagerung der Primer wird die Temperatur auf die optimale Arbeitstemperatur der verwendeten DNS-Polymerase erhöht. In diesem Schritt werden aus dNTPs durch die Polymerase neue komplementäre DNS-Stränge synthetisiert. Mit dem erneuten Sprung auf 95 °C kann der Kreislauf von vorne beginnen. Für die Herstellung von DNS zur späteren Transkription in RNS wurde PCR mit 2'-Methoxy modifizierten rückwärts Primeren genutzt. Diese modifizierten Primer wurden verwendet, um eine höhere Homogenität am 3'-Ende zu erhalten. Die Methoxy Modifikation destabilisiert die Bindung der RNS Polymerase zur RNA und verhindert so das Anhängen von 1-3 zufälligen Nucleotiden. Als Vorlage für die PCR wurde ringförmiges Plasmid genutzt, von dem durch Vorwärts- und Rückwärtsprimer die gewünschte Sequenz vervielfältigt wurde. Das im Plasmid vorhandene HH-Ribozym wurde durch einen extralangen Vorwärtsprimer übersprungen, der die Sequenz für den T7-Promotor und die ersten 22 Nucleotide der Riboschalter enthielt. Da der Vorwärtsprimer damit um die 40 Nucleotide lang war und die Rückwärtsprimer zwischen 18-24 Nucleotiden lang, musste für jedes Konstrukt die Anlagerungstemperatur optimiert werden. Der verwendete PCR-Zyklus sowie die verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 2 und die verwendeten Primer für alle Konstrukte in Tabelle 3 zusammengefasst.

Komponente	Menge	Zyklen	
Wasser	auffüllen		40,0
5x Phusen Puffer	1x	Denaturierung	2min 98°C
Vorwärtstprimer	200 uM	Denaturierung	98°C 10s
Rückwärtsprimer	0,5 uM	Anlagerung	50°C 15-30s
Vorlagen DNS	0,5 uM	Verlängerung	72°C 10-20s

Komponente	Menge	Zyklen	
Phusen DNS Polymerase	(5-10 ng)		40,0
	1.0 units/ 50 uL		

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Bedingungen zur Durchführung der PCR.

Konstrukt	Vorwärtprimer	Rückwärtsprimer
	5'-	
Cd1-80	TAATACGACTCACTATAGGAACTAAATAGG CAAATCTAGA-3'	5'- [GC]TGACATAGTTTATGTATAT-3'
Cd1-81	- -	5'- [GG]CTGACATAGTTTATGTATA-3'
Cd1-82	- -	5'-[UG]GCTGACATAGTTTATGTAT-3'
Cd1-83	- -	5'-[CU]GGCTGACATAGTTTATGTA-3'
Cd1-84	- -	5'-[AC]TGGCTGACATAGTTTATGT-3'
Cd1-86	- -	5'-[CA]ACTGGCTGACATAGTTTAT-3'
Cd1-87	- -	5'-[GC]AACTGGCTGACATAGTTTA-3'
Cd1-88	- -	5'-[GG]CAACTGGCTGACATAGTTT-3'
Cd1-89	- -	5'-[UG]GCAACTGGCTGACATAGTT-3'
Cd1-132	- -	5'-[UU]ATAGACTTTTCTTAGGTATA-3'
Cd1-135	- -	5'-[UC]ATTATAGACTTTTCTTAGGTATA-3'
Cd1-143	- -	5'-[AA]AGGCAGTCATTATAGACTTTTCT-3'
Cd1-146	- -	5'-[CA]AAAAGGCAGTCATTATAGACTT-3'
Cd1-147	- -	5'-[CC]AAAAAGGCAGTCATTATAGACT-3'
Cd1-148	- -	5'-[GC]CAAAAAGGCAGTCATTATAGAC-3'
Cd1-149	- -	5'-[UG]CCAAAAGGCAGTCATTATAGA-3'
Cd1-150	- -	5'-[CU]GCCAAAAGGCAGTCATTATAG-3'
Cd1-151	- -	5'-[AC]TGCCAAAAGGCAGTCATTATA-3'
Cd1-160	- -	5'-[AA]CAAATGACTGCCAAAAG-3'

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Primer die bei der PCR eingesetzt wurden.

2.1.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Die präparative Agarose-Gelelektrophorese dient zur Aufreinigung von PCR-Produkten, die mit den Bedingungsoptimierungen, wie in 2.1.1 beschrieben, nicht in der gewünschten Sauberkeit hergestellt werden konnten. Die Gelelektrophorese wurde in einem AnalytischeSub-Cell® Horizontal Electrophoresis System (Bio-Rad) durchgeführt. Zum Gießen des Gels wurde 1% v/v Agerose in TAE-Puffer (40mM Tris, 20mM Essigsäure, 1mM EDTA, pH 8.0) gelöst und erhitzt. Beim Gießen des Gels wurde eine Form verwendet, sodass das resultierende Gel eine Dicke von ~0,5 cm besaß. Das auspolymerisierte Gel wurde mit ~10 µg DNS, gelöst in 10 µL 50% v/v TAE-Puffer und Glycerin, beladen und für 40-50 min bei 120 V in TAE-Puffer laufen gelassen. Zusätzlich zur DNS wurde als Marker 1 µL Low Molecular Weight DNA Ladder (500 µg/mL; 25 bp – 766 bp; New England Biolabs) in eine Tasche aufgetragen. Die DNS im Gel wurde mittels GelRed™ (Biotium) angefärbt und auf einem Gel iX20 Imager (Intas) oder einem GelDoc XR+ System (Bio-Rad) mit UV-Durchlicht sichtbar gemacht. Zum Erkennen der Zielbande wurde eine dünne Scheibe der geladenen DNS eingefärbt. Diese markierte Gelscheibe wurde als Referenz für das verbleibende größere Stück des Gels benutzt. So konnte das verbleibende Zielband ohne Farbstoffverunreinigung, mit einem sauberen Skalpell unter

UV-Licht, ausgeschnitten werden. Zur Isolation der DNS aus der Agerose wurde das Quickgel Extraktionskit von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

2.2 RNS Präparation

2.2.1 Test Transkription

Zur Herstellung von RNS in einer Konzentration und Menge, wie sie für 2D NMR oder ITC nötig ist, muss die Transkription mit T7-Polymerase an mehreren Stellschrauben optimiert werden, andernfalls wird die eingesetzte Menge an NTPs oder T7-Polymerase nicht optimal ausgenutzt. So entstehen unnötig hohe Kosten im Fall von Isotopen markierten NTPs oder unnötig häufiger Aufwand für das Labor, wie sie die Darstellung von Polymerase mit sich bringt. Zusätzlich können je nach Konstrukt Nebenprodukte durch optimierte Bedingungen vermieden werden oder erst die gewünschten RNS Konstrukte entstehen. Im Verlauf dieser Arbeit wurden bei der Testtranskription vor allem die Magnesiumacetat und die DMSO Konzentration in den Testtranskriptionen optimiert. Als Standardkonzentration für NTPs wurden 6 mM eingesetzt, die NTP-Konzentration wurde nur bei einzelnen Konstrukten optimiert. Für Magnesiumacetat wurde in 5 mM Schritten zwischen 10 und 35 mM Gesamtkonzentration Magnesiumacetat im Ansatz optimiert. Für dieselbe Magnesiumacetat-Konzentration wurde die DMSO-Konzentration in drei verschiedenen Ansätzen mit Konzentration von 0, 10 oder 20 v/v eingestellt. Die Ansätze wurden für 3-6 h bei 37 ° inkubiert.

Komponente	Menge	Komponente	Menge
UTP	2-6 mM	DNS	1-2 v/v
ATP	6 mM	Spermidin	2 mM
GTP	2-6 mM	DTT	20 mM
CTP	2-6 mM	T7-Polymerase	0,136 mg/mL
H ₂ O	auffüllen	DMSO	0-20 v/v
Glutamate Puffer	250 mM	Mg-Acetat	15-35 mM

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Komponenten zur Durchführung der Testtranskription.

2.2.2 Präparative Transkription

Bei der präparativen Transkription wurden die Bedingungen, die zuvor bei der Testtranskription ermittelt wurden, auf 3-15 mL Volumen hoch skaliert. Dabei wurde die Menge der T7-Polymerase (P266L Mutante) um 20 % reduziert und nach 45 min die gleiche Menge YIPP zugegeben, um die Bildung von Magnesiumphyrophosphat zu vermeiden. Bei der großen Transkription wurde außerdem die DNS Menge von 1 auf bis zu 6 % v/v erhöht, da dies generell die Ausbeute an RNS erhöhte. Weiterhin wurden große Transkriptionen in 50 mL Behältern in einem Schüttler bei 160 rpm durchgeführt. Nach 6-18 h bei 37 °C wurde die enzymatische Reaktion beendet und die Transkription entweder über Pufferaustausch oder eine DEAE-Säule aufgereinigt.

2.2.3 Mutationen des Cd1 Riboschalters

Die mutierten Konstrukte von RNA 88 G11C, G11A, C81A, C87A und C88A wurden über DNS Vorlagen hergestellt, die von Eurofines® gekauft wurden (Tabelle 5). Für RNA A24-26U wurde ebenfalls ein Templatstrang geordert. Jedoch wurde bei diesem Konstrukt beschlossen, die DNS mittels PCR zu vervielfältigen. Dabei wurde derselbe Vorwärts- und Rückwärtsprimer wie für Cd1-88 (Tabelle 3) verwendet.

Konstrukt	Vorwärtsstrang	Gegenstrang
G11C	TAATACGACTCACTATAGGAACTAAATACGC AAATCTAGAGAAATCTAGTGACGCAAAGCTAT AGGGACTAAGGTTTATATACATAAACTATGTC AGCCAGTTGCC	GGCAACTGGCTGACATAGTTTATGTATATAAACCTT AGTCCCTATAGCTTTGCGTCACTAGATTTCTCTAGA TTTGCGTATTTA GTTTCCTATAGTGAGTCGTATTA
G11A	TAATACGACTCACTATAGGAACTAAATAAGC AAATCTAGAGAAATCTAGTGACGCAAAGCTAT AGGGACTAAGGTTTATATACATAAACTATGTC AGCCAGTTGCC	GGCAACTGGCTGACATAGTTTATGTATATAAACCTT AGTCCCTATAGCTTTGCG TCACTAGATTTCTCTAGA TTTGCTTAT TTA GTTTCCTATAGTGAGTCGTATTA
C81A	TAATACGACTCACTATAGGAACTAAATAGGC AAATCTAGAGAAATCTAGTGACGCAAAGCTAT AGGGACTAAGGTTTATATACATAAACTATGTC AGCAAGTTGCC	GGCAACTGGCTGACATAGTTTATGTATATAAACCTT AGTCCCTATAGCTTT GCG TCACTAGATTTCTCTAGA TTTGCTTATTTA GTTTCCTATAGTGAGTCGTATTA
C87A	TAATACGACTCACTATAGGAACTAAATAGGC AAATCTAGAGAAATCTAGTGACGCAAAGCTAT AGGGACTAAGGTTTATATACATAAACTATGTC AGCCAGTTGAC	GTCAACTGGCTGACATAGTTTATGTATATAAACCTT AGTCCCTATAGCTTTGCG TCACTAGA TTTCTCTAGA TTTGCTTATTTA GTTTCCTATAGTGAGTCGTATTA
C88A	TAATACGACTCACTATAGGAACTAAATAGGC AAATCTAGAGAAATCTAGTGACGCAAAGCTAT AGGGACTAAGGTTTATATACATAAACTATGTC AGCCAGTTGCA	TGCAACTGGCTGACATAGTTTATGTATATAAACCTT AG TCCCTATAGCTTTGCG TCACTAGATTTCTCTAGA TTTGCTTATTTA GTTTCCTATAGTGAGTCGTATTA
A24-26U	TAATACGACTCACTATAGGAACTAAATAGGC AAATCTAGAGTTTCTAGTGACGCAAAGCTAT AGGGACTAAGGTTTATATACATAAACTATGTC AGCCAGTTGCC	-

Table 5: DNS Vorlagen zur Transkription von mutiertem Cd1-88.

2.3 RNS Aufreinigung

Bei der RNS Aufreinigung werden Proteine, NTPs, DNA und RNS mit einer ungewünschten Länge vom Zielprodukt abgetrennt.

2.3.1 DEAE-Säule

Bei der DEAE-Säule wird Diethylaminoethylcellulose als Säulenmaterial verwendet. Das positiv geladene Säulenmaterial kann die negativ geladene RNS binden. Die gebundene RNS wird mit 0,6-3 M NaOAc von der Säule gewaschen.

Die Säule wurde mit 0,1 M NaOAc Lösung equilibriert und im Anschluss die RNS dreimal aufgetragen, um vollständige Bindung zu gewähren. Beim Auftragen der RNS und NaOAc Lösungen wurde darauf geachtet, das Säulenmaterial möglichst wenig zu verwirbeln, um eine möglichst einheitliche und konzentrierte Lauffront zu erhalten. Beim Runterwaschen der gebundenen NTPs und RNS wurden Fraktionen von je 10 mL aufgefangen. Die noch in der Transkription enthaltenen NTPs wurden mit 50 mL 0,6 M NaOAc Lösung von der Säule gewaschen und die RNS üblicherweise mit 100 mL 1 M NaOAc. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels NanoDrop™ (2.5) auf ihre optische Dichte bei

260 nm überprüft und alle Fraktionen mit einer OD über 2 auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel analysiert (2.4.2). Die RNS enthaltenden Fraktionen wurden mit 40 mL EtOH bei -80 °C versetzt und die RNS so über Nacht gefällt. Am nächsten Morgen wurde die RNS in der Zentrifuge bei 8000 g für 45 min zu einem Pellet gepresst. Der EtOH Überstand wurde dekantiert und der verbleibende Rest durch Gefriertrocknung entfernt. Das RNS Pellet wurde in H₂O gelöst bis die Lösung eine OD von ca. 100 erreicht hatte, um im Anschluss die RNS weiter mit HPLC aufzureinigen zu können.

2.3.2 HPLC

RNA für Sekundärstrukturbestimmung und ITC Messungen wurde mittels HPLC aufgereinigt. Die HPLC Aufreinigung wurde von Elke Stirnal an einer HPLC Anlage von Hitachi/VWR mit einer Kromasil RP18 100A 5µm 10x250mm Säule durchgeführt. Als Puffer A wurde 50 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 5,9 mit 2 mM Tetrabutylammonium-Hydrogen-Sulfat genutzt. Als Puffer B wurde Puffer A mit 60 v/v Acetonitril verwendet. Die Säule wurde bei 60 °C betrieben. Die erhaltenen HPLC Fraktionen wurden bei -80 °C eingefroren und an der Lyophile getrocknet. Im Anschluss wurde 9-mal per Zentrifugalkonzentrator mit Wasser gewaschen und die entsalzte RNS mit 0,1 v/v Lithiumperchlorat in Aceton gefällt. Die RNS wurde in der Zentrifuge bei 8000 g für 45 min zu einem Pellet gepresst und im Anschluss in H₂O gelöst. Die gelöste RNS wurde im Zentrifugalkonzentrator in NMR-Puffer überführt und aufkonzentriert.

2.3.3 Aufreinigung mit zentrifugaler Konzentration

Bei der Aufreinigung im zentrifugalen Konzentrator wird die Transkriptionslösung durch eine Membran (PES für RNS,) mit einer Separation nach molekularem Gewicht, gepresst. Dabei verbleiben größere Moleküle über der Membran und kleinere werden ausgefiltert, es wird eine Filtergröße gewählt die 1/3 des molekularen Gewichtes des Zielmoleküls entspricht. Durch diese Filterung können Puffer für RNS ausgetauscht oder RNS aufkonzentriert werden.

Der bei der Transkription entstandene Niederschlag musste durch Filtration über einen Sterilfilter (0,2 µm PES) vor Verwendung eines zentrifugalen Konzentrators entfernt werden, da sonst die Membran verstopfen würde. Je nach Größe des RNS Konstrukts wurden 25 mL Zentrifugalkonzentratoren (Sartorius Vivaspin™) mit 3 k, 8 k oder 10 k Molekulargewichtfiltern eingesetzt. Nach Entfernen des Niederschlags wurde die Lösung zunächst auf ca. 1 mL aufkonzentriert. Zum Pufferaustausch wurden die Lösungen im Anschluss 3-mal mit ddH₂O und 6-mal mit NMR-Puffer (50 mM bis-Tris, 110 mM NaCl) gewaschen. NMR-Proben wurden im letzten Durchlauf auf 200-300 µL Volumen eingengt.

2.4 Gelelektrophorese

2.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Analytische Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse von Plasmiden und PCR-Produkten wurden in einem AnalytischeSub-Cell® Horizontal Electrophoresis System (Bio-Rad) durchgeführt. Zum Gießen des Gels wurde 1 % v/v Agerose in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8.0) gelöst, erhitzt und auf eine Glasspalte gegossen. Das auspolymerisierte Gel wurde mit ~1 µg DNA, gelöst in 8 µL 50% v/v TAE-Puffer und Glycerin, beladen und für 40-50 min bei 120 V in TAE-Puffer laufen gelassen. Zusätzlich zur DNS wurde als Marker 1 µL 2-log DNA ladder (1000 µg/mL; 0,1-10 kB; New England Biolabs) für Plasmide oder 1 µL Low Molecular Weight DNA Ladder (500 µg/mL; 25 bp – 766 bp; New England Biolabs) für PCR Produkte eingesetzt. Die DNS im Gel wurde mittels GelRed™ (Biotium) angefärbt und auf einem Gel iX20 Imager (Intas) oder einem GelDoc XR+ System (Bio-Rad) mit UV-Durchlicht sichtbar gemacht.

2.4.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese, zur Analyse von RNS aus Transkriptionen, wurde in einem AnalytischeSub-Cell® Horizontal Electrophoresis System (Bio-Rad) durchgeführt. Die Gelmischung wurde aus 8-15 v/v 1:29 Bisacrylamid/Acrylamid in TBE-Puffer (90 mM Tris/Borsäure 2 mM EDTA ph 8,3) und 7 M Harnstoff zusammengesetzt. Die Acrylamid Mischung wurde zum Auspolymerisieren mit 0,1 v/v TEMED und APS versetzt. Das auspolymerisierte Gel wurde mit ~1 µg RNS, gelöst in 4 µL Formamid, versetzt mit Bromphenol blau, 0.1% Xylene-cyanol, beladen und für 20-35 min bei 180-210 V in TBE-Puffer laufen gelassen. Zusätzlich zur RNS wurde als Marker 1 µL low range ssRNS ladder (500 µg/mL; 50-1 k bp; New England Biolabs) auf das Gel geladen. Die RNS im Gel wurde mittels GelRed™ (Biotium) angefärbt und auf einem Gel iX20 Imager (Intas) oder einem GelDoc XR+ System (Bio-Rad) mit UV-Durchlicht sichtbar gemacht.

2.4.3 Natürliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Natürliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese, zur Analyse von RNS Faltung aus Transkriptionen, wurde in einem AnalytischeSub-Cell® Horizontal Electrophoresis System (Bio-Rad) durchgeführt. Die Gelmischung wurde aus 8-15 v/v 1:29 Bisacrylamid/Acrylamid in TB-Puffer (90 mM Tris/Borsäure ph 8,3) zusammengesetzt. Die Acrylamidmischung wurde zum Auspolymerisieren mit 0,1 v/v TEMED und APS versetzt. Das auspolymerisierte Gel wurde mit ~1 µg RNS gelöst, in 4 µL 50/50 v/v Glycerol/TB-Puffer geladen und für 1,5-3 h bei 50 V in TB-Puffer bei 4 °C laufen gelassen. Zusätzlich zur RNS wurde als Marker 1 µL low range ssRNS ladder (500 µg/mL; 50-1 k bp; New England Biolabs) auf das Gel geladen. Die RNS im Gel wurde mittels GelRed™ (Biotium) angefärbt und auf einem Gel iX20 Imager (Intas) oder einem GelDoc XR+ System (Bio-Rad) mit UV-Durchlicht sichtbar gemacht.

2.5 UV/vis Spektroskop

Zur Bestimmung der Konzentration von RNS-Lösungen wurde die optische Dichte bei 260 nm an einem NanoDrop™ One/One Mikrovolumen-UV/VIS-Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Dabei wurden die Lösungen soweit verdünnt, dass die gemessene optische Dichte unter 62,5 lag. Aus der erhaltenen optischen Dichte wurde mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ($E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} c d$) die Konzentration c der Lösungen berechnet. Der Extinktionskoeffizient ϵ_{λ} wurde mit einem online Rechner¹⁷⁵ für jedes Konstrukt separat errechnet (Tabelle 6).

RNS	$\epsilon_{\lambda}/\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$	RNS	$\epsilon_{\lambda}/\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$	RNS	$\epsilon_{\lambda}/\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$	RNS	$\epsilon_{\lambda}/\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$
80	1001,1	P1-model	229,7	132	1624,9	151	1823,5
82	1023,9	P2	338,5	135	1662	160	1917,5
83	1035,7	P3	609,2	141	1715,8	A24-26U	1065,6
84	1045,6	HP1-steam	336,3	143	1735,6	G11C	1077,7
86	1067,3	HP2-steam	315,4	146	1767,2	G11A	1085,7
87	1074,7	W3 -steam		147	1779	C81A	1090,1
88	1082,1			148	1786,4	G87A	1090,1
89	1097,5			149	1801,8	G88A	1090,1
98	1215,4			150	1813,6		

Tabelle 6: Extinktionskoeffizienten der verwendeten RNS Konstrukte.

2.6 Isotherme Titrationskalorimetrie

Bei der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) wird die Verdünnungs- und Bindungswärme gemessen, die bei der Mischung zweier Flüssigkeiten und der Bindung von zwei oder mehr

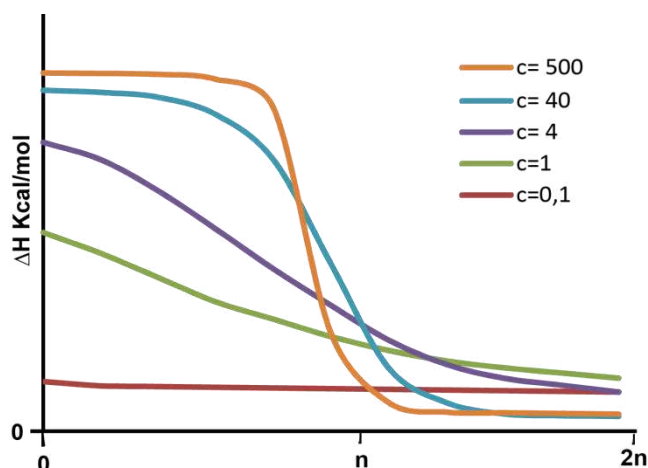


Abbildung 10: Prinzipielle Abhängigkeit der Bindungsenthalpie vom c-Wert der durchgeführten ITC-Messung. Darstellung modifiziert aus VP-ITV MicroCalorimeter User's Manual, MicroCal, LLC.

Molekülen frei wird. Aus dieser frei werden Wärme können dann konkrete thermodynamische und kinetische Parameter der gemessenen Reaktion errechnet werden. So können mittels ITC die Dissoziationskonstante (K_D), die absolute Entropie (S), die freie Enthalpie (ΔG) und die Bindungsenthalpie ΔH bestimmt werden. Zur Ermittlung der freiwerdenden Wärmemenge wurde im Vorratsreservoir eine Mischung aus 30-120 μM RNA in 50 mM Bis-Tris Puffer und 8 mM MgCl_2 vorgelegt und eine Lösung aus 300-600 μM c-di-GMP in 50 mM Bis-Tris Puffer und 8 mM MgCl_2 dazu titriert. Dabei wird vom ITC-Gerät versucht, die Temperatur im Vorratsreservoir konstant zu

halten. Wenn Wärme bei der Mischung der beiden Lösungen frei wird, benötigt das Thermostat weniger Energie, um die Temperatur in der Vorlage zu halten, was zu den charakteristischen negativen Ausschlägen im Thermogramm führt. Die gemessenen Thermogramme wurden mit Nitpic¹⁷⁶ verarbeitet und integriert. Aus den erhaltenen Bindungskurven wurde in Sephat¹⁷⁷ der K_D bestimmt. Die Sigmoidalität der gemessenen Bindungskurve und damit die Genauigkeit des K_D werden über den c-Wert der Messung bestimmt (Abb.10). Der c-Wert ist dabei als $c = KMn$ definiert, wobei K die Bindungskonstante, M die Konzentration der RNA und n den Stöchiometriefaktor der Bindung angeben. Aus der Gleichung ist ersichtlich, dass der c-Wert vor allem von der Konzentration der RNA und des c-di-GMP abhängig ist, was dazu führen kann, dass sehr hohe Konzentrationen an RNA für schlecht bindende Konstrukte eingesetzt werden müssen. Die Bestimmung von K_{on} - und K_{off} -

Raten aus den ITC erfolgte mittels des Programms KinITC (Affinimeter), durch Fitten der Gleichgewichtszeitkurve.

2.7 NMR-Spektroskopie

2.7.1 1D ^1H 1-1 jump and return

Zur Messung von 1D- ^1H NMR Spektren von RNA enthaltenden Proben, wurde eine 1-1 jump and return^{178,179} Pulssequenz eingesetzt. In der Pulssequenz wird durch zwei 90° Pulse, mit 180° Phasenunterschied, dafür gesorgt, dass eine sinusförmige Anregung entsteht, die einen Nulldurchgang besitzt. Dieser Nulldurchgang liegt auf der Trägerfrequenz ω_1 , die für RNA Proben meistens auf das Wassersignal gesetzt wird, um dieses zu unterdrücken. Durch die sinusförmige Anregung sind die Integrale der einzelnen Signale im Spektrum nicht mehr vergleichbar und es findet eine Umkehr der Phase im Spektrum statt (Abb.11).

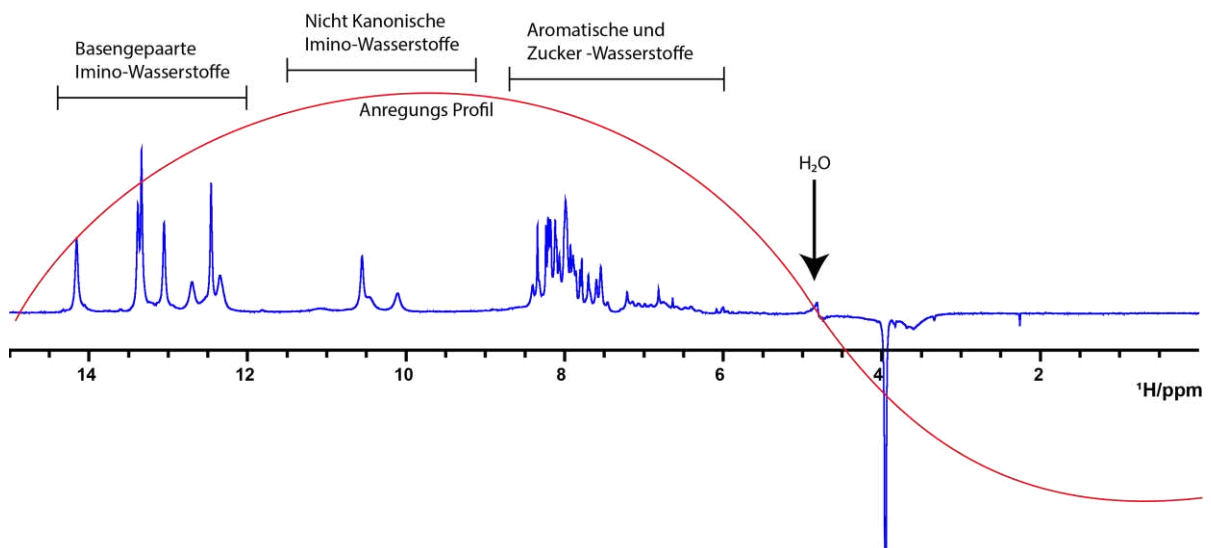


Abbildung 11: Schematische Darstellung eines ^1H 1-1 jump and return Spektrums in blau und das sinusförmige Anregungsprofil in rot dargestellt.

2.7.2 $^1\text{H}/^1\text{H}$ 1-1 Jump and return NOESY

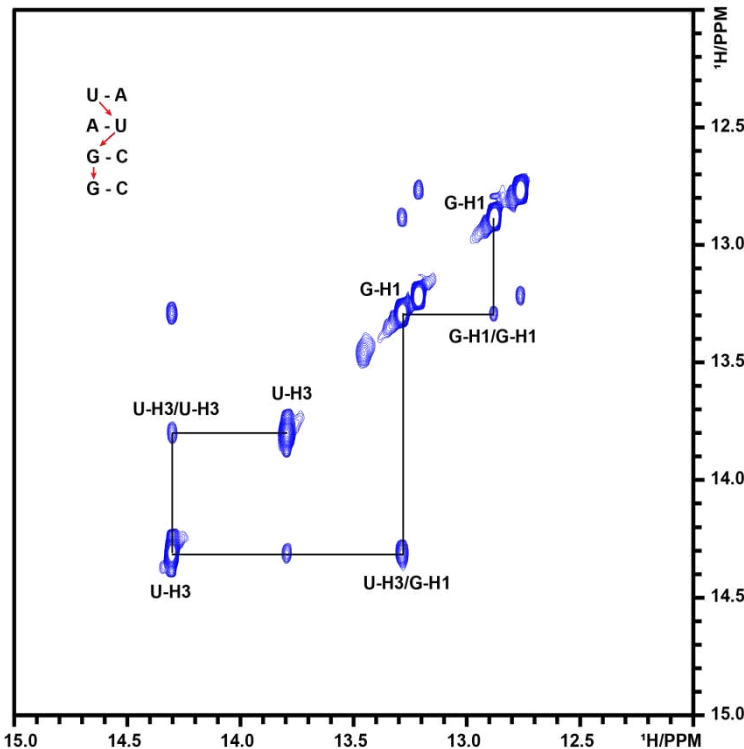


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Imino Region im NOESY mit einem eingezeichnetem Beispiel der sequenziellen Zuordnung der Iminoprotonen.

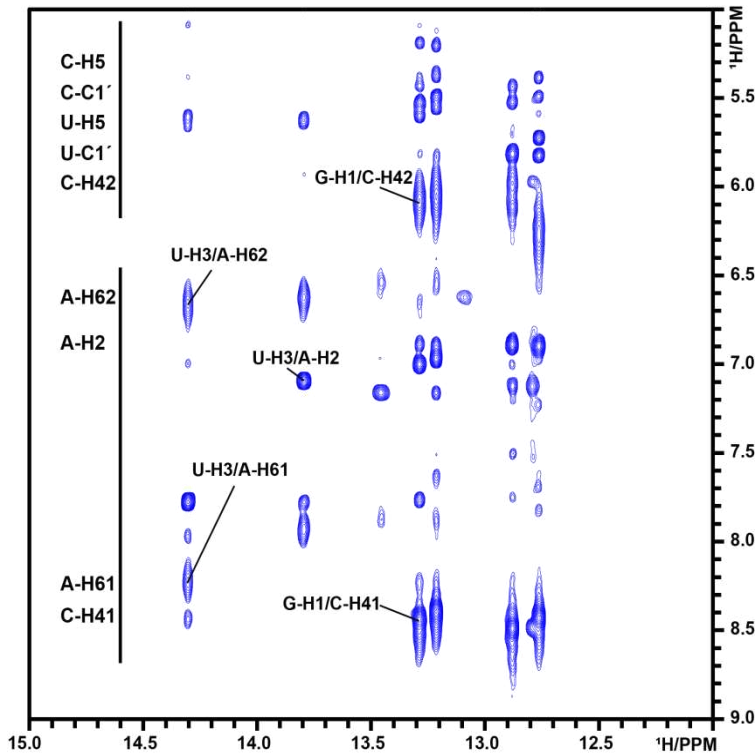


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Imino-Amino Region im NOESY mit einem eingezeichneten Beispiel der charakteristischen Signale für U-H3/A-H2, GH1/C-H41, GH1/C-H42, UH3/A-H62 und UH3/A-H61 Kreuz Signale.

Zur Strukturaufklärung von RNS ist das NOESY eine der bekanntesten und erfolgreichsten NMR Pulssequenzen¹⁸⁰. Durch Ausnutzung des Overhausereffekts¹⁸¹ werden Wasserstoffe in einem räumlichen Abstand von 5 Å (0,5 nm) mit einander korreliert. Durch diese Korrelation entstehen im 2D Spektrum die Kreuzsignale, die zeigen, dass zwei Atome in räumlicher Nähe zueinander stehen¹⁸⁰. Über die Kreuzsignale kann in der Imino-Region eines NOESYs von RNS sequenziell die Basenpaarung in gefalteten Helices zugeordnet werden¹⁸² (Abb. 12). Wegen der sehr wichtigen Informationen in der Imino-Region wurde bei der verwendeten Pulssequenz zusätzlich zur 1-1 jump and return Wasserunterdrückung¹⁷⁸, auch noch mit einem Frequenzsprung der Trägerfrequenz von 4,8 auf 9,5 ppm während der Mischzeit gearbeitet, um die Auflösung in der Imino-Region noch einmal zu verbessern. Ausgehend von der Imino/Imino Region von 15-10/15-10 ppm kann die Imino/Amino Region zugeordnet werden. In dieser Region von 15-10/9-5 ppm sind vor allem die sehr intensiven Kreuzsignale von Uridin H3 zum H2 des basenpaarenden Adenins sehr charakteristisch. Des Weiteren können für die G-C Basenpaare sehr leicht die Guanin H1 zu Cytidin H41 und Cytidin H42 Kreuzsignale zugeordnet werden (Abb.13). Auch in dieser Region ist eine sequenzielle Zuordnung der Signale entlang einer Helix möglich. Mit der Zuordnung von A-H2, C-H41, C-H42 sind die nötigen Startpunkte verfügbar, um in der besonders für Strukturrechnungen immens wichtigen

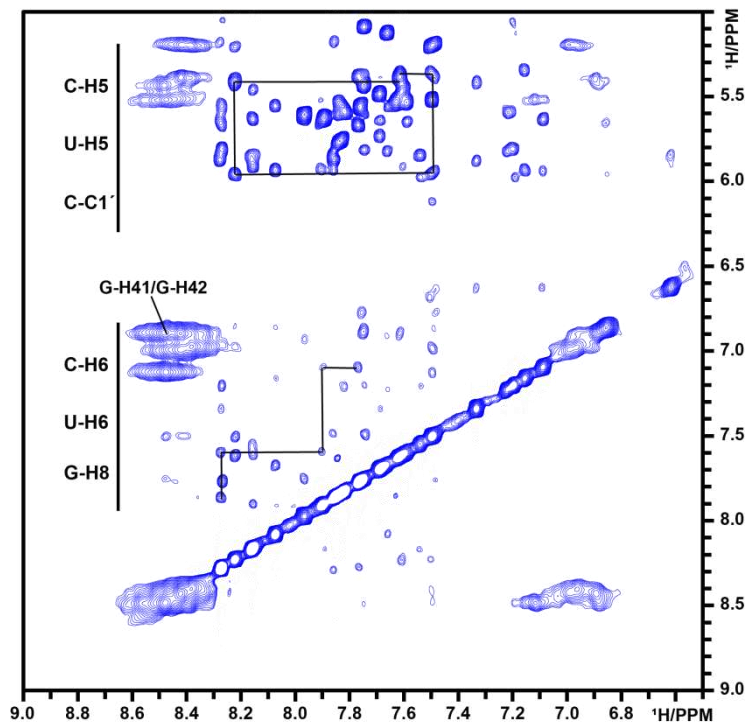


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Zucker-Aromaten Region im NOESY mit einem eingezeichneten Beispielen der charakteristischen Signale für G-H41/G-H42 Kreuz Peaks. Sowie den beispielhaft eingezeichneten sequenziellen Zuordnungen der Aromaten zu Aromaten und Aromaten zu Zucker(C1') Kreuz Signale.

zugeordnet werden kann. Über die A-H2 Sonde kann immer wieder die Zuordnung überprüft werden und somit sicher die sequenzielle Zuordnung der H1'-H6/H8 Kreuzsignale entlang einer Helix und in die Schleifen hinein geschehen.

2.7.3 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC

Die $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC^{183,184} (Heteronuclear single quantum correlation) Sequenz ist eines der bekanntesten NMR-Experimente um bei RNS durch das Einführen einer zweiten Dimension, die ^1H -chemischen Verschiebungen von Guanin H1 und Uridin H3 zu unterscheiden. Für RNS ist die Unterscheidung von Guanin H1 und Uridin H3 in der ^{15}N -chemischen Verschiebung möglich, da sich diese um circa 15 ppm unterscheiden, sodass zwei klar getrennte Gruppen an Signalen entstehen (analog zu Abb. 15). Die Signale für G-H1 liegen in der ^{15}N -Dimension bei ca. $147 \pm 2,7$ ppm und die Signale für U-H3 bei ca. $161 \pm 2,3$ ppm¹⁸⁵. In diesem Experiment wird ^1H -Magnetisierung durch einen INEPT-Transfer¹⁸⁶ über die ^1J -Kopplung auf das kovalent gebundene ^{15}N Atom übertragen. Um das bessere gyromagnetische Verhältnis γ von ^1H gegenüber ^{15}N auszunutzen, wird die Magnetisierung nach der Entwicklungs- und Mischzeit mit einem weiteren INEPT-Transfer zurück auf das Proton übertragen. Durch diesen Trick müssen protonendetektierte Spektren deutlich kürzer gemessen werden als stickstoffdetektierte. Essenziell für eine effiziente Übertragung der Magnetisierung ist die Wartezeit $\Delta/2$ vor und nach dem 180° Puls des INEPT-Transfers, diese Wartezeit $\Delta/2$ entspricht im optimalen Fall $\frac{1}{4} J_{\text{HN}}$.

2.7.4 Best-TROSY

Um die basengepaarten Iminoprotonen im NOESY eindeutig zu den jeweiligen Uridinen oder Guaninen zuordnen zu können, werden ^{15}N korrelierte Spektren wie HSQC oder TROSY gemessen. Die Korrelation zu den Iminoprotonen wird in diesen Spektren über die ^1J Kopplung vom Iminoproton zum Stickstoff erzeugt, indem die Magnetisierung über einen INEPT-Transfer¹⁸⁶ vom Wasserstoff zum Stickstoff und wieder zum Wasserstoff transferiert wird. Dabei wird in der Best-TROSY Sequenz^{187,188} der TROSY Effekt ausgenutzt, wodurch eine höhere Auflösung aber ein geringeres Signal zu Rauschen

Zucker/Aromaten Region von 9-6,5/6-5 ppm (Abb. 14) mit der Zuordnung zu beginnen. Über die C H41/H42 Kreuzsignale können die C H42/H5 und anschließend die C H5/H6 Kreuzsignale zugeordnet werden. Ausgehend von diesen können die Aromatensignale in der Aromaten/Aromaten Region von 8,7-6,5/8,7-6,5 ppm (Abb. 14) sequenziell zugeordnet werden.

Die A-H2 Signale erfüllen bei der sequenziellen Zuordnung der Zucker H1' Region eine besondere Rolle. Sie fungieren als Sonde, die in einer Helix Signale rund um die A-U Basenpaare verbinden. Da in einer Helix von den A H2 Signalen aus die eigenen A-H1', das gepaarte U-H1' sowie jeweils das folgende H1' in 3'-Richtung beider Basenpaarpartner

Verhältnis erreicht wird. Um das intrinsisch schlechtere Signal zu Rauschen Verhältnis im Vergleich zu Standard HSQC Sequenzen zu verbessern, wird in der Best-TROSY Sequenz mit selektiven Pulsen gearbeitet, die dafür sorgen, dass am Ende der Pulssequenz möglichst viel der Magnetisierung wieder im Grundzustand angekommen ist. Dadurch ist es möglich, die Wartezeit zwischen den einzelnen Messungen stark zu verkürzen, sodass das schlechte Signal zu Rauschen Verhältnis durch eine hohe Zahl an Messungen ausgeglichen werden kann. Diese Vorgehensweise ermöglicht es, auch bei großen RNS noch aufgelöste Spektren zu erhalten. Dafür werden Signale außerhalb der spektralen Breite der Anregung sehr stark unterdrückt, was zum Verlust von Signalen führen kann.

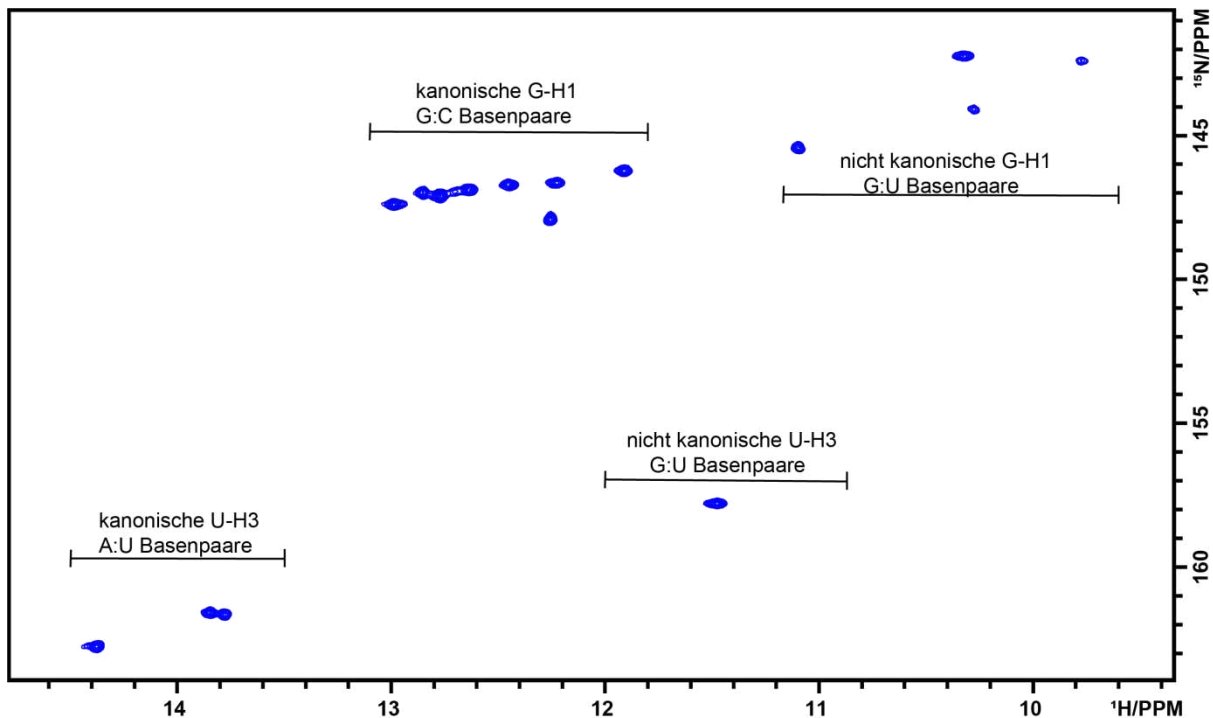


Abbildung 15: Schematische Darstellung eines $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ Best-TROSY Spektrums in blau.

2.7.5 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -sfHMQC^{189,190} und Ir- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -sfHMQC

Das ^{15}N -So-Fast-Heteronuclear-Multiple-Quantum-Correlation (SFHMQC) Spektrum ist ein eng mit dem ^{15}N -HSQC verwandtes Experiment. So-Fast bezeichnet hier die Verwendung von selektiven Pulsen und eines Start 120° Pulses, um die T1-Relaxation zu vermindern und schneller das nächste Experiment messen zu können. Auch im HMQC wird der Stickstoff mit dem gebundenen Iminoproton korreliert. Ebenfalls wird die ^1J Kopplung vom Iminoproton zum Stickstoff in der Pulssequenz ausgenutzt und die Magnetisierung vom Wasserstoff zum Stickstoff und wieder zum Wasserstoff transferiert. Im HMQC wird allerdings ^{15}N und ^1H Magnetisierung gleichzeitig entwickeln gelassen. Daher ist in dieser Zeit die homonukleare J-Kopplung der Protonen aktiv, was zu breiten Signalen in der ^{15}N Dimension, im Vergleich zum HSQC, führt. Dieser Nachteil wird allerdings dadurch ausgeglichen, dass für das HMQC deutlich weniger Pulse benötigt werden, was zu einem besseren Signal zu Rauschen Verhältnis führen kann. Des Weiteren ist die Pulssequenz in einer kürzeren Zeit zu messen, was kombiniert mit der So-Fast Methode einen signifikanten Vorteil erbringt. Vom Informationsgehalt wird ein Spektrum erhalten, das dem Best-TROSY gleicht, welches in Abschnitt 2.7.4 beschrieben wurde. Für eine lange-Reichweiten-HMQC (Ir-HMQC) wird $\Delta/2$ verlängert, um Magnetisierungsentwicklung über schwächere Kopplungen zu ermöglichen. Im Falle von RNS werden

durch ein Ir- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HMQC (Abb. 50 A) die H2 Proton der Adanine mit den Stickstoffen N3 und N1 korreliert. Für die Guanine wird Proton H8 mit den Stickstoffen N7 und N9 korreliert.

2.7.6 x-Filter 1D und X-Filter NOESY

Das X-Filter Element¹⁹¹ wird in Pulssequenzen eingesetzt, um zwischen Signalen von Protonen, die an Isotopen markierte Atome gebunden sind, und Protonen, die nicht an markierten Atomen gebunden sind, zu unterscheiden. Je nach Phase des zweiten 90° Pulses des Elements können entweder die Signale von z. B. ^{13}C gebundenen Protonen aus dem Spektrum verschwinden oder als einziges auftauchen. Durch diese Filterung werden Spektren übersichtlicher und vor allem die Zuordnung von Signalen eindeutiger, wenn z. B. nur bestimmte Nukleotide in einer RNS Isotopen markiert wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden X-Filter integriert in ^1H -1D und $^1\text{H}/^1\text{H}$ 1-1 jump and return NOESY Pulssequenzen eingesetzt. X-Filter NOESY Messungen wurden verwendet, um eine eindeutige Zuordnung nach Nukleotiden in der Iminoregion zu erreichen. Dazu wurden zwei separate Proben derselben RNS verwendet, die einmal ^{15}N -U und das andere mal ^{15}N -G markiert wurden. Die Reduktion des Überlappens der Signale ist schematisch in Abb.16 dargestellt.

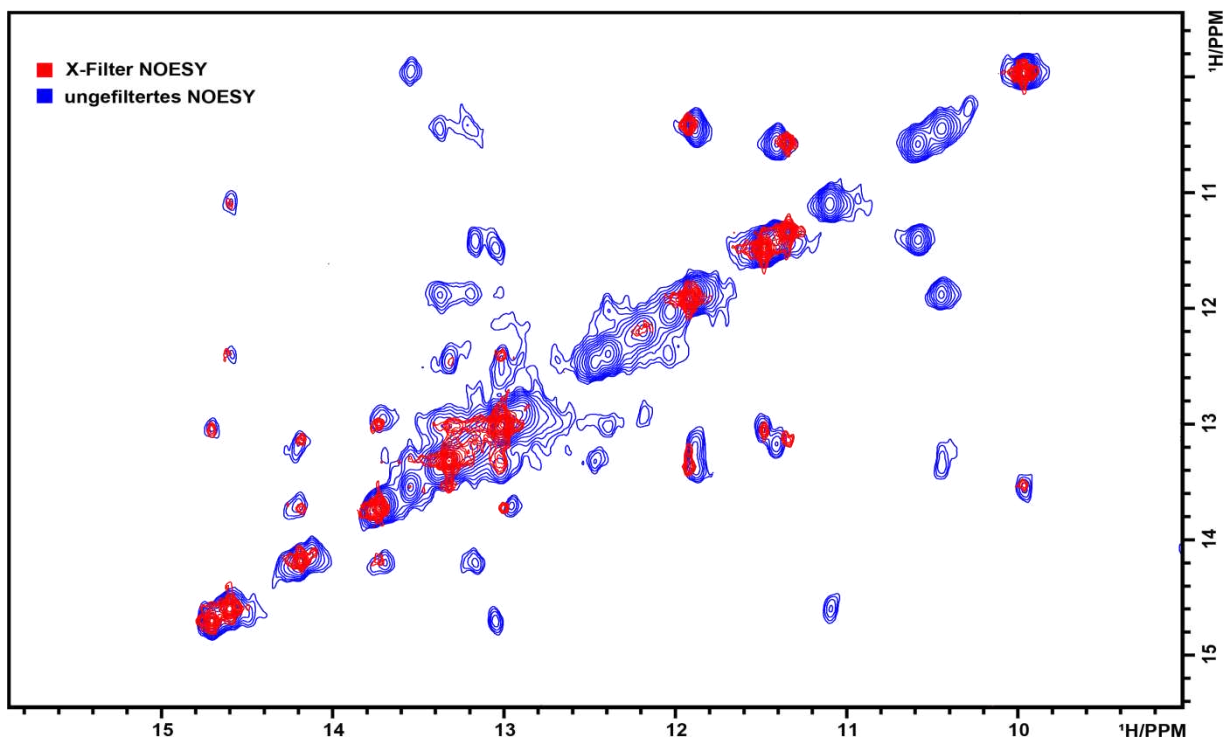


Abbildung 16: Schematischer Vergleich eines Standard $^1\text{H}/^1\text{H}$ – NOESY Spektrums in blau und einem mit X-Filter aufgenommenem NOESY mit ^{15}N markierten Uridinen in rot.

2.7.6 NMR Spektrometer

Spektrometer	Probenkopf
AV III 599	5 mm TXI CryoProbe ^1H , ^{13}C , ^{15}N , Z-GRD
AV II 600	5 mm TCI CryoProbe ^1H , ^{13}C , ^{15}N , Z-GRD
AV III 600 HD	5 mm TCI CryoProbe Prodigy ^1H , ^{13}C , ^{15}N , Z-GRD
AV 600 NEO	5 mm TCI ^1H , ^{13}C , ^{15}N , Z-GRD
AV III 700 HD	5 mm QCI CryoProbe ^1H , ^{31}P , ^{13}C , ^{15}N , Z-GRD
AV III 800	5 mm TXI ^1H , ^{13}C , ^{15}N , Z-GRD
AV 900 NEO	5 mm TXI ^1H , ^{13}C , ^{15}N , Z-GRD
AV III 950	5 mm TCI CryoProbe ^1H , ^{13}C , ^{15}N , Z-GRD

Tabelle 7: Verwendete Spektrometer und Probenköpfe

2.8 Markov Modellierung

Um zu ergründen, in welchen Zeiträumen die Regulation im Cd1-Riboschalter funktioniert, wurde ein Modell für eine Markov Simulation erstellt und mit diesem eine co-transkriptionale Faltungssimulation durchgeführt^{116,192,193}. Das Modell beschreibt ein System aus drei Zuständen Apo, Holo/Terminator (T) und Antiterminator (AT). Die Wechsel zwischen diesen Zuständen wurden, mit nukleotidaufgelösten Raten, in einer Übergangsmatrix dargestellt und als Übergänge erster Ordnung modelliert. Insgesamt gibt es 6 Übergänge, von denen je 2 die Hin- und Rückrate zwischen zwei Zuständen beschreiben. Bei der Simulation wird ausgehend von Cd-87 in Apo die RNS mit einer konstanten Rate verlängert und für jede neue Base berechnet, wie wahrscheinlich einer der anderen Zustände angenommen wird. Es ergeben sich die Populationen der drei Zustände über die Zeit. Durch Variation von einzelnen Parametern wurde die Abhängigkeit der Regulation von Ligandkonzentration, Transkriptionsgeschwindigkeit, Pausieren und Basenpaarschließungsrate modelliert. Mit Apo werden alle Faltungen der wachsenden RNS Kette beschrieben, die kein c-di-GMP gebunden haben und sich nicht in AT Faltung befinden. Der AT Zustand umfasst alle RNS Längen, die AT Faltung einnehmen. Der Zustand Holo/T umfasst alle RNS Faltungen, die c-di-GMP gebunden haben oder Teile des Terminatorstamm ausgebildet haben. Die Übergänge Apo → Holo/T wurden mittels $K_{\text{on}} \cdot \text{Konzentration}(\text{c-di-GMP})$ und die Rückreaktion Holo/T → Apo mittels $K_{\text{D}} \cdot K_{\text{on}}$ beschrieben. Dabei wurde ein Durchschnitt aus den ITC Messungen für die K_{D} und K_{on} Werte verwendet. Für die Übergänge Apo → AT und AT → Apo wurden Standardraten verwendet, die abhängig von der Anzahl der gebrochenen Basenpaare für eine Umfaltung sind, wie sie in Fürtig et al. 2007 bestimmt wurden¹⁹⁴. Für Zustände in der wachsenden RNS Kette bei denen kein Basenpaar gebrochen werden musste, wurde eine Rate (Basenpaarschließungsrate) von 400 nt/s angenommen. Übergänge zwischen Apo und AT sowie AT und Holo/T wurden erst ab Cd1-133 erlaubt. Bei den Übergängen AT → Holo/T wurden zwischen hoher (100 μM) und niedriger Ligand Konzentration (100 nM) unterschieden. Es wurde jeweils die kleinere Rate aus Standardraten oder $K_{\text{on}} \cdot \text{Konzentration}(\text{c-di-GMP})$ verwendet. Die Übergänge Holo/T → AT wurden von Cd1-134-145 mit $K_{\text{D}} \cdot K_{\text{on}}$ und $7 \cdot 10^{-6} \cdot k_{\text{on}}$ für Cd1-146,147 beschrieben. Eine Sonderbehandlung erfolgte bei Cd1-146, 147, da bei diesen Längen eine Reduktion des K_{D} bekannt ist. Ab Cd1-148 wurde mit den Standardraten gearbeitet. Alle Simulationen wurden in Mathematica 12.3 (Wolfram Research, Inc.) durchgeführt. Ein Beispielskript und eine Tabelle der verwendeten Raten findet sich im Appendix.

3 Ergebnisse und Diskussion¹⁹⁵

3.1 Bindungsverhalten von c-di-GMP an den Cd1 Riboschalter

3.1.1 Magnesiumbedarf des Cd1 Riboschalters

Mg²⁺ Ionen spielen eine wichtige Rolle bei der Faltung von RNS über spezifische Magnesiumbindestellen oder besitzen eine breite Wechselwirkung mit dem Phosphatrückgrat. Auch beim Cd1 Riboschalter konnte festgestellt werden, dass die Bindung von c-di-GMP magnesiumabhängig ist. Mittels 1D-¹H NMR Titrationsen wurde diese Abhängigkeit weiter erforscht. Als charakteristisches Reportersignal, das eine Bindung von c-di-GMP anzeigt, dient eine Gruppe aus zwei Signalen um 14,6 ppm in den ¹H Spektren. Dass die Signale bei 14,6 ppm nicht von magnesiumchloridinduzierten Umfaltungen verursacht werden, ist in Abb. 17 a) zu erkennen. Es ist zu sehen, dass die Signale bei 14,6 ppm durch Zugabe von c-di-GMP entstehen.

In Abb. 17 b) ist zu erkennen, dass bei zu niedriger Mg²⁺ Konzentration (4 mM) die zwei charakteristischen ¹H Signale bei 14,6 ppm, in einer 1 zu 1 Mischung auf RNS und c-di-GMP in der Probe, verschwinden. Wird hingegen zu der 1 zu 1 Mischung aus Cd1 RNS und c-di-GMP schrittweise Magnesiumchlorid zugegeben, ist eine graduelle Verstärkung der Signale zu beobachten. Die Intensität dieser Signale erreicht bei einem Verhältnis von 1 zu 40 RNS/c-di-GMP ein Maximum.

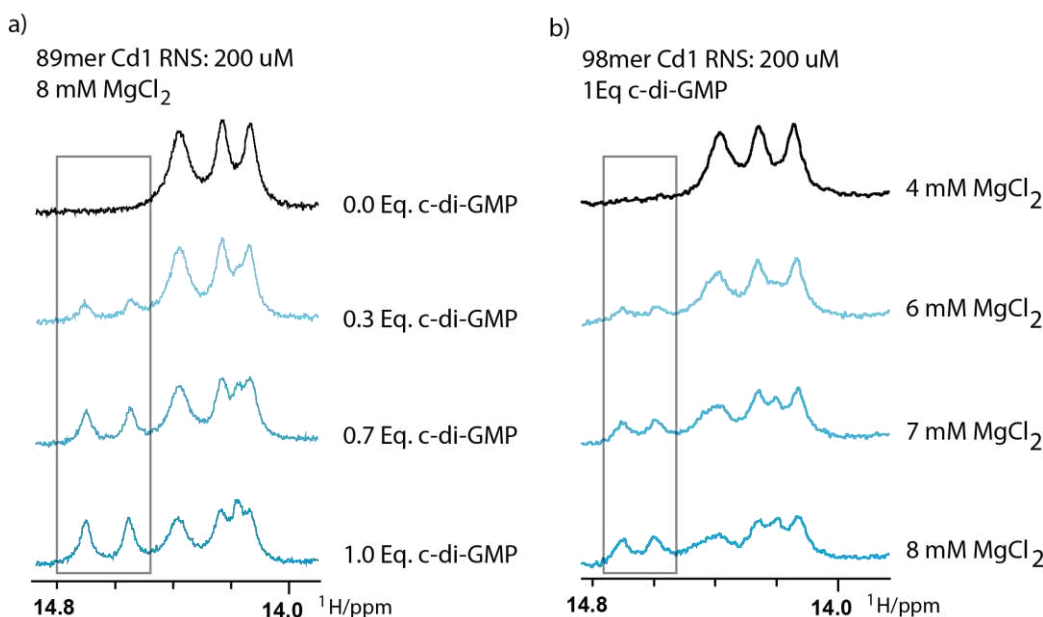


Abbildung 17: a) ¹H-jump and return- NMR-Spektrum von Cd1 89 bei 298 K in 50 mM BisTris pH 6,2 mit 110 mM NaCl. Gemessen mit 256 Scans und 16384 Punkten bei 600 MHz mit RNS Konzentration von 200 µM. b) ¹H-jump and return- NMR-Spektrum von Cd1 98 bei 298 K in 50 mM BisTris pH 6,2 mit 120 mM NaCl. Gemessen mit 128 Scans und 8192 Punkten bei 600 MHz mit RNS Konzentration von 200 µM.

Dieses Verhältnis von RNS zu c-di-GMP wurde für alle NMR-Proben in der vorliegenden Arbeit verwendet. In den ITC Messungen wurde allerdings festgestellt, dass bei niedrigeren RNS Konzentrationen (~50 µM) wie sie in der ITC angewendet werden, das 1 zu 40 Verhältnis nicht ausreicht, um unter ITC Bedingungen c-di-GMP vollständig zu binden. Wie in Abb. 18 a) zu sehen, wird bei einem 1 zu 40 Verhältnis von RNS zu Magnesium nur eine flache Titrationskurve gemessen. Wird

hingegen das Verhältnis auf 1 zu 160 erhöht (Abb. 18 b) kann eine sigmoidale Titrationskurve gemessen werden, die eine deutlich stärkere Bindung anzeigt. Diese notwendige Erhöhung der Magnesiumkonzentration zeigt vermutlich, dass Cd1 RNS zur c-di-GMP Bindung mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit mit Mg^{2+} Ionen interagieren muss. Um diese Wahrscheinlichkeit beizubehalten, muss bei sinkender RNS Konzentration die Mg^{2+} Konzentration erhöht werden. Im Umkehrschluss könnte diese Beobachtung bedeuten, dass NMR Messungen mit höheren RNS Konzentrationen als 500 μM RNS möglich wären, da das Magnesium zu RNS Verhältnis von 1 zu 40 nicht mehr beibehalten werden müsste und so die hohen Magnesiumkonzentrationen nicht jeglichen Signalgewinn durch mehr RNS durch den magnesiumkatalysierten Wasseraustausch vernichten würden.

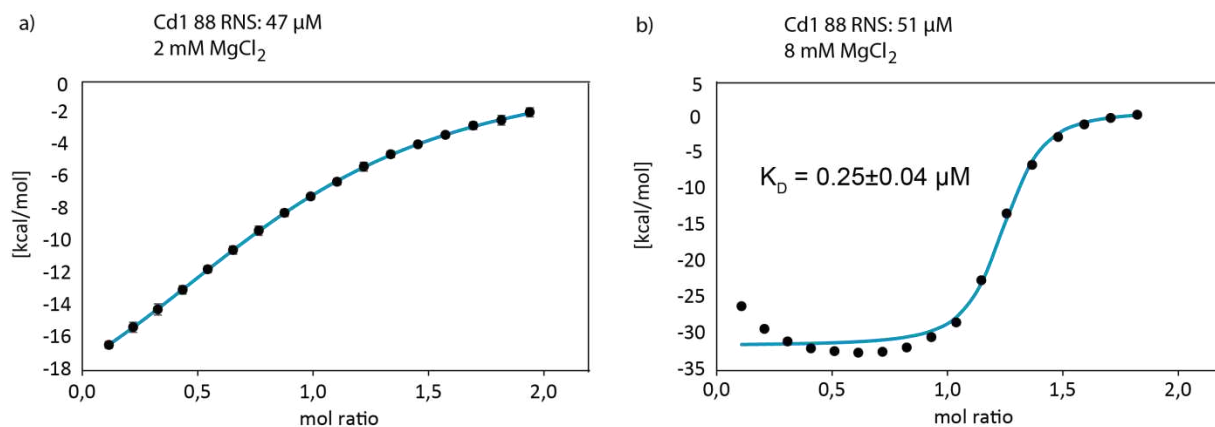


Abbildung 18: a) ITC Messung von Cd1-88 mit 2 mM Mg^{2+} b) ITC Messung von Cd1-88 mit 8 mM Mg^{2+} . Fehler im K_D wurden durch Triplikat Messung bestimmt.

3.1.2 Start und Endpunkt der c-di-GMP Bindungsfähigkeit von Cd1

Einer der wichtigsten Eckpfeiler zum Verständnis der Funktionsweise eines transkriptionalen Riboschalters ist die Länge des Zeitfensters, die für die regulatorische Umfaltung zur Verfügung steht. Um dieses Zeitfenster zu bestimmen, wurden Konstrukte verschiedener Länge des Cd1 Riboschalters hergestellt wie in Abschnitt 2.2 und 2.3 beschrieben. Bei der Titration von allen c-di-GMP bindenden Konstrukten konnten immer die Signale von U46 und U27 bei ca. 14,6 ppm und U32 bei 10 ppm als Reportersignal für Ligandbindung verwendet werden (Abb. 19 a). Das erste Konstrukt, das diese Signale bei c-di-GMP Zugabe aufweist, ist Cd1-83. Im Vergleich mit Konstrukten größerer Länge wie Cd1-87 fällt allerdings auf, dass die Signale eine geringe Intensität besitzen (Abb. 19 a). Dieser Umstand lässt Zweifel aufkommen, ob von Cd1-83 eine stabile Bindetasche gebildet wird. Dies wird auch von den ITC Messungen unterstützt bei denen für Cd1-83 keine Bindung, mit einem $K_D < 100 \mu M$, festgestellt werden konnte, während für nachfolgende Konstrukte wie Cd1-86 und Cd1-87 K_D Werte im niedrigen μM Bereich gemessen wurden (Abb. 19 c). Dieser Trend zeigt sich auch in den NMR Messungen, in denen die Reportersignale von Cd1-86 und Cd1-87, im Vergleich zu Cd1-83, deutlich an Intensität gewinnen. Die deutliche Verbesserung des K_D Wertes für Cd1-86 und Cd1-87 deutet auf strukturelle Änderungen im Bindungsmodus hin. Auffällig ist dies vor allem für Cd1-87, bei dem die ITC Kurve die erwünschte sigmoidale Form annimmt, was auf eine Verbesserung der Bindung von c-di-GMP im Vergleich zu Cd1-86 hindeutet, da in beiden Messungen ähnliche Konzentration für RNS und Ligand verwendet wurden. Zusätzlich unterstützt wird diese Beobachtung dadurch, dass für Cd1-88 der K_D weiter auf $0,25 \pm 0,04 \mu M$ sinkt, was für eine weitere Stabilisierung der Faltung spricht (Abb. 18 b). In der Gesamtschau dieser Ergebnisse ist zu vermuten, dass mit

Erreichen von Cd1-83 eine fehlgefaltete Bindetasche stabilisiert wird, wie sie in Abb. 19 b dargestellt ist. Diese Faltung könnte durch das Ausformen einer P1 Helix unter dem basenpaarenden Nukleotid C81 ausreichend stabilisiert werden, um eine rudimentäre Bindung von c-di-GMP zu ermöglichen.

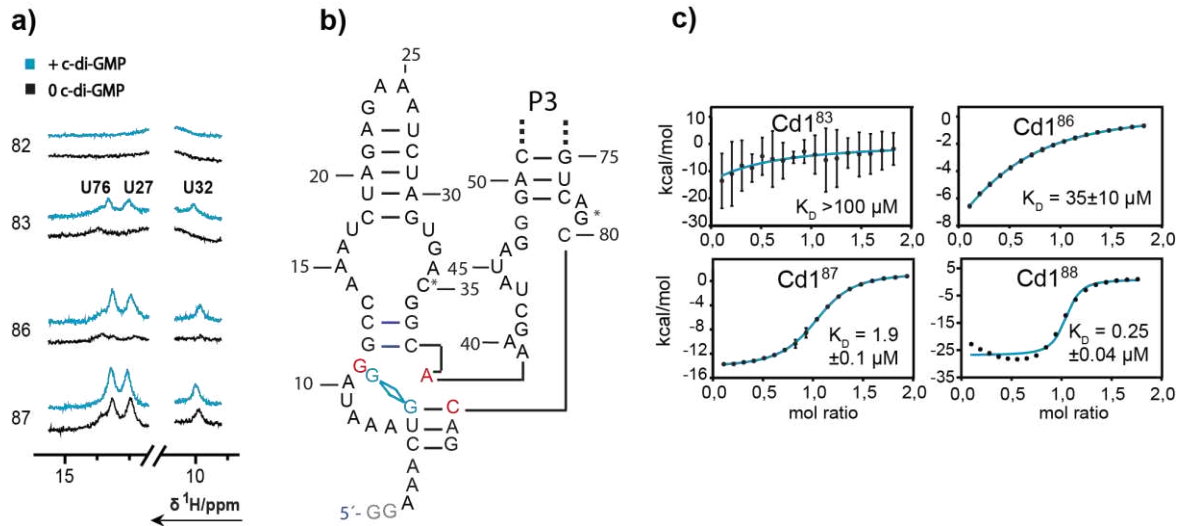


Abbildung 19: a) 1D-NMR Spektren von RNS Cd1-82, 83, 86 und 87 gemessen ohne und mit 1 Äquivalent c-di-GMP. Die Spektren von Cd1 82 und 83 wurden mit 16384 Punkten und 256 Scans bei 600 MHz aufgenommen. Die Spektren von Cd1-86 und 87 wurden mit 16384 Punkten und 512 Scans für Cd1-86 und 128 Scans für Cd1-87 bei 599 MHz aufgenommen. b) vermutete Sekundärstruktur von Cd1-83, die die Bindung von c-di-GMP vor der vollen Ausformung der Bindetasche ermöglicht. c) ITC Messungen von RNS 83, 86, 87 und 88 durchgeführt mit ca. 60 μM RNS als Vorlage und 600 μM c-di-GMP in NMR Puffer. Fehler des K_D wurden über Triplikat Messungen bestimmt¹⁹⁵.

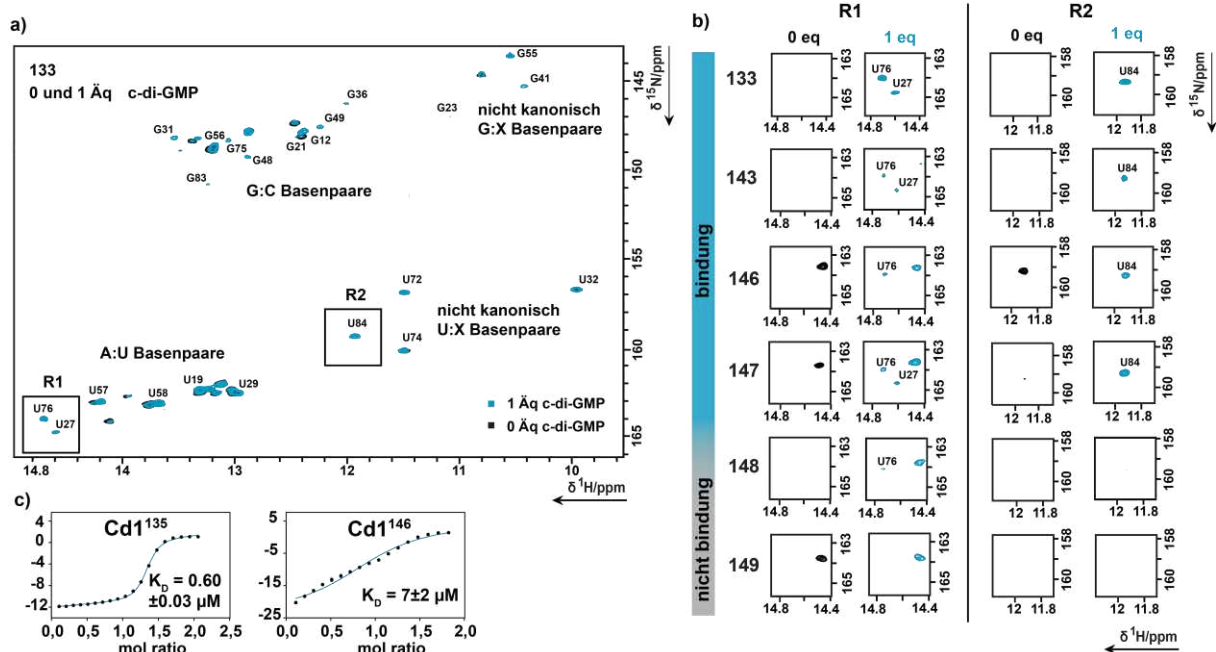


Abbildung 20: a) Überlagerung der best TROSY Spektren von Cd1 133 mit 0 und 1 Äquivalent c-di-GMP mit einer RNS Konzentration von 200 μM bei 298K. Die Spektren wurde mit 1k/256 Punkten, 12 Scans und 24/35 ppm spektraler Weite bei 700 MHz aufgenommen. b) Ausschnitte aus den best TROSY Spektren von Cd1 133, 143, 146-149. Gezeigt sind zwei Regionen in denen Reportersignale bei Zugabe von c-di-GMP auftauchen. c) ITC Messung von Cd1-135, 146 und 147. Fehler im K_D wurden durch Triplikat Messung bestimmt¹⁹⁵.

A86 kann diese Helix dann durch Stapeln an U85 stabilisieren und abschließen. So kann erklärt werden, warum für Cd1-86 ein K_D von immerhin 35 μM gemessen werden kann. Mit der Verlängerung um C87 wird allerdings ein K_D von 1,9 μM gemessen, was nicht mehr durch eine Verlängerung der P1 erklärt werden kann. Daher kann davon ausgegangen werden, dass mit Erreichen von C87 die stabile Aptamerkonformation eingenommen wird. Der Endpunkt der Ligandbindungsfähigkeit wurde über eine Reihe von $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ best-TROSY Spektren bestimmt, um die Auflösungsprobleme und generell sehr breiten Signale von RNS dieser Größenordnung zu umgehen. Dazu wurden die Reportersignale bei 14,6/165 ppm und 11,9/159 ppm für jede der in Abb. 20 dargestellten Längen miteinander verglichen. Dabei fällt auf, dass das Reportersignal U27 schon bei Länge 146 verschwindet und dann bei 147 noch einmal auftaucht. Dieses Verhalten kann als Signal für die beginnende Destabilisierung der Bindetasche gedeutet werden, was durch die gemessenen K_D Werte in Abb. 20 weiter unterstützt wird. In der zweiten ausgewählten Region ist dieses Verhalten nicht zu beobachten, das Signal für U76 ist konstant bei c-di-GMP Zugabe vorhanden und verschwindet schlagartig bei Cd1-148. Als Gesamtbild ergibt sich somit, dass Cd1-148 die erste Länge von Cd1 ist, bei der die stabilisierte Bindetasche so weit entfaltet ist, dass keine Ligandbindung mehr stattfinden kann. Das Restsignal von U76 ist wahrscheinlich auf einen Cd1-83 ähnlichen Bindungsmodus zurückzuführen, der die P3 Schleife noch rudimentär stabilisiert und so für das Signal sorgt. Der Verlust der Fähigkeit zur Ligandbindung ist auf das Umfalten der Nukleotide der Bindetasche in die Antiterminatorkonformation zurückzuführen. Mit Länge 148 ist ein G:C Basenpaar im Antiterminator entstanden, das die Basenpaarung von C87 durch G147 stabilisiert. In der Messung von Cd1-149 ist keine Restbindung zu erkennen, wie sie theoretisch durch eine Cd1-83 ähnlicher Faltung entstehen sollte. Dies lässt sich durch eine weitere Verkürzung der P1 um U85 und die damit einhergehenden sterischen Spannungen durch den Übergang in die Antiterminatorhelix begründen (Abb.8). Insgesamt hat Cd1 somit 61-65 Nukleotide Zeit um Ligand zu binden und zu entscheiden, ob der Riboschalter an- oder ausgeschaltet ist.

3.2 Sekundär- und Tertiärstruktur des Cd1-Riboswitches

3.2.1 Sekundär- und Tertiär--Struktur der Aptamerdomäne

Aus der Betrachtung des Startpunkts der Ligandbindung aus Abschnitt 3.1.2 ergibt sich eine zentrale Frage über das Aptamer von Cd1. Warum ist die Aptamerfaltung mit Erreichen von C87 stabiler, als mit einer vermutlichen P1 Helix aus vier Basenpaaren und einer Basenpaarung von c-di-GMP durch C81? Um diese Frage beantworten zu können, müssen zuerst die Sekundärstruktur und die Tertiärinteraktionen des Aptamers aufgeklärt werden. Ein erster Schritt zur Klärung dieser Strukturen ist eine Zuordnung der Imino-NOESY Signale der Aptamer RNS, da dadurch sofort klar ist welche Nukleotide sich in einer Helix befinden. Zu diesem Zweck wurde als erstes Konstrukt Cd1-98 gewählt, da in diesem Fall genug Nukleotide über das vorhergesagte Aptamer hinaus vorhanden sind, um unerwartete Interaktionen zu ermöglichen. Die große Menge an Änderungen, die im Aptamer ablaufen, wenn c-di-GMP gebunden wird, wird schnell im Vergleich der Spektren in Abb. 21 und Abb. 22 offensichtlich. Bei Zugabe von c-di-GMP erscheinen im Spektrum Abb. 22 bei 12-10 ppm komplett neue Ketten an Kreuzsignalen, wo zuvor nur schwache Signale auf der Diagonalen, in Abb. 21, zu erkennen waren. Dies zeigt, dass sich neue Helices bilden und vorhandene stabilisiert werden. Somit ist klar, Cd1-98 kann c-di-GMP binden und wird durch diese Bindung stabilisiert. Um nun die aufgenommen NOESY Spektren zuordnen zu können, ist es erforderlich zu wissen, welches der Kreuzsignale durch ein Iminoproton von Uridin oder Guanin hervorgerufen wird.

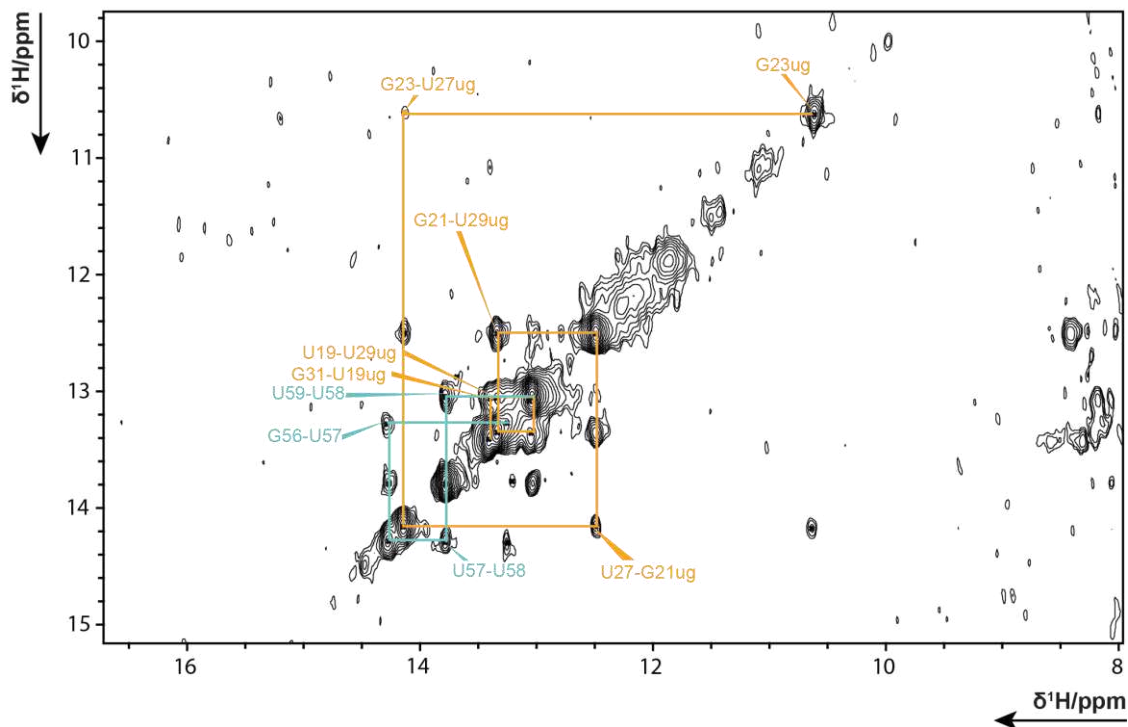


Abbildung 21: $^1\text{H}/^1\text{H}$ jump-and-return echo NOESY von Cd1-98 at mit einer Konzentration von $500\ \mu\text{M}$ bei 298 K. Die RNS wurde in 50 mM Bis-Tris Buffer, 120 mM NaCl und 20 mM MgCl_2 gepuffert. Das Spektrum wurde mit 2k/380 Punkten, 384 Scans und 24 ppm spektraler Weite bei 600 MHz aufgenommen ¹⁹⁵.

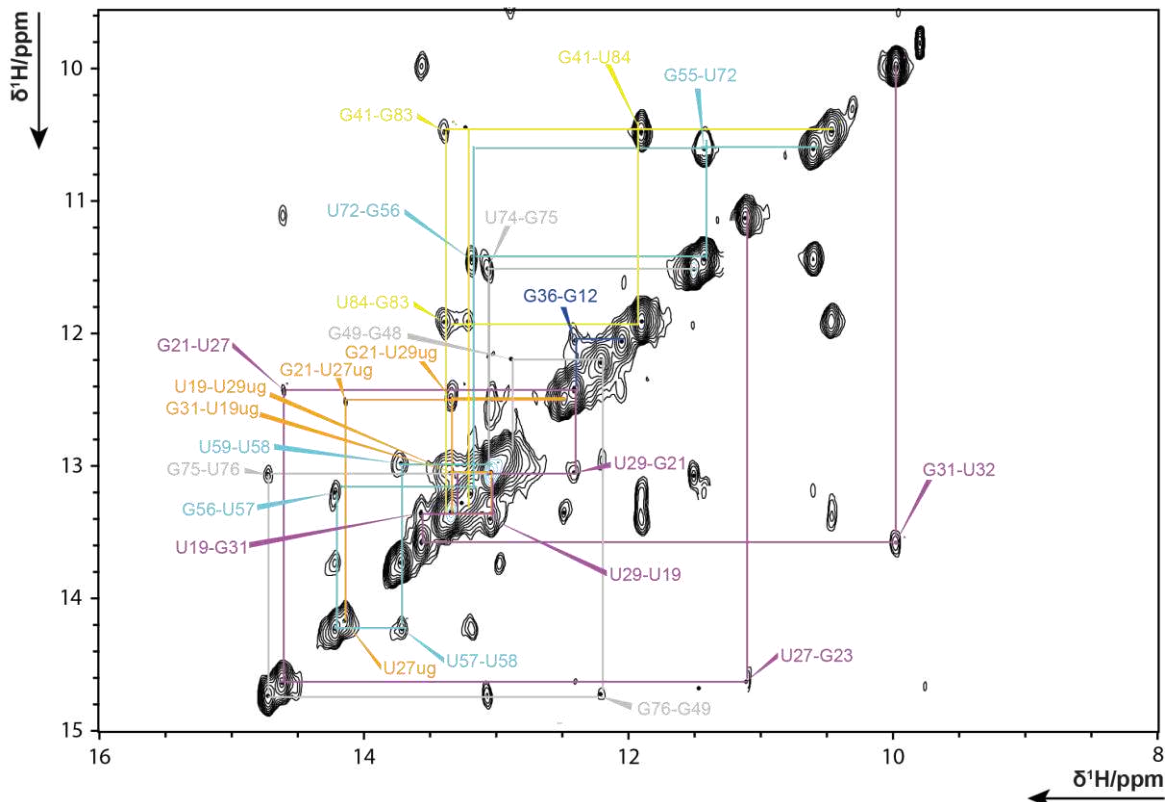


Abbildung 22: $^1\text{H}/^1\text{H}$ jump-and-return echo NOESY von Cd1-98 at mit einer Konzentration von $500\ \mu\text{M}$ und $500\ \mu\text{M}$ c-di-GMP bei 298 K. Die RNS wurde in 50 mM Bis-Tris Buffer, 120 mM NaCl und 22,5 mM MgCl_2 gepuffert. Das Spektrum wurde mit 2k/380 Punkten, 364 Scans und 24 ppm spektraler Weite bei 600 MHz aufgenommen ¹⁹⁵.

Die übliche Strategie für diese Zuordnung sind $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ korrelierte HSQC artige Messungen. Diese Strategie der Zuordnung konnte für Cd1-98 nicht mit Erfolg angewandt werden, da im Bereich um 13 ppm die Überlagerung der Signale entlang der ^1H Dimension zu groß war, um eindeutig Guanin von Uridin Signalen unterscheiden zu können. Um eine eindeutige Zuordnung zu erreichen, musste also eine andere Strategie gewählt werden. Um Zweideutigkeiten auszuschließen wurden zwei Proben von Cd1-98 hergestellt, einmal Cd1-98 ^{15}N -U markiert und eine zweite ^{15}N -G markiert. Durch dieses Markierungsmuster können in zwei x-Filter modifizierten NOESY Spektren genau die Iminosignale gemessen werden, die von den jeweils ^{15}N markierten Nukleotiden stammen (Abb. 24 und 25). Mit dieser genauen Kenntnis der einzelnen Signale ergibt sich für Cd1-98 aber ein Problem. Im Spektrum erscheinen mehr Kreuzsignale als nach Anzahl der Nukleotide und Betrachtung möglicher Sekundärstrukturen vorhanden sein sollten. Das Erscheinen dieser überzähligen Signale konnte durch einen Vergleich mit dem NOESY Spektrum eines Modellkonstrukts für die P2-Helix und die Zuordnung von Cd1-88 (Abb. 23) aufgeklärt werden. Im NOESY von Cd1-88 finden sich weniger Signale als in dem von Cd1-98. Die Differenz in der Signalmenge rührt daher, dass in Cd1-98 noch zusätzlich Signale der P2-Helix im nicht Ligand gebundenem Zustand vorhanden sind. Diese Signale sind in allen Abbildungen in orange gekennzeichnet und überlagern perfekt mit den Signalen des P2 Modells, dessen NOESY Spektrum in Abb. 26 a) zu finden ist. Die Imino-region von Cd1-88 konnte anschließend über die gängige Imino-Lauf Strategie zugeordnet werden. Als zusätzlicher Anhaltspunkt bei der Zuordnung von Cd1-88 wurde ein weiteres Modellkonstrukt für die P3 Helix hergestellt. Bei der Zuordnung des P3 Modells fällt auf, dass nur die Imino-Protonen des oberen helicalen Abschnitts U60-G56 im Spektrum (Abb. 26 b) für Kreuzsignale sorgen. Die zwei weiteren helicalen Abschnitte von P3 sind im Modell, unter den Bedingungen der Messung offensichtlich zu instabil, um gegen einen Austausch mit Wasser geschützt zu sein.

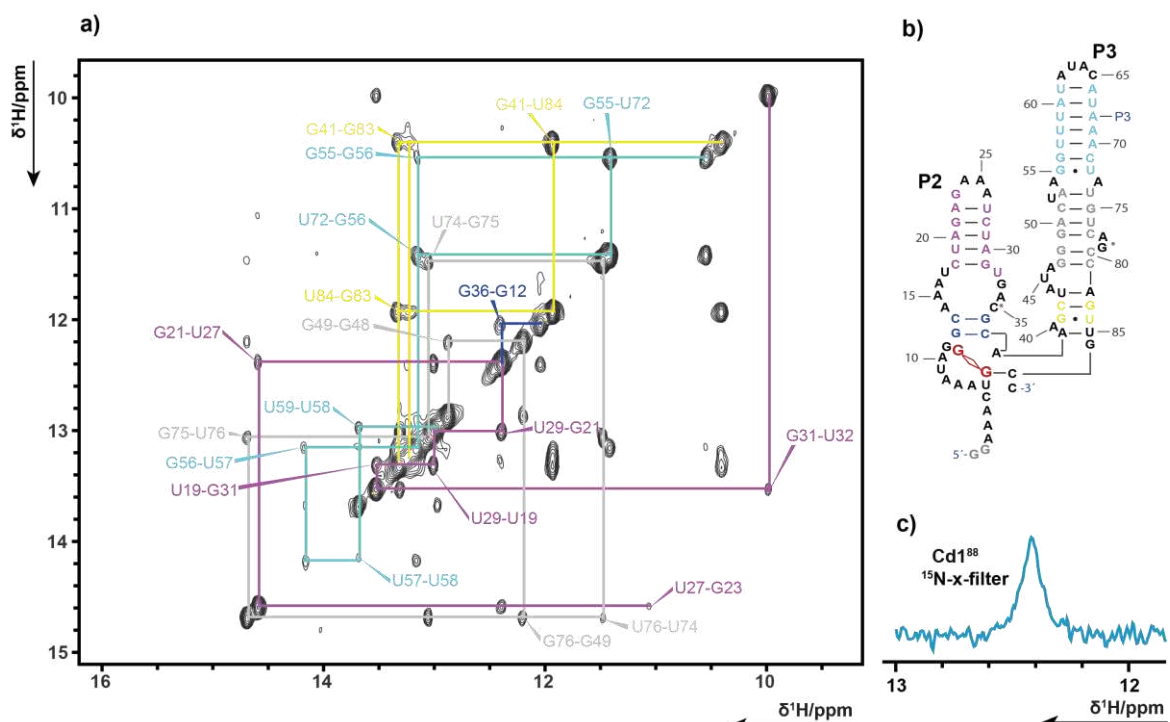


Abbildung 23: $^1\text{H}/^1\text{H}$ jump-and-return echo NOESY von Cd1-88 mit einer Konzentration von 200 μM und 300 μM c-di-GMP bei 302 K. Die RNS wurde in 50 mM Bis-Tris Buffer, 110 mM NaCl und 8 mM MgCl_2 gemessen. Das Spektrum wurde mit 2k/256 Punkten, 227 Scans und 24/16.6 ppm spektraler Weite bei 800 MHz aufgenommen ¹⁹⁵.

Dieser oberste Abschnitt der P3-Helix ist in allen Abbildungen in türkis gekennzeichnet. Interessanterweise findet sich dieser türkisfarbige Zuordnungspfad sowohl in den Spektren von Cd1-98 mit und ohne Ligand wieder. Zusammen mit der Zuordnung von ungebundenem P2 lassen sich so alle Kreuzsignale von Cd1-98 (Abb. 21) ohne c-di-GMP erklären. Aus dieser Tatsache ist ersichtlich, dass die Instabilität der unteren zwei helicalen Abschnitte nicht nur ein Artefakt eines kleineren Modellkonstruktes ist, sondern auch so im Aptamer zu finden ist. Erst mit der Zugabe von c-di-GMP kann eine Stabilisierung von P3 beobachtet werden und die beiden unteren helicalen Abschnitte, markiert in grau und gelb, erscheinen in den NOESY Spektren von Cd1-98 und Cd1-88 (Abb. 22 und Abb. 23). Auch mit der Bindung von c-di-GMP besitzt der unterste Abschnitt noch Dynamik, wie an der Aufspaltung des Kreuzsignals von G41-G83 und G84-G83 zu beobachten ist, die in verschiedenen Konstrukten unterschiedlich stark ausfällt. Das Ausbilden einer P1 Helix scheint aufgrund der Sequenz, bei einer Bindung von c-di-GMP an C87 oder C88 wie in der Literatur vorhergesagt, unmöglich. Mit der Zuordnung aller Imino-Signale wird deutlich, dass im stabilen Cd1 Aptamer keine stabile P1 Helix vorhanden ist. Dass c-di-GMP ein stabiles Basenpaar mit einem C ausbildet, kann durch die 1D ^1H -x-Filter Messung, durchgeführt mit $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markiertem c-di-GMP, gezeigt werden (Abb. 23). Das Fehlen einer P1-Helix würde in anderen Riboschaltern wie pilM zu einer Verschlechterung der Bindungskonstante führen. Daher lässt sich vermuten, dass die fehlende P1-Helix in Cd1, durch Basenstapelung des nachfolgenden Nukleotids und Tertiärinteraktionen ausreichend kompensiert wird.

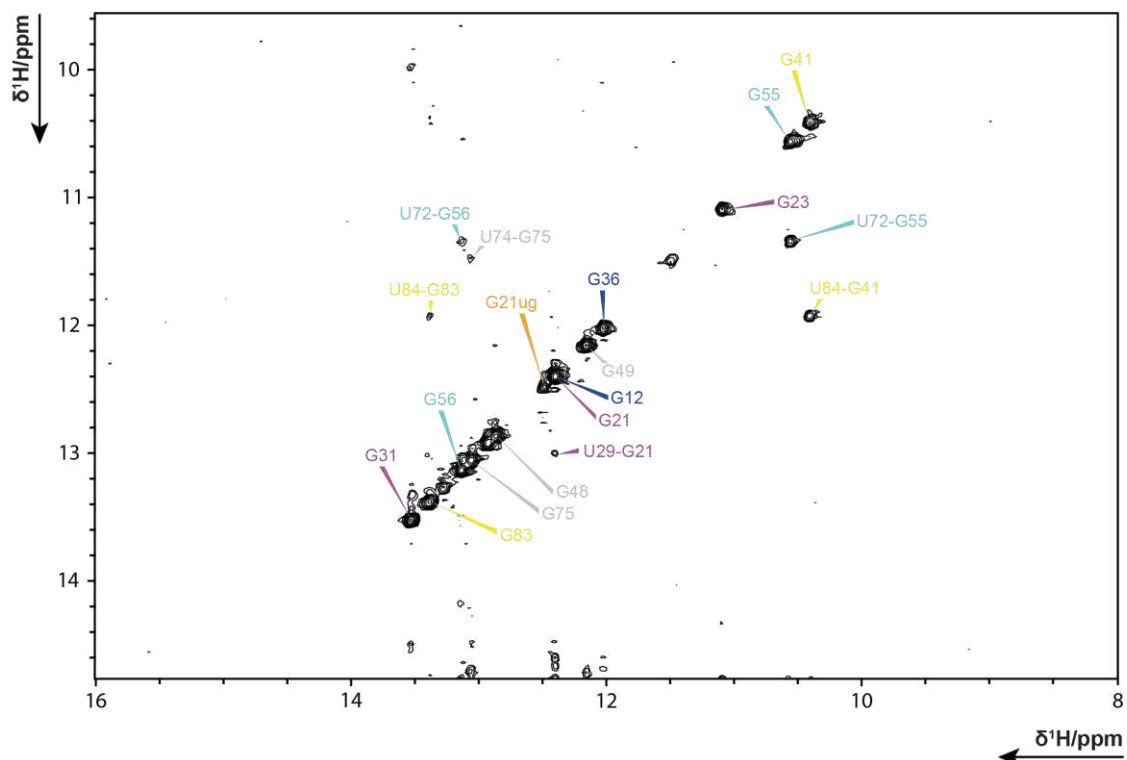


Abbildung 24: $^1\text{H}/^1\text{H}$ jump-and-return echo x-filter NOESY von RNA 98 ^{15}N G markiert mit einer Konzentration von $130\ \mu\text{M}$ und $130\ \mu\text{M}$ c-di-GMP bei 298 K. Die RNS wurde in 50 mM Bis-Tris Buffer, 110 mM NaCl und 8 mM MgCl_2 gepuffert. Das Spektrum wurde mit 2688/512 Punkten, 520 Scans und 24 ppm spektraler Weite bei 800 MHz aufgenommen ¹⁹⁵.

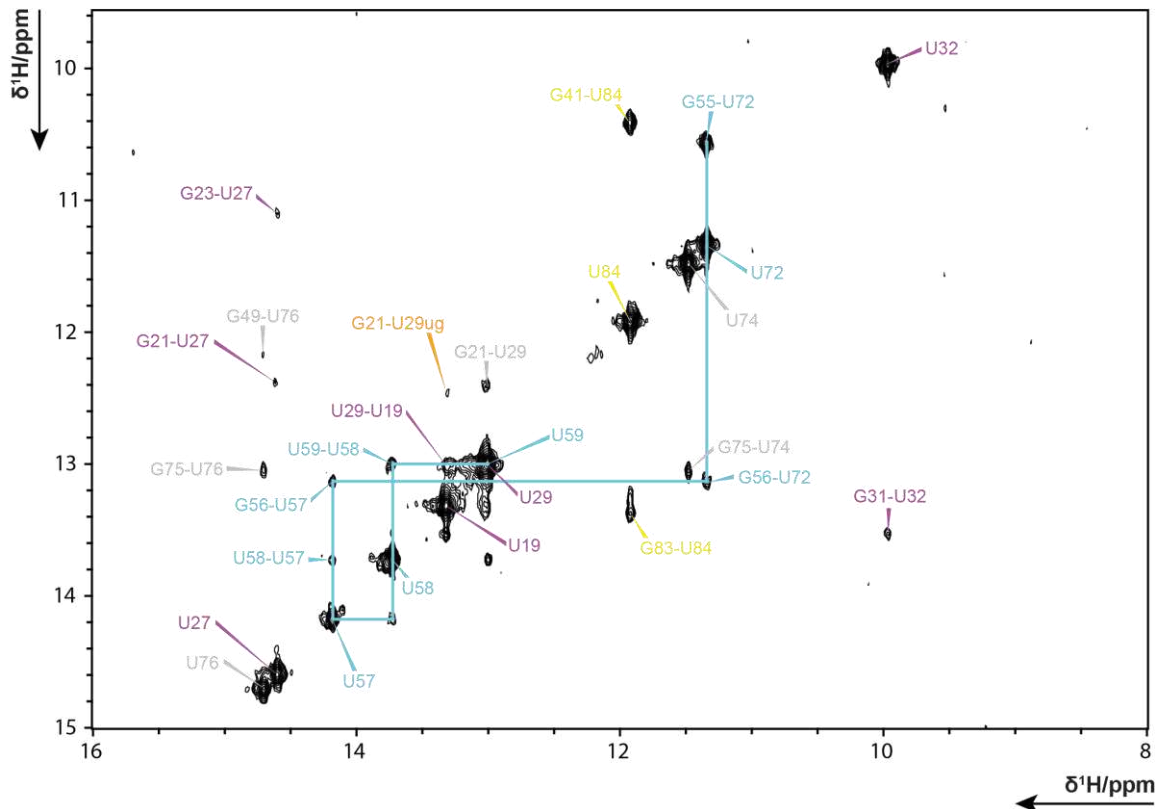


Abbildung 25: $^1\text{H}/^1\text{H}$ jump-and-return echo x-filter NOESY von RNA 98 ^{15}N markiert mit einer Konzentration von $160\ \mu\text{M}$ und $160\ \mu\text{M}$ c-di-GMP bei 298 K. Die RNS wurde in 50 mM Bis-Tris Buffer, 110 mM NaCl und 8 mM MgCl_2 gepuffert. Das Spektrum wurde mit 4096/512 Punkten, 368 Scans und 24 ppm spektraler Weite bei 700 MHz aufgenommen ¹⁹⁵.

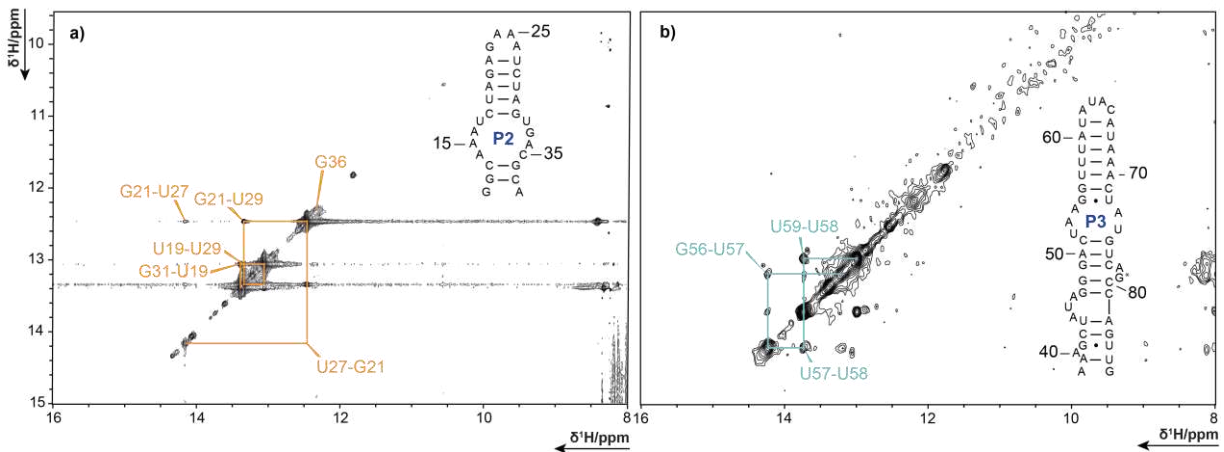


Abbildung 26: **a)** $^1\text{H}/^1\text{H}$ jump-and-return echo NOESY von einer Model RNS für den P3-Stamm mit einer Konzentration von 2,5 mM bei 298K. Die Probe wurde in 50 mM Bis-Tris Buffer, 120 mM NaCl und 10 mM MgCl_2 gemessen. Das Spektrum wurde mit 4k/1k Punkten, 84 Scans und 25 ppm spektraler Weite bei 700 MHz aufgenommen. **b)** $^1\text{H}/^1\text{H}$ jump-and-return echo NOESY von einer Model RNS für den P3-Stamm mit einer Konzentration von $540\ \mu\text{M}$ bei 298 K. Die RNS wurde in 50 mM Bis-Tris Buffer, 120 mM NaCl und 10 mM MgCl_2 gepuffert. Das Spektrum wurde mit 4096/768 Punkten, 272 Scans und 24 ppm spektraler Weite bei 950 MHz aufgenommen ¹⁹⁵.

3.2.2 Tertiärstruktur der Aptamerdomäne

Um die in 3.2.1 bereits gestellte Frage, warum ist die Aptamerfaltung ab C87 stabiler als mit einer vermutlichen P1 Helix ab Länge 83, zu beantworten, wurden Mutationsstudien durchgeführt. In Abb. 27 b ist die PAGE Analyse, der mutierten RNS Konstrukte von Cd1-88, dargestellt. In dieser fällt auf, dass bei allen Konstrukten ein leichter Abbau zu beobachten ist. Die aus der Messung dieser RNS erlangten Ergebnisse sind trotzdem aussagekräftig, besonders wenn sie untereinander verglichen werden, da die Intensität der Verunreinigungen durch kürzere Konstrukte im Vergleich mit der Hauptbande gering ist. Diese kurzen Spezies werden also, verglichen mit der Hauptspezies, auch nur wenig Signal in einer NMR Messung erzeugen. Aus der Betrachtung der Sekundärstruktur ist bereits ersichtlich, dass Tertiärinteraktionen einen enormen Einfluss auf die P2 Helix haben müssen, da die ^1H Signale von P2 mit c-di-GMP Bindung stark verschoben werden, sich aber die grundlegende Basenpaarung in den helicalen Bereichen nicht ändert. Die starke Verschiebung der P2 Signale kann dadurch erklärt werden, dass drei Schleifen Nukleotide aus P2 mit P3 interagieren. Diese Interaktion ist auch für die anderen c-di-GMP Riboschalter^{156,160} oder c-GAMP Riboschalter¹⁹⁶ bekannt. Aus drei Tatsachen können Rückschlüsse auf die Interaktion von P2 mit P3 in Cd1 gezogen werden. Erstens die interne Schleife zwischen C51 und G55 weist Ähnlichkeit mit dem bekanntem IC3²² Motiv auf und die drei Adenine in der P2 Schleife entsprechen ebenfalls diesem Bindungsmotiv. Zweitens andere c-di-GMP Riboschalter^{156,160} binden ebenfalls mit P2 in einem solchen Bereich der P3 und nicht, wie im c-GAMP Beispiel zu sehen, an die oberste Schleife der P3¹⁹⁶. Drittens bei der Mutation von A24-26 zu U verliert Cd1-88 die Bindungskompetenz für c-di-GMP (Abb. 27 c). Dies zeigt die enorme Bedeutung von A24-26 für die Gesamtstabilität des Aptamers.

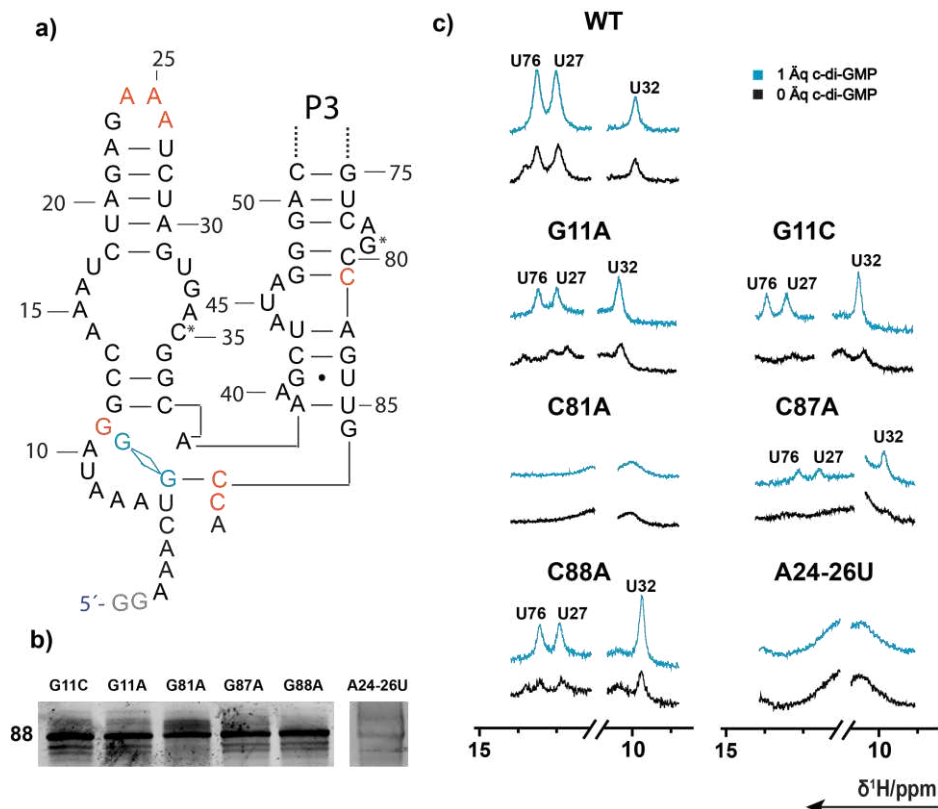


Abbildung 27: a) Sekundärstruktur des Cd1 Aptamer. Nukleotide, die mutiert wurden sind in orange markiert. b) PAGE Analyse der präparierten RNS Konstrukte c) Ausschnitt aus den 1D ^1H -NMR Spektren von Cd1-88(WT) und den Mutationen von WT G11A, G11C, G81A, C87A, C88A und A24-26U. Gezeigt sind die Regionen für drei Reportersignale, die c-di-GMP Bindung anzeigen¹⁹⁵.

C81 ist vermutlich das c-di-GMP bindende Nukleotid der alternativen Bindetasche, die dem stabilen Aptamer vorausgeht (Abb. 19 b). Diese Rolle sollte C81 in Cd1-88 nur noch in einem sehr geringen Maß einnehmen können, da nachweislich die stabilere Aptamerkonformation in Cd1-88 dominiert. Die Mutation von C81 zu A sollte die niedrig populierte alternative Bindetasche komplett aus dem Gleichgewicht der RNS Faltungen entfernen, was eine höhere Population der stabilen Aptamerkonformation zur Folge hätte. Bei der Mutation von C81 zu A ist allerdings ein kompletter Verlust der c-di-GMP Bindungsfähigkeit zu beobachten (Abb. 313). Eine weitere wichtige Interaktion, die aus anderen GEMM I Riboschaltern bekannt ist, besteht in der Basenpaarung von G79 zu C35, die an einer weiteren Position den P2 und P3 Stamm verbindet. C81:G47 ist eines der Basenpaare, die die RNS Struktur rund um G79 stabilisieren. Der Verlust dieser Stabilität reicht anscheinend aus, um die G79 zu C35 Interaktion so weit zu destabilisieren, dass sie nicht mehr stattfindet, was zum Verlust der c-di-GMP Bindungsfähigkeit führt. Zusammen zeigen die Mutationen A24-26U und C81A die enorme Wichtigkeit der tertiären Interaktionen für das Cd1 Aptamer, das eine fehlende P1 durch diese ausgleichen muss.

Dass c-di-GMP mit einem Cytidin im Cd1 Aptamer ein stabiles Basenpaar eingeht, ist durch ^1H x-filter NMR Messungen bekannt. Um zu klären, ob C87 oder C88 der Partner für c-di-GMP ist, wurden beide Positionen zu einem Adenin mutiert und die entstehenden Konstrukte C87A und C88A auf ihre Bindungsfähigkeit zu c-di-GMP getestet (Abb. 27 c). C88A zeigt ähnlich wie der Wildtyp Cd1-88 eine Vorstabilisierung der Aptamerfaltung im Spektrum ohne Ligand und einen vergleichbaren Intensitätsgewinn bei den Reportersignalen bei Ligandzugabe. Daraus wird ersichtlich, dass diese Mutation für das Aptamer nicht stark destabilisierend wirkt. Ein anderes Verhalten ist mit C87A zu beobachten. Mit dieser Mutation kann im ^1H -NMR keine Vorstabilisierung der Aptamerfaltung ohne Ligand gefunden werden. Des Weiteren ist bei c-di-GMP Zugabe nur ein geringer Gewinn an Intensität bei den Reportersignalen zu beobachten. Dieser geringe Intensitätsgewinn, besonders im Vergleich zu C88A, zeigt, dass die Mutation von C87 das Aptamer stark beeinflusst. Das bei der Mutation von C87 zu A überhaupt noch c-di-GMP Bindung zu beobachten ist, kann auf die alternative Bindungskonformation wie bei Cd1-83 bis 86 zurückgeführt werden. Dies wird vor allem im Vergleich der Spektren, von C87A (Abb. 27 c) mit denen von Cd1-83 und Cd1-86 in Abb. 313, deutlich. In der Gesamtansicht aus Bindungsstart und Mutation kann bestätigt werden, dass C87 das Nukleotid ist, welches mit c-GMP ein Basenpaar eingeht. Mutationsstudien am Vc2 Riboschalter ergaben, am C87 anlogen C92 ebenfalls eine deutliche Verschlechterung der Bindungskonstante um einen Faktor 10^3 , bei C92A und C92U, sowie eine Zunahme der Bindungskonstante um einen Faktor 10^6 bei C92G¹⁹⁷. Ein weiterer Teil der Bindetasche ist h in G11, abgeleitet aus der Strukturanalogie mit anderen GEMM I Riboschaltern, zu finden. In der Hoffnung diese Vorhersage durch eine direkte Mutation zu bestätigen, wurden die Konstrukte Cd1-88 G11A und G11C präpariert. Beide Konstrukte zeigen, gut erkennbar am Signal von U32, eine minimale Vorstabilisierung der Aptamerfaltung im Spektrum ohne Ligand. Bei Ligandzugabe gewinnen die Reportersignale U76, U27 und U32 aber deutlich an Intensität, vergleichbar mit C88A. Es ist also erkennbar, dass weder die erhoffte Stabilisierung durch G11C oder die Destabilisierung durch G11A durch die Mutationen erreicht wurden. Ein Vergleich mit dem Vc2 Riboschalter zeigt, dass mit analogen Mutationen zu G11A ebenfalls kein kompletter Verlust der c-di-GMP Bindung erreicht wurde. So ist für den Vc2 Riboschalter bekannt, dass die Mutation G20A, wobei Vc2 G20 analog zu Cd1 G11 ist, den K_D von 0,011 nM auf 0,21 nM verschlechtert. Die größte K_D Verschlechterung durch diese Position wurde in Vc2 durch G20U von 0,011 nM auf 330 nM erreicht¹⁹⁷. Die größte Auswirkung auf den K_D konnte durch eine Mutation an A47 erreicht werden.

Vc2 A47 ist mit Cd1 A38 identisch und Mutationen an diesem verschlechterten den K_D um einen Faktor 10^5 . Hier zeigt sich die Wichtigkeit dieser Position für eine stabile Bindung von zyklischen Dinukleotiden in GEMM I Riboschaltern. Durch die gleichzeitige Mutation von G20A/C92U konnte Vc2 von einem c-di-GMP Binder zu einem c-di-AMP Binder umgewandelt werden¹⁹⁸. Eine andere Studie konnte zeigen, dass mit der Einzelmutation G20A Vc2 c-GAMP mit einem K_D von $1,5 \mu\text{M}$ binden kann¹⁹⁹. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die Mutationen G11A und G11C kein kompletter Verlust der c-di-GMP Bindungsfähigkeit in Cd1 zu erwarten war, sondern eher ein Verlust der Selektivität für c-di-GMP hin zu anderen zyklischen Dinukleotiden.

3.2.3 Strukturelemente der Cd1 Expressionsplattform

Durch $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY ^1H -1D NMR Messungen und Mutationen konnten viele Informationen über das Cd1 Aptamer gewonnen werden. Um die funktionale Umschaltung des Riboschalters verstehen zu können, sind weitere Informationen über die Struktur der Expressionsplattform nötig. Da die $^1\text{H}/^1\text{H}$ NOESY Spektren von großen RNS Molekülen aufgrund der Überlagerung der Signale zunehmend schwer zu interpretieren sind, wurden diese für Cd1 durch Überlagerung mit Spektren von Strukturelementen zugeordnet. Dabei wurden die $^1\text{H}/^1\text{H}$ NOESY Spektren von Cd1-147, Cd1-148 und Cd1-160 mit den NOESY Spektren von P2-Stamm, Cd1-88, HP1-Stamm und Terminatorstamm überlagert. Weitere Probleme in der Qualität der Spektren ergaben sich durch die verringerten Rotationszeiten bei großen Molekülen, die für eine Verbreiterung der Signale sorgen. Im NOESY Spektrum von Cd1-147 mit $1,5$ Äquivalenten c-di-GMP in Abb. 28 ist zu erkennen, dass sich die Signale des c-di-GMP gebundenen Aptamers, repräsentiert durch das NOESY von Cd1-88, noch immer gut im Spektrum wiederfinden lassen. Tatsächlich lässt sich ein Großteil der Kreuzsignale durch diese Überlagerung erklären. Von den potentiell 12 Basenpaaren, die sich in der Antiterminatorkonformation ausbilden können, ist nichts zu erkennen. Ein weiteres Strukturelement, das bei allen Längen ab 121 ausgebildet sein sollte, ist der HP1-Stamm.

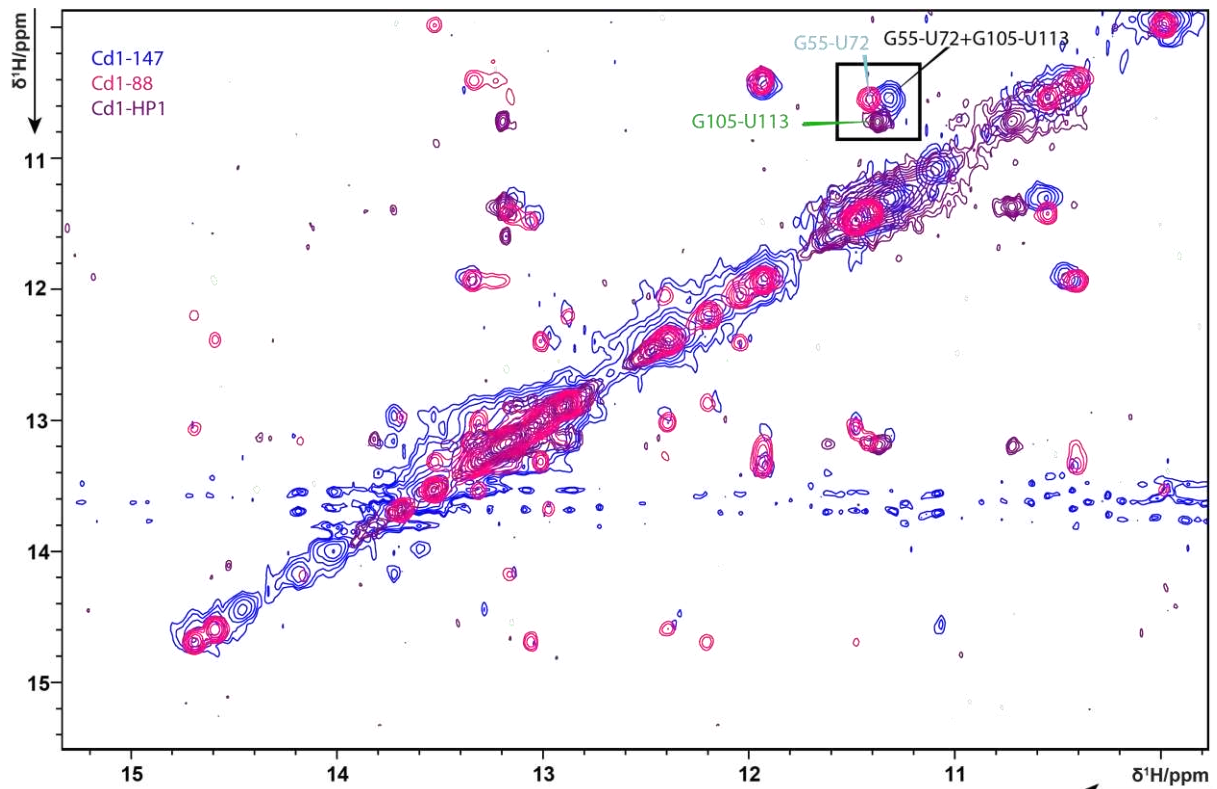


Abbildung 28: $^1\text{H}/^1\text{H}$ jump-and-return echo NOESY von Cd1-147 einer Konzentration von 200 μM und 300 μM c-di-GMP bei 298 K. Überlagert mit den $^1\text{H}/^1\text{H}$ NOESY Spektren von HP1-Stamm und Cd1-88. Die RNS wurde in 50 mM Bis-Tris Buffer, 110 mM NaCl und 8,8 mM MgCl_2 gemessen. Das Spektrum wurde mit 2048/128 Punkten, 384 Scans und 25/13 ppm spektraler Weite bei 850 MHz aufgenommen.

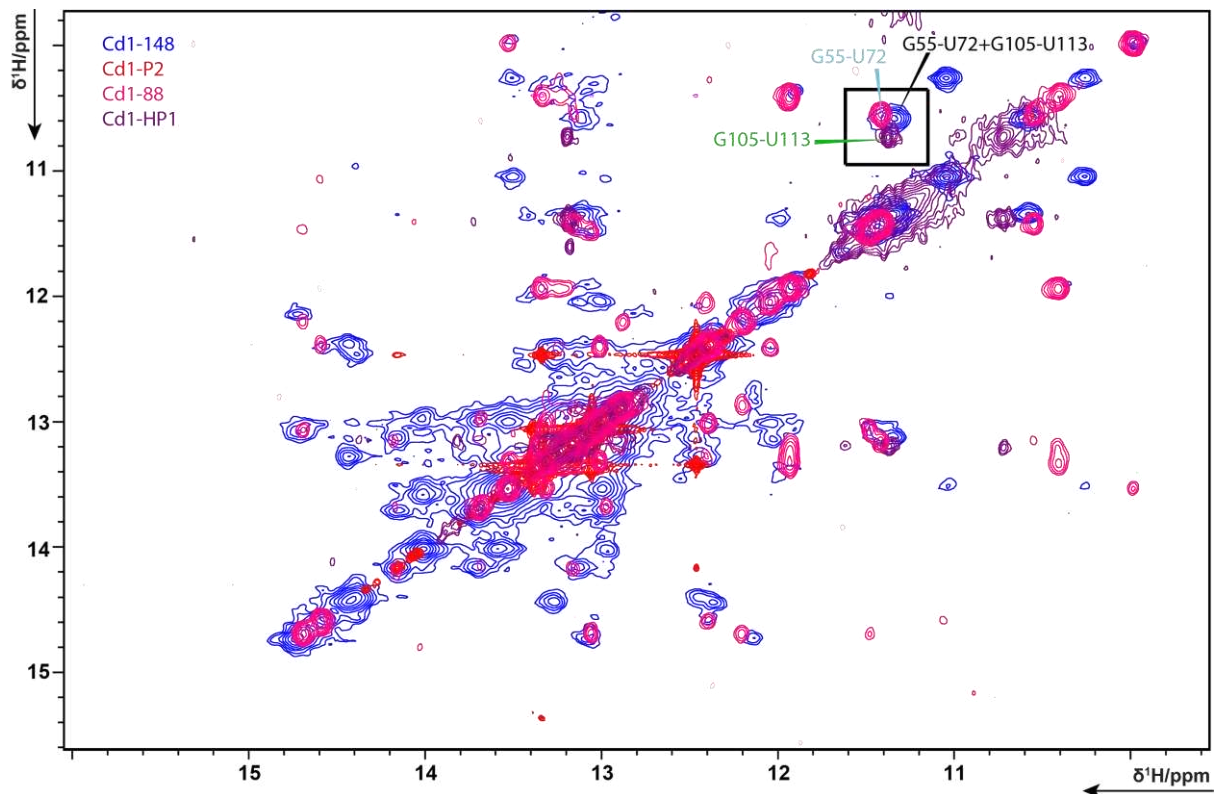


Abbildung 29: $^1\text{H}/^1\text{H}$ jump-and-return echo NOESY von Cd1 148 mit einer Konzentration von 700 μM und 700 μM c-di-GMP bei 304 K. Überlagert mit den $^1\text{H}/^1\text{H}$ NOESY Spektren von P2-Stamm, HP1-Stamm und Cd1-88. Die RNS wurde in 50 mM Bis-Tris Buffer, 120 mM NaCl und 10 mM MgCl_2 gemessen. Das Spektrum wurde mit 2048k/1024 Punkten, 290 Scans und 24/13 ppm spektraler Weite bei 600 MHz aufgenommen.

Bei der Überlagerung der NOESY Spektren von Cd1-147, Cd1-88 und HP1-Stamm fällt auf, dass die Kreuzsignale von Cd1-88 in ihrer Position stark mit den Signalen vom HP1-Stamm überlagern. Die G:U Basenpaare G55-U72 aus Cd1-88 und G105-U113 aus HP1-Stamm sind beide leicht verschoben bei einem der zwei G:U Kreuzsignale im Spektrum von Cd1-148 positioniert. Dieses G:U Signal bei 11/10,4 ppm in Cd1-147 könnte also durch eine Überlagerung der beiden Signale aus Cd1-88 und HP1-Stamm entstanden sein. Das NOESY Spektrum von 148 mit c-di-GMP zeigt den Verlust an Bindefähigkeit dieser Länge, da sowohl Signale für die gebundene Aptamerkonformation, repräsentiert durch Cd1-88, als auch für die ungebundene Konformation, repräsentiert durch P2-Stamm, zu finden sind (Abb. 29). Das G:U Signal bei 11/10,4 ppm ist auch im Spektrum von 148 zu finden. Allerdings sollte hier der Beitrag des Signals G55-U72 aus der c-di-GMP bindenden Aptamerkonformation im Vergleich zu Cd1-147 reduziert sein. Aus dem Vergleich dieser Betrachtungen ist es sehr wahrscheinlich, dass der HP1-Stamm sowohl in Cd1-147 als auch in Cd1-148 ausgeformt ist. Hinweise auf die Antiterminatorkonformation lassen sich im NOESY von Cd1-148 erahnen, da nicht alle neuen Kreuzsignale durch Überlagerung mit NOESY Spektren von HP1-Stamm und gebundener und ungebundener Aptamerkonformation erklärt werden können. Ebenfalls lassen sich in den best-TROSY Spektren von 148 ohne c-di-GMP 6 schwache Signale für G:C Basenpaare finden, die mit c-di-GMP Zugabe verschwinden (Abb. 30). Daraus lässt sich vermuten, dass an diesem Punkt der Antiterminator im Gleichgewicht mit anderen Konformationen existiert, da von Cd1-148 auch die ersten drei Basenpaare des Terminatorstamms gebildet werden können. In den gemessenen NOESY Spektren wurde kein Konstrukt gefunden, in dem die vorhergesagte Antiterminatorkonformation explizit zugeordnet werden konnte. Dass Antiterminator in Cd1-148 nicht dominant zu erkennen ist zeigt, dass diese Konformation während der Transkription wahrscheinlich nur übergangsweise stabil ist und sobald wie möglich in die Terminatorfaltung übergeht. Diese Vermutung wird auch durch das Verhalten des volle Längekonstrukts Cd1-160 und des Modells für den Terminatorstamm unterstützt. In der Überlagerung von Cd1-160 in Abb. 31 ist zu erkennen, dass Kreuzsignale durch P2 und HP1-Stamm verursacht werden. Durch den Vergleich mit dem Terminatorstammmodell in Abb. 32 zeigt sich, dass in Cd1-160 der Terminatorstamm ausgebildet ist. Dies zeigt, dass der Terminatorstamm thermodynamisch stabiler ist als der Antiterminatorstamm. Langfristig werden also alle Konstrukte ab einer bestimmten Länge immer in der Terminatorfaltung sein, wenn zwischen Präparation und Messung einige Stunden liegen.

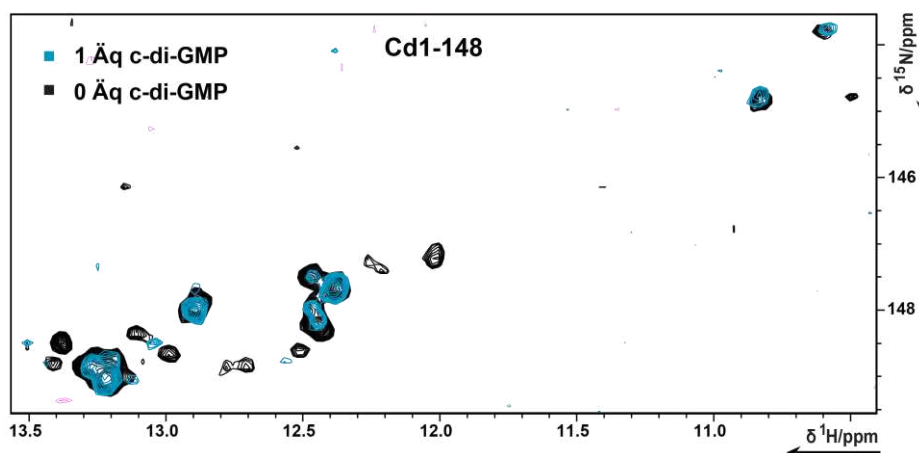


Abbildung 30: Überlagerung der best-TROSY Spektren von Cd1-148 0 und 1 Äquivalent c-di-GMP. Gezeigt ist die Region der Basenpaarenden Guanine.

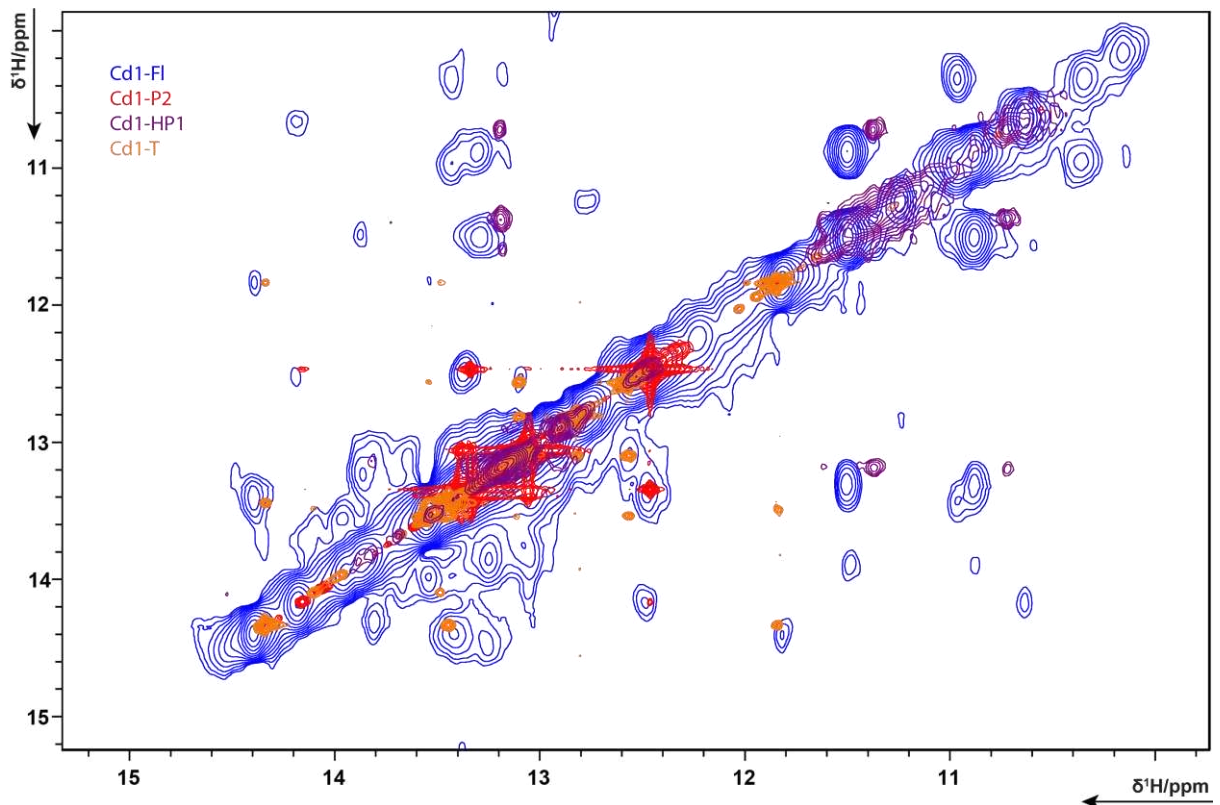


Abbildung 31: $^1\text{H}/^1\text{H}$ jump-and-return echo NOESY von Cd1 160 mit einer Konzentration von 350 μM bei 283 K. Überlagert mit den $^1\text{H}/^1\text{H}$ NOESY Spektren von P2-Stamm, HP1-Stamm und Terminator-Stamm. Die RNS wurde in 50 mM Bis-Tris Buffer, 110 mM NaCl und 10 mM MgCl_2 gepuffert. Das Spektrum wurde mit 4k/256 Punkten, 520 Scans und 24/16 ppm spektraler Weite bei 600 MHz aufgenommen¹⁹⁵.

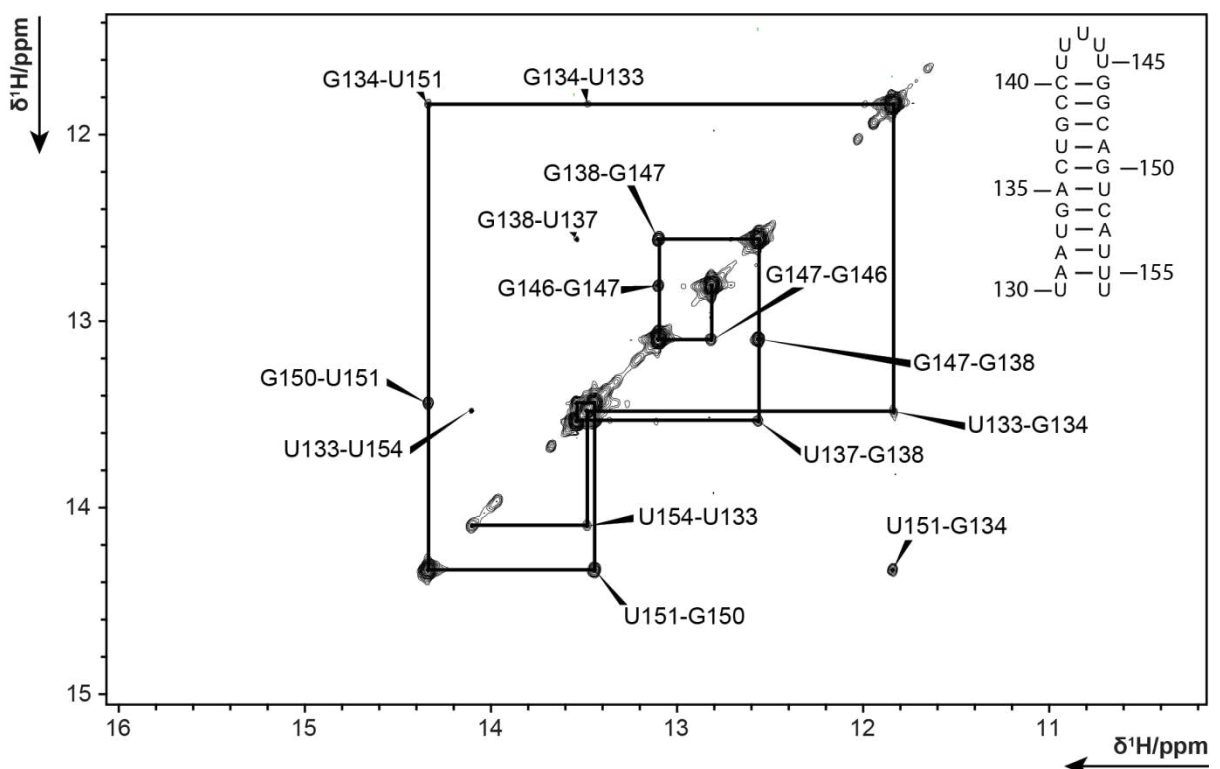


Abbildung 32: $^1\text{H}/^1\text{H}$ jump-and-return echo NOESY von Terminatormodell mit einer Konzentration von 1 mM bei 298 K. Die RNS wurde in 50 mM Bis-Tris Buffer, 110 mM NaCl und 8 mM MgCl_2 gemessen. Das Spektrum wurde mit 2048k/768 Punkten, 56 Scans und 25/12,5 ppm spektraler Weite bei 800 MHz aufgenommen¹⁹⁵.

3.3 Der regulatorische Mechanismus des Cd1 Riboschalters

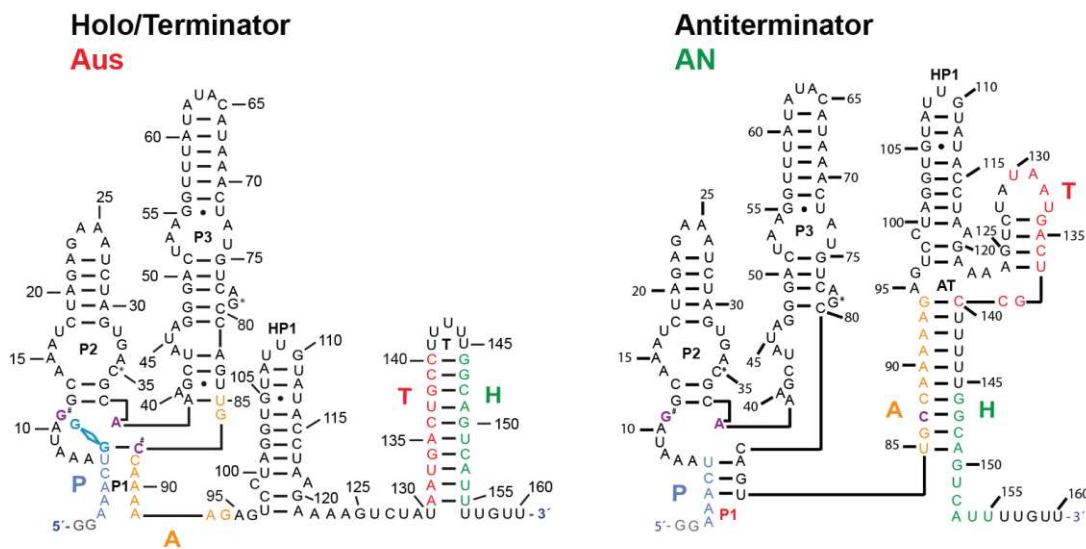


Abbildung 33: Sekundärstruktur des Cd1 Riboschalters nach Untersuchung mittels NMR Spektroskopie und ITC. Die Nukleotide der Bindetasche sind in Violett markiert. Sekundärstrukturelemente sind mit P1, P2, P3 und HP1 in Schwarz beschriftet. Ebenfalls in Schwarz beschriftet sind der Terminator (T) und die Antiterminator-Stämme. Die RNS Basen die bei der Schaltung von AT und T beteiligt sind mit P(Blau), A(Orange), T(Rot) und H(Grün) markiert.

Ausgehend vom Sekundärstrukturmodell in Abb. 33 wurde ein Modell für eine co-transkriptionale Faltungssimulation entwickelt. Im Modell wird die Faltungsdynamik des Systems durch Übergänge in drei Makrozuständen Apo, Holo/Terminator und Antiterminator (AT) dargestellt. Die ligandgebundenen Holozustände wurden mit den Zuständen in Terminatorfaltung in einem Makrozustand zusammengefasst, da für Cd1 als Aus-Schalter bekannt ist, dass das c-di-GMP Terminatorfaltung fördert. Als Startpunkt wurde Cd1-87 in Apo gewählt. Ausgehend von diesem Punkt wird die RNS immer um ein Nukleotid mit einer konstanten Rate verlängert. Für jeden dieser Schritte besteht nun die Chance, definiert durch die Übergangsraten, in Apo zu bleiben oder in einen der beiden anderen Makrozustände Holo/T oder AT zu wechseln. Bei Längen größer als Cd1-87 besteht auch die Möglichkeit, in Apo oder in den konkurrierenden Zustand zurückzuwechseln. In den Simulationen wurde die zeitliche Entwicklung der Populationen der Makrozustände in Abhängigkeit von einer Variablen in ansonsten konstanten Bedingungen betrachtet. Die Ergebnisse dieser Simulationen sind in den Höhenliniendiagrammen in Abb. 34 dargestellt. In a) wurde simuliert, wie der Cd1 Riboschalter unter c-di-GMP Konzentrationen von 100 nM bis 100 µM schalten kann. Hier ist zu beobachten, dass der Apo Zustand bei sehr niedriger (100 nM) c-di-GMP Konzentration bis zu 2s zu 100 % populiert ist. Ab diesem Zeitpunkt kann AT gebildet werden, so dass Apo innerhalb von 1 s zu 100 % AT umgewandelt wird. Unter diesen sehr niedrigen c-di-GMP Konzentrationen entsteht überhaupt keine Holo/Terminatorfaltung, der Riboschalter ist also in 100 % der Fälle im An-Zustand. Bei sehr hohen (100 µM) c-di-GMP Konzentrationen wird Apo Zustand konstant abgebaut, er wechselt sofort in den Holo Zustand, und ist nach 2,5 s komplett depopuliert. In diesen Zeitraum fällt auch das Maximum der Population des Holo/Terminatorzustandes von ca. 95 %. Nach 3s hat sich ein Gleichgewicht aus Holo/Terminator und AT von 90 zu 10 % eingestellt. Das bedeutet, der Cd1-Riboschalter ist bei hohen c-di-GMP Konzentrationen nach 3 s in 90 % der Fälle im Aus-Zustand. In den Konzentrationen zwischen Maximum und Minimum ist eine Dominanz des Holo/Terminator Zustandes zu beobachten. In über Zweidrittel des Konzentrationsraums besitzt Holo/Terminator nach 4 s eine Population von über 50 %, während die AT Population schon bei mittleren c-di-GMP Konzentrationen auf 20 % abgesunken ist.

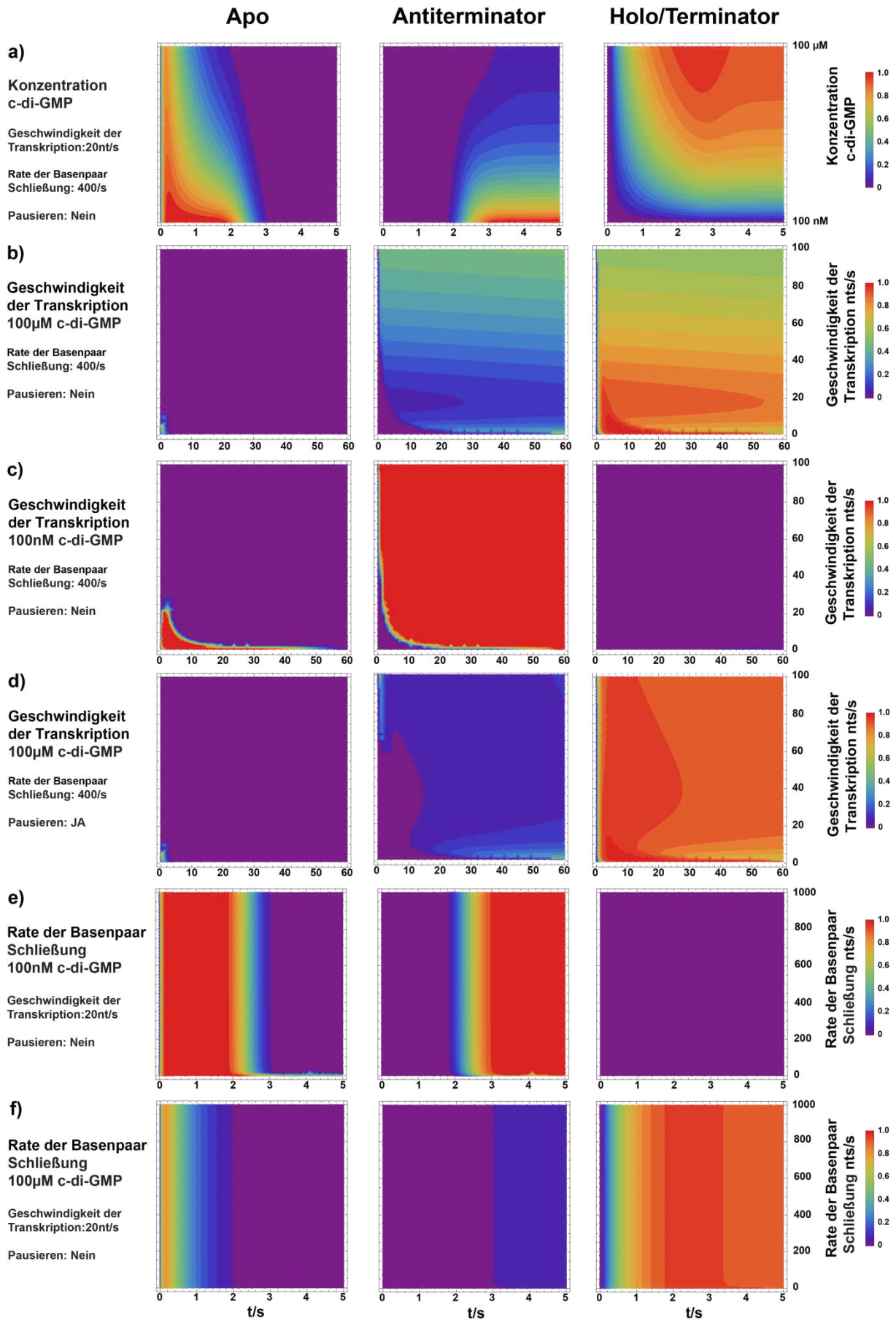


Abbildung 34: Höhenliniendiagramme der co-transkriptionellen Markov-Simulationen am Cd1 Riboschalter. Die relativen Populationen der drei Faltungszustände sind in 5 % Schritten von Violett nach Rot dargestellt. Die Population der Makrozustände Apo, Holo/Terminator und Antiterminator wurden aus allen Längen an RNS zusammenaddiert die sich zum entsprechenden Zeitpunkt im entsprechenden Makrozustand befanden. Als Endpunkt der Simulationen wurde der Zeitpunkt gewählt, bei dem Cd1-160 vollständig populiert war. In den Simulationen wurde, wenn nicht als variabler Parameter benutzt, eine Geschwindigkeit der Transkription von 20 nt/s, eine Rate der unkompetitieren Basenschließung von 400 nt/s und eine c-di-GMP Konzentration von 100 μ M oder 100 nM angenommen. In **a)** wurde simuliert, wie der Riboschalter funktioniert, wenn c-di-GMP Konzentration von 100 nM bis 100 μ M vorliegen. In **b)-d)** wurde der Einfluss der Transkriptionsgeschwindigkeit auf die Schaltung simuliert, in b) bei 100 μ M in c) 100 nM und in d) bei 100 μ M und 10 s Pausieren der Transkription. In **e)** und **f)** wurde überprüft, ob die Wahl von einer Rate der unkompetitieren Basenschließung von 400 nt/s Einfluss auf das Modell nimmt ¹⁹⁵.

Das beobachtete Verhalten unter verschiedenen c-di-GMP Konzentrationen lässt sich durch einige Eigenschaften des Cd1-Riboschalters erklären. Ab Cd1-87 ist c-di-GMP Bindung möglich, was zu einer raschen Populierung von Holo bei hohen c-di-GMP Konzentrationen führt. Diese erzeugt eine vorgezogene maximale Population des Holo/Terminatorzustandes, bevor sich überhaupt Terminatorstamm oder AT-Stamm falten können. Dieser Vorsprung reicht aus, um Holo/Terminator kaum an Population verlieren zu lassen, bis Übergänge zwischen den Makrozuständen aufgrund der hohen Anzahl an zu brechenden Basenpaaren sehr unwahrscheinlich werden. Dass sich bei hohen c-di-GMP Konzentrationen überhaupt noch AT-Stamm bildet, ist auf die hohe Rate für unkompetitierte Basenpaarschließung zurückzuführen. Diese wurde als 400 nt/s angenommen, was Größenordnungen über den Raten eines Zustandes liegt bei dem nur 1 Basenpaar gebrochen werden muss. Letztere Übergangsrate beträgt ca. 2,5 nt/s. Die hohen Übergangsraten von 400 nt/s werden vom AT-Zustand ausgenutzt, da sie die Faltung der ersten Haarnadelstruktur (134-137) des AT-Stammes durch die Nukleotide im Abschnitt T beschreibt. Dadurch kann auch aus hoher Holo/Terminator Population noch etwas AT-Zustand entstehen und bei niedrigen c-di-GMP Konzentrationen 100% AT.

Um abzuschätzen in wie weit die Rate für unkompetitierte Basenpaarschließungen das Modell beeinflusst, wurden die in Abb. 34 e) und f) gezeigten Rechnungen durchgeführt. Dabei zeigt sich, dass sowohl bei c-di-GMP Konzentrationen von 100 nM als auch bei 100 μ M nur sehr kleine Raten unter 50 nt/s einen Einfluss auf das Modell besitzen. Bei Raten für unkompetitierte Basenpaarschließungen kleiner 50 nt/s kommt es bei 100 nM c-di-GMP zu einer, im Vergleich zu 400 nt/s, verspäteten Bildung des AT-Zustands. Bei 100 μ M c-di-GMP Konzentration kann bei Raten unter 50 nt/s eine längere maximale Population des Holo/Terminator Zustands beobachtet werden. Zwischen 50 nt/s und 1000 nt/s ist kein Unterschied in der Entwicklung der einzelnen Makrozustände festzustellen. Auch wenn Messungen in der Literatur wesentlich höhere Raten im ns Bereich¹³⁹ festgestellt haben, zeigt das Modell, dass der Cd1-Riboschalter auch mit wesentlich kleineren Raten funktionieren würde. Aus diesem Verhalten des Modells wurde geschlossen, dass 400 nt/s (2,5 ms) ein guter Wert für die Raten für unkompetitierte Basenpaarschließungen ist.

Wie schon in der Bezeichnung transkriptioneller Riboschalter angedeutet, ist die Funktion eines transkriptionellen Riboschalters von der Geschwindigkeit der Transkription abhängig. In den Modellrechnungen wurde eine Transkriptionsrate von 20 nt/s angenommen, da sich diese Rate im Bereich von bekannten bakteriellen RNS Polymerasen befindet^{132,200-202}. Die native Transkriptionsgeschwindigkeit der RNS-Polymerase in *C. Difficile* ist unbekannt. Daher wurde eine Simulation von Transkriptionsgeschwindigkeiten von 2 bis 100 nt/s durchgeführt, um die Auswirkungen der Transkriptionsgeschwindigkeit auf die Regulation des Cd1-Riboschalters abschätzen zu können.

In Abb. 34 c) wurde die Transkriptionsgeschwindigkeit bei 100 nM c-di-GMP simuliert. Dabei ist zu erkennen, dass unter 20 nt/s das Schalten von Apo in AT verzögert ist. Ansonsten sind keine Auswirkungen auf die Regulation zu beobachten. Aus 100 % Apo wird 100 % AT, und es entsteht kein Holo/Terminator Zustand.

Anders läuft es im Fall einer hohen c-di-GMP Konzentration. In den Simulationen in Abb. 34 b) ist das Holo/Terminator Maximum von 95 % unter 20 nt/s deutlich länger präsent und erhöht sich sogar auf 100 % bei Transkriptionsgeschwindigkeiten unter 10 nt/s, da durch die langsame Verlängerung mehr Zeit ist, c-di-GMP zu binden. Gleichzeitig sorgt diese Langsamkeit aber auch dafür, dass sich ein Gleichgewicht zwischen AT und Holo/Terminator einstellt. So sind die beiden Zustände bei 2 nt/s Transkriptionsgeschwindigkeit annähernd zu 50% populiert. Oberhalb von 30 nt/s Transkriptionsgeschwindigkeit verschwindet zunehmend das Holo/Terminator Maximum. Ab diesem Punkt gibt es kein Holo/Terminator Maximum mehr, das noch Population an AT abgibt. Es wird nur noch Holo/Terminator beziehungsweise AT aufgebaut und die erreichte Population ist dann über den Zeitraum der Simulation stabil. Des Weiteren ist zu beobachten, dass sich die Populationen von AT und Holo/Terminator immer weiter angleichen bis sie schließlich bei 100 nt/s Transkriptionsgeschwindigkeit annähernd die gleiche Population von 50% besitzen. Dieses Verhalten in der Populationsverteilung ist sicher nicht ganz unerwartet, da zu schnelle Transkriptionsgeschwindigkeiten transkriptionale Riboschalter immer stören müssen, da irgendwann die Zeiträume bis der Entscheidungspunkt erreicht wird zu klein werden, um noch rechtzeitig Umfaltungen oder Ligandenbindung zu vollziehen.

Ein Mechanismus der von Riboschaltern genutzt wird um zu schnelle Transkription zu umgehen, ist das Pausieren der RNS Polymerase. An dedizierten Pausierstellen, die oft aus uridinreichen Sequenzen bestehen, kann die RNS-Polymerase für mehrere Sekunden verweilen^{116,117}. Cd1 besitzt in der Theorie eine solche Sequenz in den Basen U141-145, direkt vor dem Punkt der Entscheidung bei Cd1-148. Die Auswirkungen dieser potenziellen Pausierstelle bei 100 μ M c-di-GMP und verschiedenen Transkriptionsgeschwindigkeiten, sind in Simulation d) in Abb. 34 dargestellt. Um den Austrittstunnel der RNS-Polymerase zu berücksichtigen, wurde in der Simulation bei U135 für 10 s in der Transkription pausiert. So konnte ein 10 Nukleotide langer Austrittstunnel und das Pausieren simuliert werden, obwohl das Pausieren eigentlich bei U145 stattfinden sollte. Unter einer Transkriptionsgeschwindigkeit von 20 nt/s ergibt sich auch mit Pausieren dasselbe Verhalten wie in b), da hier die Transkriptionsgeschwindigkeit einfach zu langsam ist, als dass Pausen eine Wirkung haben könnten. Von 20 nt/s bis 100 nt/s ändert sich das Verhalten aber weitreichend. Es gibt ein konstantes Maximum von 95 % Holo/Terminator das bis 90 % abfällt. Diesem Holo/Terminator-Maximum geht bei Transkriptionsgeschwindigkeiten über 70 nt/s ein Anstieg des AT-Zustands von bis zu 40 % voraus. Dieses AT-Hoch wird nach ca. 5 s erreicht, wird aber wieder in das 95 % Holo/Terminator-Maximum abgebaut. Dadurch wird gezeigt, dass auch bei den hohen 400 nt/s Raten, wie sie beim Pausieren für die Längen 134 und 135 vorliegen, Holo/Terminator über die Zeit die bevorzugte Population ist. Insgesamt lässt sich durch die Simulationen der Makrozustandsverteilung in Abhängigkeit zur Transkriptionsgeschwindigkeit feststellen, dass Transkriptionsgeschwindigkeiten von 20 nt/s in einem Bereich für maximale Schaltungseffizienz liegen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Cd1-Riboschalter über einen weiten c-di-GMP Konzentrationsbereich schalten kann und die Effizienz der Schaltung bei hohen Ligandkonzentrationen, gekoppelt mit hohen Transkriptionsgeschwindigkeiten, stark abnimmt. Diese Abnahme an Effizienz kann durch das Nutzen der potentiellen Pausierstelle bei U141-145 umgangen werden, so dass Cd1 zwischen 20 nt/s und 100 nt/s Transkriptionsgeschwindigkeit zu 90 % schalten kann.

3.4 Ausblick

Mit den Messungen am Cd1-Riboschalter konnte die Sekundärstruktur der Aptamerdomäne aufgeklärt und bestätigt werden. Als essenzielle Interaktionen für die Stabilität der Ligandbindung konnten zwei Tertiärinteraktionen zwischen P2 und P3-Stamm sowie eine Basenpaarung zwischen c-di-GMP und C87 nachgewiesen werden. Um die Struktur des Aptamers weiter vertiefend zu verstehen bedarf es entweder einer NMR-Strukturrechnung oder einer direkten Strukturaufklärung durch eine Röntgenkristallstruktur oder Cryo-Elektronenmikroskopie. Für die NMR-Strukturrechnung wäre eine weitere Zuordnung des gesamten NOESY Spektrums, besonders der Aromaten und Zucker Protonen, nötig. Dies könnte durch den Einsatz selektiv $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierter Proben oder den Einsatz von atomspezifischen 2D/3D Pulssequenzen²⁰³ für kurze Konstrukte wie Cd1-88 erreicht werden. Zurzeit dominieren Röntgenkristallstruktur immer noch in der Zahl gelöster Strukturen von Proteinen und RNS. Das Hauptproblem ist dabei nicht das Lösen einer gemessenen Kristallstruktur, sondern einen Einkristall des zu messenden Biomoleküls in ausreichender Größe und Qualität herzustellen. Die Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen kann oft Monate bis Jahre dauern, wobei auch hier durch Screeningansätze Fortschritte gemacht werden. Das erlangte Verständnis über den Magnesiumbedarf und die stabilisierende Wirkung von c-di-GMP kann bei der Suche nach der idealen Kristallisationsbedingung helfen. Ob Cryo-Elektronenmikroskopie bei der Strukturaufklärung des Cd1-Riboschalters weiterhelfen kann bleibt fraglich, da bereits Proteine unter 100 kDa als fast zu klein für die Methode gelten²⁰⁴. Eine mögliche schnelle Experimentierreihe ist die Untersuchung der Mutationen G11A und G11C in Kombination mit Mutationen an G87 auf das Bindungsverhalten zu anderen cyclischen-Dinukleotiden mittels NMR 1D Titrations und ITC. Eine zentrale Frage zur Funktionsweise des Cd1-Riboschalters besteht nach dieser Arbeit leider immer noch. Warum ist der Antiterminator- nur transient stabil und der Terminatorstamm langfristig immer bevorzugt, obwohl dieser in der Sekundärstruktur weniger Basenpaare besitzt. Diese Frage würde sich wahrscheinlich nur durch Strukturaufklärung des gesamten Riboschalters oder eines stabilisierten Antiterminatorkonstruktes beantworten lassen. Mit dem Wissen um diese Zusammenhänge könnten dann gezielt fotogeschützte AT-Konstrukte hergestellt werden, mit denen der zeitliche Verlauf der AT Faltung und die Umfaltung in den Terminator beobachtet werden kann. An dieses Projekt wurde sich gut eine Untersuchung, mittels zeitlich aufgelöster Transkription¹¹⁶ anschließen. So könnte überprüft werden, ob die Pausierstelle U141-145 tatsächlich von einer RNS-Polymerase genutzt wird. Eine weitere Möglichkeit das kinetische Modell des Cd1-Riboschalters zu verbessern, besteht in der Nutzung von fotoschaltbaren c-di-GMP. An der Synthese dieser Moleküle wird bereits in der Arbeitsgruppe gearbeitet. Diese würden es ermöglichen, Bindungszeiten und Faltungsraten voneinander zu trennen und genau zu bestimmen. Dabei sollte wahrscheinlich auf flussunterbrechende Analysemethoden zurückgegriffen werden, da der hohe Magnesium Bedarf für direkte kinetische Messungen mittels NMR zum Problem werden kann.

4 ¹⁹F Ligandenscreening²⁰⁵

4.1 Screening und RNS Bibliothek

Die meisten molekularen Ziele von Medikamenten sind Proteine. RNS hingegen spielt bisher nur bei Antibiotika eine Rolle, die die Interaktion zwischen RNS und Proteinen im Ribosom stören²⁰⁶. Zeitweise galt RNS, da sie nur aus vier unterschiedlichen Basen besteht, als unmögliches Ziel für Medikamente. Da allerdings immer mehr über die komplexen Regulationsprozesse, in die die RNS involviert ist, bekannt wird, gilt RNS mittlerweile als lohnendes und notwendiges Ziel für die Medikamentenentwicklung²⁰⁷. Um ein Medikament zu entwickeln, gibt es verschiedene Ansätze. Die direkteste Methode ist die strukturbasierte Medikamentenentwicklung. Diese basiert auf einem genauen Kenntnis der Bindungstasche, für die ein Binder entwickelt werden soll. Allerdings ist es herausfordernd und zeitaufwändig, diese Bindungstellen zu identifizieren, und es ist auch mit vielen Versuchen verbunden, einen guten Liganden für eine Bindetasche zu entwickeln. Der komplette Gegensatz zu einer zielgerichteten Entwicklung ist ein Hochdurchsatzscreening mit einer Ligandbibliothek. In diesen Screenings werden Hunderttausende von bekannten Substanzen auf Bindung zu einem Ziel getestet. Die besondere Herausforderung hierbei ist die Zusammenstellung von Stoffmischungen oder Strategien, mit denen möglichst viele Stoffe auf einmal getestet werden können, da eine Eins zu Eins Analyse jeden zeitlichen Rahmen sprengen würde. Dabei müssen die einzelnen Komponenten aber noch analytisch differenziert werden können, um die spätere Identifizierung der Binder zu ermöglichen. Die Verbindung von Hochdurchsatzscreening und zielgerichteter Medikamentenentwicklung ist die fragmentbasierte Bindersuche. Hierbei wird ebenfalls mit Stoffmischungen gearbeitet, die auf Bindungskompetenz gegen ein Ziel getestet werden. Diese Stoffe sind aber kleinere Verbindungen (Fragmente), die sich leicht zu Molekülen auf Medikamentengröße erweitern lassen. Werden Fragmente gefunden, die das Ziel annehmbar binden, werden diese gezielt synthetisch erweitert, in der Hoffnung, die Affinität gezielt steigern zu können und dabei die Zielspezifität des Fragments zu erhalten.

In diesem Projekt wurde ein Fragment screening mit 101 Fragmenten, die alle ein oder mehrere ¹⁹F Atome besaßen, durchgeführt. Ziel des Screenings war es, zu zeigen, dass mit der Methode Fragmente gefunden werden können, die RNS spezifisch binden, ohne gleichzeitig auch an DNS, Proteine oder andere RNS zu binden. Dazu wurden 14 RNS zusammengesetzt aus einem Riboswitch, sechs Aptameren, zwei Expressionsplattformen, zwei Haarnadelschleifen, zwei Ribozymen und einer tRNS auf Bindung zu Substanzbibliothek durchgetestet. Als Vergleich wurden 5 DNS und 5 Proteine mit einer Masse von 18-100 kDa auf Bindung zu den gleichen Fragmenten überprüft. Die 101 Fragmente wurden in vier Mischungen aus 20 und eine aus 21 Substanzen aufgeteilt (Abb. 35).

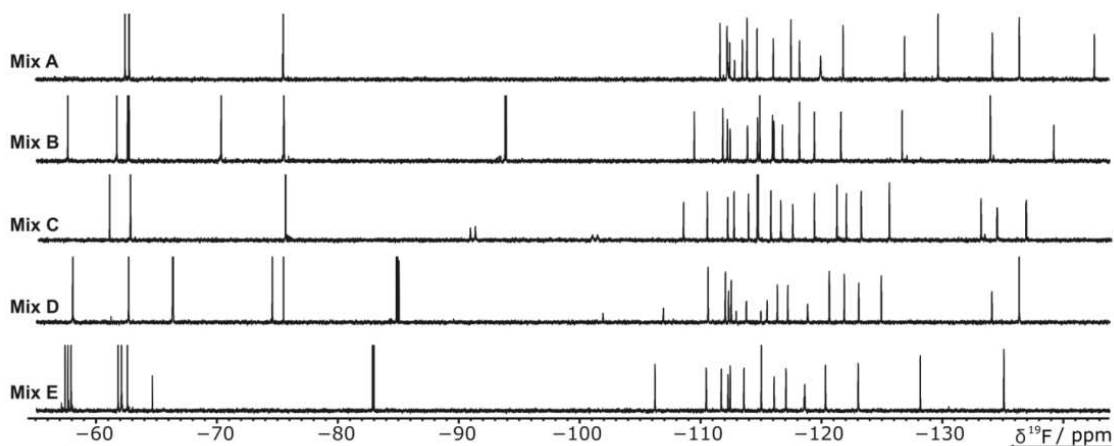


Abbildung 35: ¹⁹F NMR 1D der fünf Mixturen aufgenommen in Screening Puffer bei 600 MHz mit 1H Entkopplung und Wasserunterdrückung. Abbildung entnommen aus Binas et. al 2021²⁰⁵.

Vor dem Zusammenstellen der Mischungen wurde überprüft, dass die ^{19}F Signale der einzelnen Substanzen sich im NMR ^{19}F -1D möglichst wenig überlagern, gezeigt wird dies in Abb. 111. ^{19}F NMR eignet sich für eine solche Anwendungen besonders gut, da ^{19}F Resonanzen über ca. 100 ppm verteilt sind, während bei ^1H nur 15 ppm Spektralbreite zur Verfügung stehen. Alle Ergebnisse sind in Binas et. al. 2021²⁰⁵ zu finden. Im Folgenden werden nur die Ergebnisse für Cd1-98 diskutiert.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 RNS Herstellung

Die RNS Cd1-98 wurde mit derselben Methodik wie in Abschnitt 2.2 beschrieben hergestellt.

4.2.2 NMR Proben Zusammensetzung

Die Screeningproben wurden jeweils in zwei Varianten hergestellt einmal mit und einmal ohne RNS. Dabei wurde darauf geachtet, dass alle Komponenten außer der RNS in jeder Probe die gleiche Konzentration besaßen, sodass die Probe ohne RNS als Referenz benutzt werden konnten. Die Fragmentmischungen enthielten 2,5 mM jedes einzelnen Fragments, gelöst in 90 %-d₆-DMSO und 10 % D₂O. Diese Fragmentmischungen wurden zu den Proben so hinzugegeben, dass in den finalen Proben entweder 50 μM RNS und Fragment im 1 zu 1 Verhältnis oder nur eine Mischung ebenfalls mit 50 μM Konzentration pro Fragment vorhanden war. Weiterhin enthielt jede Probe final den Screeningpuffer bestehend aus 25 mM KPi, pH 6.2, 50 mM KCl und 5 mM MgCl₂ gelöst in 94 % H₂O / 5 % D₂O / 1 % d₆-DMSO. Die Proben hatten ein Volumen von 170 μL pro 3mm Röhrchen.

4.2.3 T₂-Relaxationsmessungen und Auswertung

Bei der CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) Pulssequenz wird die Magnetisierung mit einem 90 ° Puls erzeugt. Anschließend folgte ein Spinecho-Element bestehend aus 9 ms-180 ° Puls- 9 ms. Die Spinecho-Sequenz wird so oft wiederholt, bis eine bestimmte Zeit erreicht ist. Für dieses Screening wurden CPMG Zeiten von 0, 200 und 400 ms verwendet. Die große spektrale Breite der ^{19}F -Resonanzen stellt für dieses Experiment eine Herausforderung dar, da ein 180 ° Puls über 90 ppm Breite gewährleisten muss. Zu diesem Zweck wurde ein adiabatischer WURST Puls mit einer Bandbreite von 120 ppm und einer Länge von 2 ms eingesetzt. Alle CPMG Messungen wurden an einem Bruker AVIIIHD-600 NMR Spektrometer, ausgestattet mit einem fünf mm $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ [^{13}C , ^{15}N]-TCI prodigy Cryo-Probenkopf, durchgeführt. CPMG Experimente dienen eigentlich der Bestimmung der T₂-Relaxationszeit, sind aber für das Screening speziell von Makromolekülen geeignet. Da die T₂-Relaxationszeit vor allem von der Masse und Form eines Moleküls abhängt, ändert sich bei der Bindung eines kleinen Fragments an ein im Vergleich riesiges Makromolekül dessen T₂-Relaxationszeit drastisch. Diese Änderung in der T₂-Relaxationszeit sorgt für einen Signalverlust im ^{19}F Fragment Spektrum, da sich das Fragment nun langsamer dreht und somit schneller relaxiert.

Um alle quantitativen Aussagen darüber treffen zu können, ob ein Fragment ein Binder oder kein Binder ist, wurden die Signale jedes CPMG Experimentes in Topspin 4.0 integriert und die Integrale miteinander verglichen. Als entscheidende Größe dieses Vergleichs wurde der Quotient Q^{Bindung} definiert.

$$Q^{\text{Bindung}} = \frac{\text{Intensitäts Quotient}^{+\text{Ziel}}}{\text{Intensitäts Quotient}^{-\text{Ziel}}} \quad \text{Intensitäts Quotient} = \frac{\text{Signalintegral}^{\text{CPMG}(200\text{ms})}}{\text{Signalintegral}^{\text{CPMG}(0\text{ms})}}$$

Nach der automatischen Auswertung über Q^{Bindung} wurden die gefundenen Binder und von der Auswertung gemeldete Fehler noch einmal manuell überprüft. Weitere CPMG Messungen wurden

mit 0, 50, 100 und 200 ms durchgeführt um die Verdrängung des Binders durch den natürlichen Liganden c-di-GMP zu beobachten.

4.3 Ergebnis und Diskussion

Für die initiale Bestimmung der Bindung von Fragment und RNS wurde ein CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill)-Experiment eingesetzt. Die Messungen bei 0 und 200 ms CPMG-Zeit wurden tabellarisch verglichen und über Q^{Bindung} potenzielle Binder ermittelt. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Abb. 36 zusammengefasst. Insgesamt wurden 9 Fragmente gefunden, die an Cd1-98 binden. Bei diesen 9 Fragmenten fällt auf, dass sie zu großen Teilen ein weitverzweigtes π -Elektronensystem besitzen. Daraus folgt, dass die Moleküle größtenteils planar sind. Ausnahmen finden sich nur in Fragment 7 und 75 bei denen die eine Hälfte des Moleküls nicht aromatisch ist. Eine weitere Eigenschaft in allen Fragmenten außer 7 ist das Vorhandensein mindestens einer Aminogruppe im Molekül. Die Kombination aus planaren Molekülen mit Aminogruppen lässt vermuten, dass die Hauptinteraktion zwischen Cd1-98 und den Fragmenten aus einer Interkalation oder Stapelung des Fragments zwischen oder an die Nucleobasen besteht, stabilisiert durch Wasserstoffbrücken über die Aminogruppen. Um die Stellen an Cd1-98 zu identifizieren, an denen die einzelnen Fragmente binden und den K_D abschätzen zu können, wurden $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -SFHMQC Spektren gemessen. Auf diese Weise wird die RNS direkt gemessen und eventuelle Änderungen an der Sekundärstruktur durch bindende Fragmente sollten über die beobachteten Iminoprotonen gut sichtbar werden. Tatsächlich ist bei keinem der Binder in der Iminoregion eine signifikante Änderung im Spektrum zu erkennen. Das gleichbleibende Signal in der Iminoregion ist in Abb. 37 a) und c) exemplarisch für Fragment 75 dargestellt. Es gibt tatsächlich nur eine einzige Veränderung, die mit Zugabe der Binder in den $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -SFHMQC Spektren festzustellen ist. Bei Binderzugabe taucht ein neues Signal bei 10,68/145,5 ppm auf. In dieser Region sind normalerweise Signale zu finden, die von Hoogsteen Basenpaaren stammen. Da dieses Signal allerdings für alle Binder bei den gleichen Verschiebungen auftaucht, ist davon auszugehen, dass es sich nicht um ein spezifisches Signal handelt. Welches Atom oder Molekül dieses Signal verursacht, konnte nicht abschließend geklärt werden. Um doch noch etwas über die Bindung der Fragmente an Cd1-98 zu lernen, wurden Verdrängungsexperimente mit dem natürlichen Ligand c-di-GMP für die Fragmente 9, 47 und 75 durchgeführt. Die Ergebnisse dieser ^{19}F Verdrängungsexperimente sind in Abb. 38 dargestellt. Bei allen drei Fragmenten ist auffällig, dass bei 0 ms CPMG die Intensität des ^{19}F Signals durch die Zugabe von c-di-GMP erhöht wird. Dieser Effekt könnte daher kommen, dass die Fragmente schwächer an die RNS binden und als freies Molekül schneller rotieren können und so ein schärferes Signal geben. Betrachtet man jedoch die Intensitäten von Puffer+ Mix (Türkis) und RNS + Mix (Gelb) in Abb. 36 fallen keine so signifikanten Intensitätsunterschiede auf, wie sie z. B. in Abb. 38 für Fragment 47 zu sehen sind. Daraus ist zu schlussfolgern, dass der Intensitätsunterschied durch die Zugabe von c-di-GMP nicht nur auf frei werdendes Fragment zurückzuführen ist. Die wahrscheinlichste Ursache für die Erhöhung der Signalintensität bei c-di-GMP Zugabe ist, dass dadurch die Konformation des Aptamers stabiler, homogener und komprimierter wird. Die Komprimierung der Konformation sorgt für eine schnellere Rotation. Homogenisierung und Stabilisierung sorgen für mehr gleichförmige Bindestellen, was insgesamt zu einer Signalerhöhung für die Fragmente sorgt. Es liegt ein schnellerer Austausch vor und die gebundene Komponente ist im Vergleich zur Probe ohne c-di-GMP weniger stark verbreitet. Für Fragment 9 und 75 kann diese Kombination die Signalerhöhung bei c-di-GMP Zugabe erklären, die annähernde Verdopplung bei 47 bleibt damit aber unbeantwortet. Um etwas über den Bindungsmodus der einzelnen Fragmente zur RNS zu erfahren, wurden die Intensitätsquotienten der Messungen 0 ms und 200 ms in % umgerechnet und miteinander verglichen. Für Fragment 9 ergab sich eine Rückgewinnung des Signals bei 200 ms CPMG von 16 % ohne und 17 % mit c-di-GMP. Die Auswertung von 75 ergab eine Rückgewinnung des Signals bei 200 ms CPMG von 0,00 % ohne und -0,01 % mit c-di-GMP.

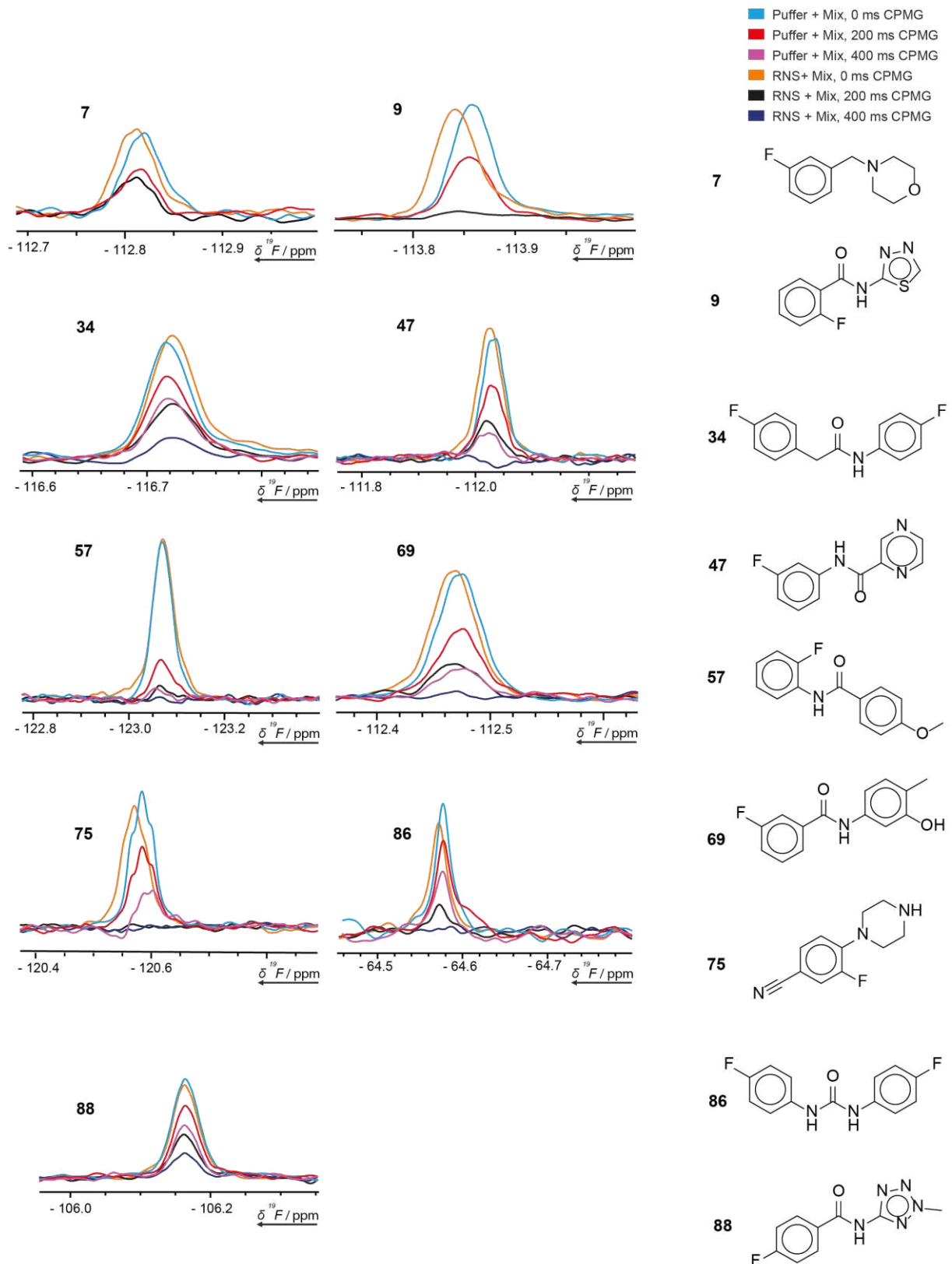


Abbildung 36: Ausschnitte aus den CPMG Spektren der gefundenen Binder für Cd1-98. Gezeigt sind die Spektren von RNS und Fragment sowie Fragment in Puffer bei 0, 200 und 400 ms CPMG Zeit. Über die Zahlen sind die jeweiligen Fragmente den einzelnen Experimenten zugeordnet. Abbildung entnommen aus Binias et. al 2021²⁰⁵.

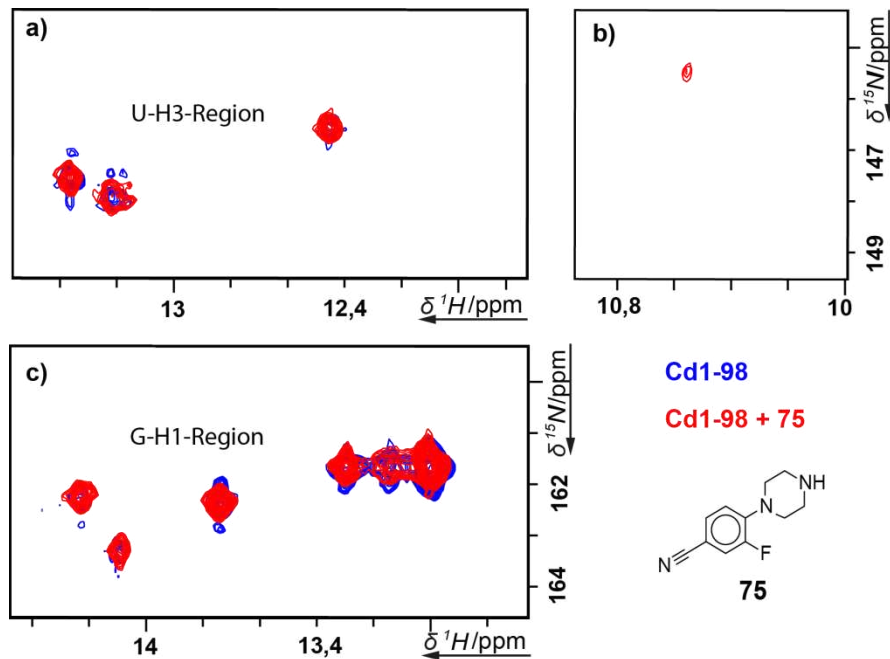


Abbildung 37: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -sfHMQC Spektrum von Cd1-98 mit (Rot) Fragment 75 und ohne (Blau.). In **a**) ist die Überlagerung der U H3 Region gezeigt. In **b**) ist die Region gezeigt in der typischerweise Signale für Hoogsteen Basenpaare auftauchen. In **c**) ist die Überlagerung der G H1 Region gezeigt.

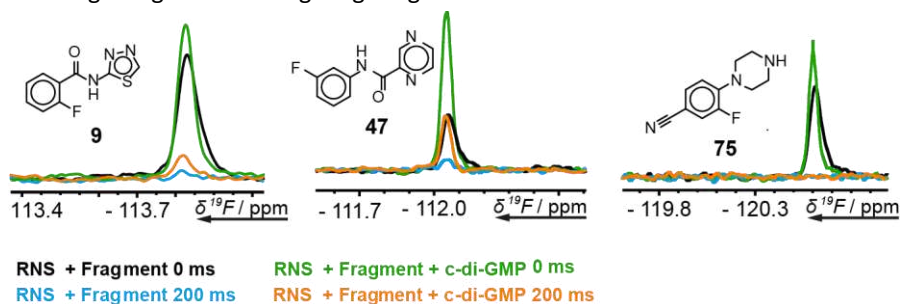


Abbildung 38: Ausschnitte aus den CPMG Spektren der durchgeführten Verdrängung der Fragmente 9, 47 und 75 durch c-di-GMP. Abbildung entnommen aus Binas et. al 2021²⁰⁵.

Bei Fragment 47 ergaben sich tatsächlich Unterschiede. Die Rückgewinnung des Signals bei 200 ms CPMG liegt bei 18 % ohne und 33 % mit c-di-GMP. Aus diesen Vergleichen kann geschlossen werden, dass c-di-GMP für 75 und 9 die Bindung des Fragments nicht beeinflusst. Da bei Fragment 47 die prozentuale Rückgewinnung an Signal mit c-di-GMP Zugabe steigt, wird durch die Umfaltung der Aptamerdomäne die Bindung von 47 gestört. Da bei keinem der Fragmente annähernd eine vollständige Rückgewinnung des Signals stattfindet, kann mit Gewissheit gesagt werden, dass diese nicht direkt in die Bindetasche für c-di-GMP gebunden werden. Dieses wäre mit Sicherheit der Fall, da c-di-GMP mit einem nM K_D gebunden wird und der K_D der Fragmente höchstens, ausgehend von den nicht vorhandenen Verschiebungen im $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -SFHMQC, im mM Bereich liegen sollte.

5 Licht geschalteter RNA Doppelstrang

5.1 Lichtschaltung in biologischen Systemen

Schaltbarkeit durch Licht wird in DNS/RNS Systemen durch das Anbringen von lichtschtbaren Modifikationen in der Nukleinsäuresequenz erreicht. Diese Modifikationen werden üblicherweise entweder an der Nukleobase angebracht oder ersetzen ein komplettes Nukleotid. Durch Licht schaltbare Modifikationen existieren in zwei Varianten, reversibel und nicht reversibel schaltbar.

Nicht reversibel schaltbare Modifikationen werden durch Bestrahlung mit Licht mit einer spezifischen Wellenlänge von der Nukleinsäure abgespalten²⁰⁸. Der Vorteil des irreversiblen Abspaltens besteht darin, dass zu 100 % ein geschalteter und ein ungeschalteter Zustand erzeugt werden können, was in einer maximalen Differenz in vergleichenden Messungen resultiert. Der Nachteil des irreversiblen Abspaltens besteht darin, dass die Fotogruppe abgespalten wird. Die frei werdenden Moleküle können potentiell mit der geplanten Reaktion interferieren oder im biologischen Kontext toxisch wirken. In Abbildung 39 ist eine Übersicht der bereits im biologischen Kontext verwendeten, durch Licht absplaltbare Schutzgruppen zu finden^{209–217}.

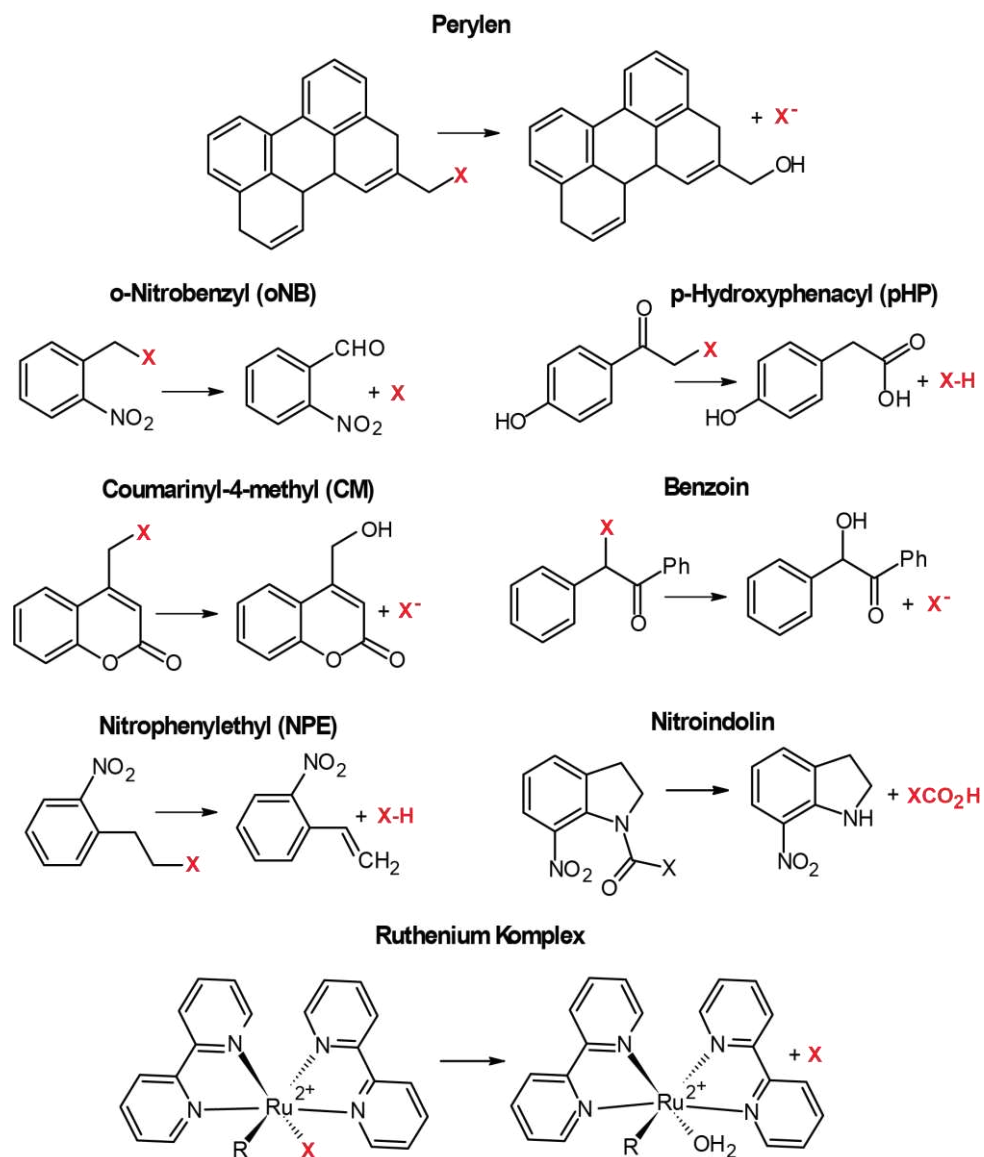


Abbildung 39: Übersicht der im biologischen Kontext gängigen fotolabilen Schutzgruppen vor und nach Bestrahlung mit Licht. Mit X ist die Position der zu entschützenden funktionellen Gruppe markiert.

Reversible Modifikationen werden mit bistabilen Molekülen durchgeführt, die durch Bestrahlung mit Licht einer jeweils spezifischen Wellenlänge zwischen zwei Konformationen hin und her geschaltet werden können. Die Reversibilität bietet den Vorteil, dass Experimente mit Lichtschaltung wiederholt werden können. Das kann dazu genutzt werden, Hin- und Rückweg der zu erforschenden Reaktion zu vermessen, oder das Signal zu Rauschen Verhältnis des Experiments zu verbessern²¹⁸. Diese Schaltbarkeit wird allerdings mit Nachteilen erkauft. Durch Licht schaltbare Reste müssen fest in das Zielmolekül eingebaut werden. Eine Ausnahme von dieser Regel kann erreicht werden, indem fotoschaltbare Moleküle als Ligand für künstliche RNS Riboschalter²¹⁹ oder als Interkalatoren²²⁰ verwendet werden. Allgemein muss aber im Vorfeld einer Messung erst einmal sichergestellt werden, dass eine durch Licht schaltbare Modifikation das zu untersuchende System nicht oder nur minimal stört. Gleichzeitig muss gewährleistet sein, dass durch die Schaltung eine maximierte natürliche Änderung des zu untersuchenden Systems erfolgt²²¹. Des Weiteren kann bei keinem Fotoschalter eine 100% Umwandlung der Zustände ineinander erreicht werden. Diese Mischung der Zustände, gekoppelt mit einer potentiellen Reduzierung des Schaltungseffekts, kann es erheblich erschweren, ein System reversibel lichtschaltbar zu machen²²¹.

Die Modifikation von biologischen Systemen hin zur Schaltbarkeit durch Licht kann für die Forschung und Therapeutik drei besondere Vorteile bieten: eine exakte Kontrolle über Zeitpunkt und räumliche Position einer Reaktion, sowie ein externes Signal, das bei Wellenlängen größer als 350 nm ohne Schaden an Probe oder Gewebe eingesetzt werden kann^{218,222}. Die Möglichkeit, Reaktionen zu einem exakten Zeitpunkt zu starten oder zu beenden, wird vor allem in kinetischen Messungen zur Aufklärung von Reaktionsmechanismen sowie Faltungswegen von DNS/RNS^{223,224} und Proteinen²²⁵ genutzt, da hier ein synchronisiertes System mit einem genauen Startpunkt der Messung sehr vorteilhaft ist, um Messungen gut fitten und replizieren zu können. Weiterhin kann Licht verschiedener Wellenlängen, kombiniert mit unterschiedlichen durch Licht schaltbaren Resten, dafür genutzt werden, Reaktionen in Sequenzen zu manipulieren, was mit anderen externen Faktoren wie pH-Wert, Ionenkonzentration oder Temperatur schwieriger und unpräziser zu erreichen sein kann^{221,226}. Positionsspezifische Kontrolle kann die gezielte Aktivierung von z.B. Reaktionen in Abschnitten von Neuronen²²⁷ und Messungen in Gewebeschichten von lebenden Organismen²²⁸ in Tiefen von mehreren 100 µm^{229,230} ermöglichen. Eine weitere vielversprechende, in Entwicklung befindliche Anwendung von Positionskontrolle durch Licht besteht in der Verwendung von durch Licht geschalteten Medikamenten. Durch die gezielte Freisetzung am Wirkort sollen Nebenwirkungen reduziert werden, da Medikamente nicht über den gesamten Aufnahmeweg im Körper verteilt werden^{209,231}.

5.1.1 Licht gesteuerte Doppelstranghybridisierung

Das Auftrennen oder Zusammenfügen von DNS oder RNS Doppelsträngen stellt in der Biochemie der Nucleinsäuren einen wichtigen Stabilitätsfaktor dar. So kann DNS nur unter Aufspaltung des Doppelstrangs repliziert werden oder RNS nur durch das Zusammenfügen von zwei einzelsträngigen Abschnitten zu einer Helix falten. Um das Wechselspiel aus hybridisierten und enthybridisierten Nucleinsäuresträngen genau zu tarieren, werden in Lebewesen oft Helikasen für das Auftrennen von Doppelsträngen verwendet, da dies einen erheblichen Energieaufwand darstellt²³². Um das Auftrennen oder Zusammenfügen von Nucleinsäure-Doppelsträngen durch Licht zu bewerkstelligen, werden Fotomodifikationen bevorzugt an den Nucleotiden angebracht oder die Nucleobase direkt durch Fotoschalter ersetzt²⁰⁸. So können die Atome, die an der Basenpaarung beteiligt sind, direkt beeinflusst werden. Eines der zentralen Probleme dieser Art von Modifikationen ist, dass sich ihre Basenpaar unterbrechenden Effekte nur wenige Basenpaare weit entlang einer Helix auswirken. Mit einer Schaltung durch Licht kann es sehr aufwendig sein, große Abschnitte an DNS/RNS zu kontrollieren. Mit einer statistischen Modifikation des Phosphatrückgrats mit 4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl-Ethyl^{233,234} oder 6-Brom-7-Hydroxycumarin-4-Methyl²³⁵ konnten auch größere Abschnitte

an Nukleinsäure-Doppelsträngen durch Licht initiiert gezielt hybridisiert werden. Lichtschaltbare Modifikationen an den Nukleinsäuren scheinen sich daraus folgend eher für eine gezielte Regulation einer lokalen Struktur zu eignen. Um fotoschaltbare Nukleotide zu erzeugen, konnten bereits Stilebene²³⁶ und Azobenzole²²², unter Eliminierung eines der beiden Benzolringe an der zentralen Doppelbindung, an Nukleobasen substituiert werden. Hydrazone²³⁷, Azobenzole²³⁸, Azoheterone^{239,240} und Diarylethene²⁴¹ konnten ebenfalls erfolgreich in fotoschaltbaren Nukleotiden an der Nukleobase angebracht werden. Spiropyrane konnten an die Nukleobase gekoppelt werden, verlieren aber teilweise ihre Fähigkeit zum Fotoschalten oder werden nicht ausreichend vor der Hydrolyse durch Wasser geschützt²⁴¹. Durch Einbau in das Phosphatrückgrat können Spiropyrane ihre Eigenschaft als Fotoschalter behalten²¹⁸. Eine neue Generation an Spiropyranen (Py-BIPS) weisen allerdings keine Probleme mehr beim Schalten in Wasser auf²⁴². Eine Übersicht der bereits in biologischen Systemen eingesetzten Fotoschalter ist in Abb. 40 gegeben^{218,222,236,237,239,240,242,243}.

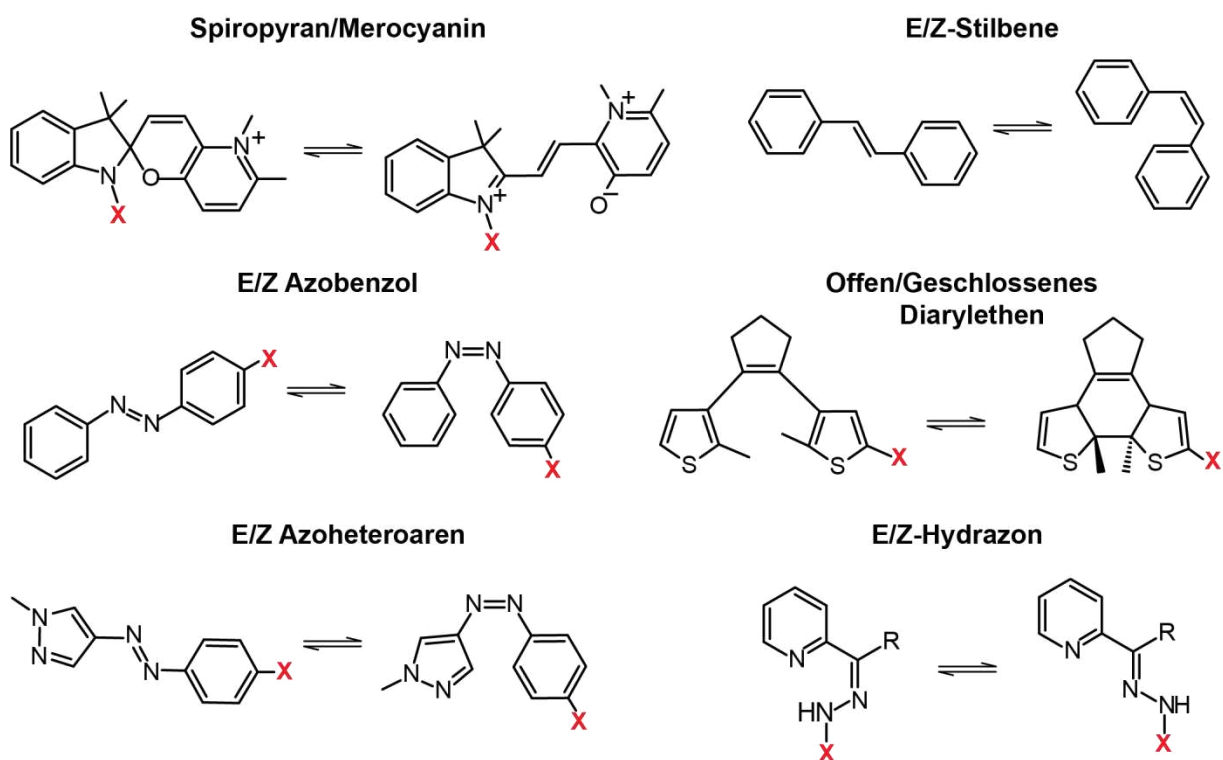


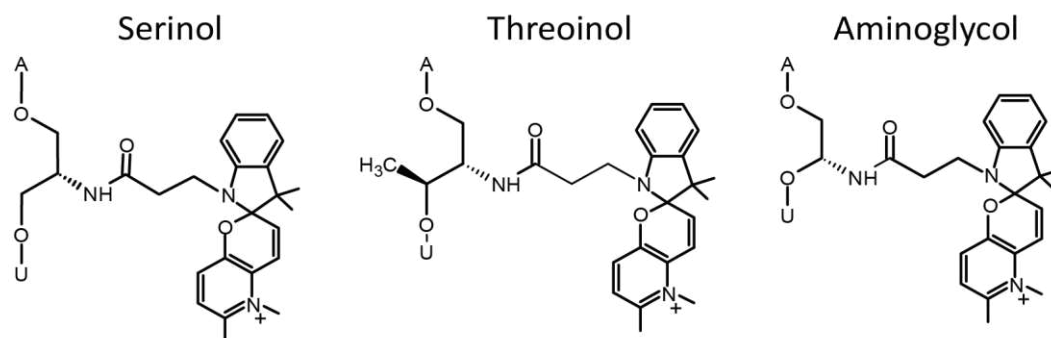
Abbildung 40: Beispiele von bistabilen Fotoschaltern die bereits in Kombination mit Nukleinsäuren verwendet wurden. Mit X ist eine der möglichen Positionen für die Anbringung der Fotoschalter markiert.

5.1.2 Projekt Übersicht

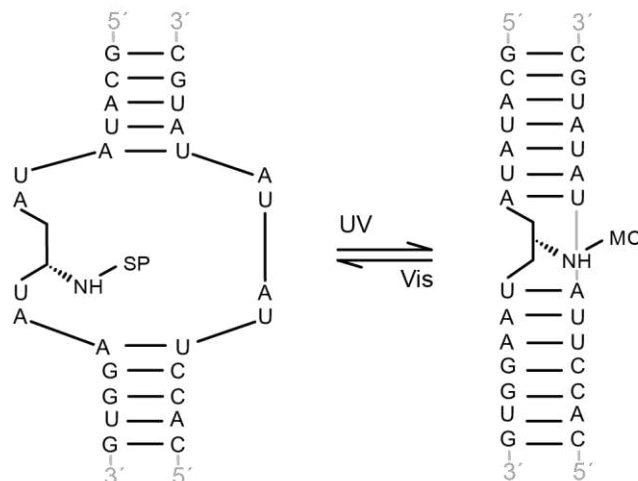
In diesem Projekt wurde geprüft in wie weit sich ein RNS Doppelstrang mit eingebautem Spiropyran durch Bestrahlung mit Licht, reversibel zu- oder entfalten lässt. Im RNS Strang mit eingebautem Fotoschalter nimmt dieser, zusammen mit dem Verbindungsstück zum Phosphatrückgrat der anderen Nukleotide, den Platz eines zusätzlichen Nukleotides ein. Daraus folgend besitzt der komplementäre Gegenstrang faktisch ein Nukleotid weniger. Durch dieses Design soll es ermöglicht werden, dass die Spiropyran-Form des Fotoschalters die Basenpaarung im unbelichteten Zustand stört, was eine komplette Hybridisierung der beiden RNS Stränge verhindern soll. Die planare Merocyanin-Form des Fotoschalters soll hingegen im bestem Fall in die RNS Helix interkalieren und es so ermöglichen, dass sich alle Basenpaare bilden können (Abb. 41 b). Im Rahmen dieses Projekts

wurden insgesamt drei Konstrukte darauf geprüft, ob sie sich durch Licht reversibel zu oder entfalten lassen. Dabei wurde das Verbindungstück zwischen zwei RNS Abschnitten variiert und RNS-Sequenz und Spiropyran jeweils beibehalten (Abb. 41 a). Um die gemessenen Daten mit einer ähnlichen, aber nicht durch ein großes starres Spiropyran gestörten RNS vergleichen zu können, wurde das Konstrukt in Abb. 41 c als Referenz genutzt. Die RNS-Sequenz (Abb. 41 b) wurde so gewählt, dass die G:C Basenpaare an den Enden die Helix wie Klammern zusammenhalten, während die schwächeren A:U Basenpaare in der Mitte der Helix eine Beeinflussung der Faltung durch den Fotoschalter erleichtern sollen. Als Fotoschalter wurde das Spiropyran Py-BIPS in die RNS eingebaut, um Schaltung in Wasser²⁴² zu ermöglichen.

a)



b)



c)

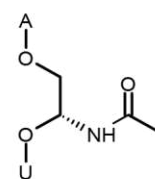


Abbildung 41: a) Die drei im Projekt verwendeten RNS Konstrukte benannt nach ihren Verbindungsstücken im Fotoschalter enthaltenem Strang. b) Die im Projekt verwendeten RNS-Sequenzen, zusammen mit dem erwarteten Effekt bei Bestrahlung mit Licht. c) Das Referenzkonstrukt für die Messungen.

5.2 Material und Methoden

5.2.1 RNS Synthese

Die fotogeschaltete RNS wurde über Festphasensynthese im Arbeitskreis Heckel von Josephin Karlstadt hergestellt. Zum Falten wurde die RNS für 5 min auf 95 °C erhitzt und dann für 10 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die RNS mit 6 volumenäquivalenten Aceton mit 2 v/v Lithiumperchlorat gefällt und über Nacht bei -20 °C gelagert. Die Fällung wurde bei 8000 g pelletiert und anschließend, nach Entfernung des Acetonüberstands, in 10 mL 25 mM Natriumphosphat Puffer mit 2,5 mM MgCl₂ und 5 mM NaCl aufgenommen. Die RNS-Lösung wurde sechsmal mit 10 mL desselben Puffers bei 8000 g über eine 3k Molekulargewicht Ausschluss Membran gewaschen und

anschließend auf ca. 240 μL eingengt. Zum Ansetzen der NMR Proben wurde die Probe mit 28 μL D_2O und Puffer auf 280 μL aufgefüllt und mit TSP als Referenz versetzt.

5.2.2 Licht geschaltete 1D und 2D NMR Messungen

Die Basispulssequenzen für 1D ^1H 1-1 jump and return, $^1\text{H}/^1\text{H}$ 1-1 jump and return NOESY und $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -sfHMQC sind in Kapitel 2.7 beschrieben. Um die RNS in den NMR-Messungen mit Licht schalten zu können, wurden zwei durch Topspin angesteuerte Laser (UV-Laser 365 nm und Vis-Laser 488 nm) verwendet. Lichtgeschaltete 1D ^1H 1-1 jump and return Spektren wurden für 3 s vor der Messung mit Licht von 365 nm Wellenlänge bestrahlt. $^1\text{H}/^1\text{H}$ 1-1 jump and return NOESY und $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -sfHMQC wurden mit Licht von 365 nm Wellenlänge für 1 s nach jedem Intervall bestrahlt. Um eine großflächige Ausleuchtung der Probe im Shigemi-NMR-Röhrchen zu erreichen, wurden geschliffene Stempfer in den Shigemi-NMR-Röhrchen verwendet²⁴⁴.

5.3 Ergebnis und Diskussion

5.3.1 Ungeschalteter Zustand der RNS Konstrukte

Als erster Schritt in der Charakterisierung des ungeschalteten Grundzustandes der Konstrukte wurden 1D- ^1H NMR Spektren und 2D $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY Spektren gemessen. In den 2D $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY wurden die Iminoprotonen (Abb. 42 und 43) zugeordnet und die Zuordnung mit einer weiteren Zuordnung in der Imino-Aromaten-Region und über $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC ähnlichen Experimenten überprüft (Abb. 44).

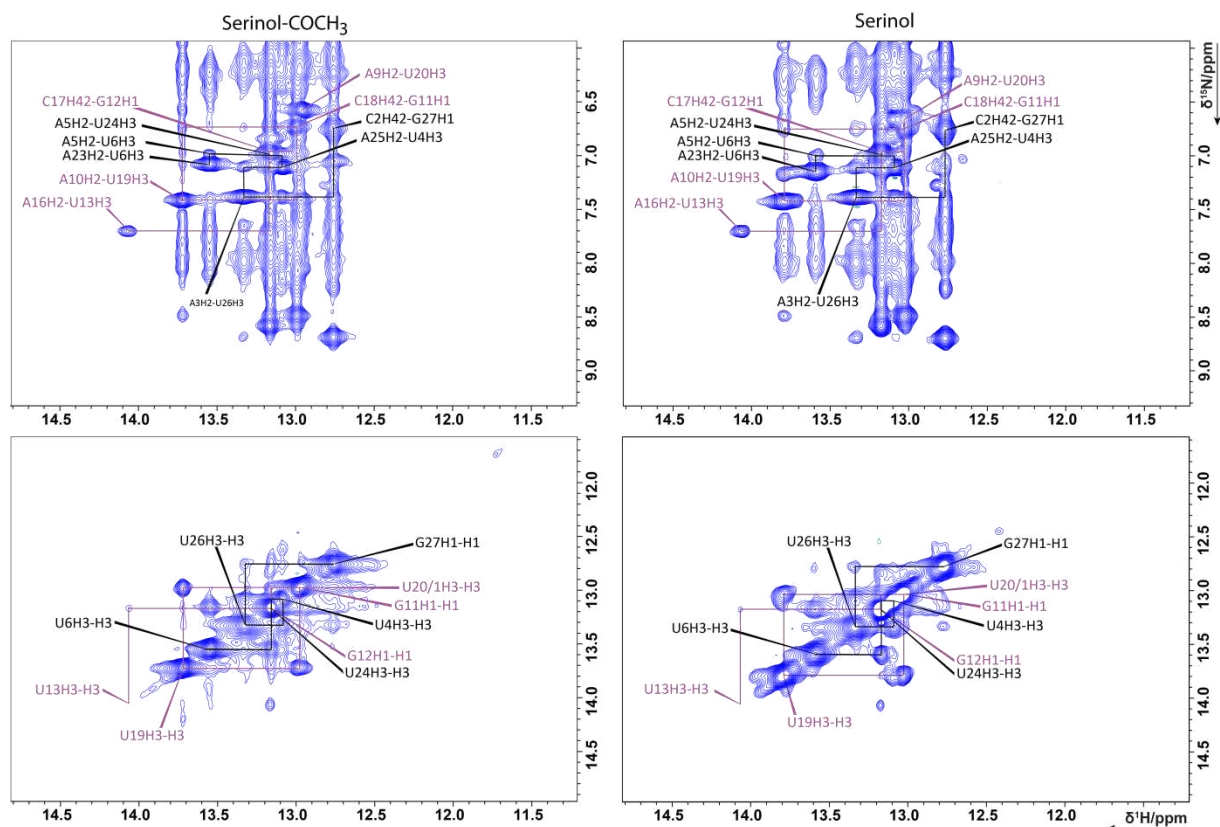


Abbildung 42: Links) $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY-NMR-Spektrum von Serinol- COCH_3 bei 298 K in 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,2 mit 2,5 mM MgCl_2 und 5 mM NaCl. Gemessen mit 256 Scans, 120 Dumis-Scans und 2048 Punkten in ω_1 und 512 Punkten in ω_2 bei 800 MHz mit RNS Konzentration von 400 μM . Rechts) $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY-NMR-Spektrum von Serinol bei 298 K in 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,2 mit 2,5 mM MgCl_2 und 5 mM NaCl. Gemessen mit 216 Scans, 128 Dumis-Scans und 2048 Punkten in ω_1 und 512 Punkten in ω_2 bei 800 MHz mit RNS Konzentration von 420 μM .

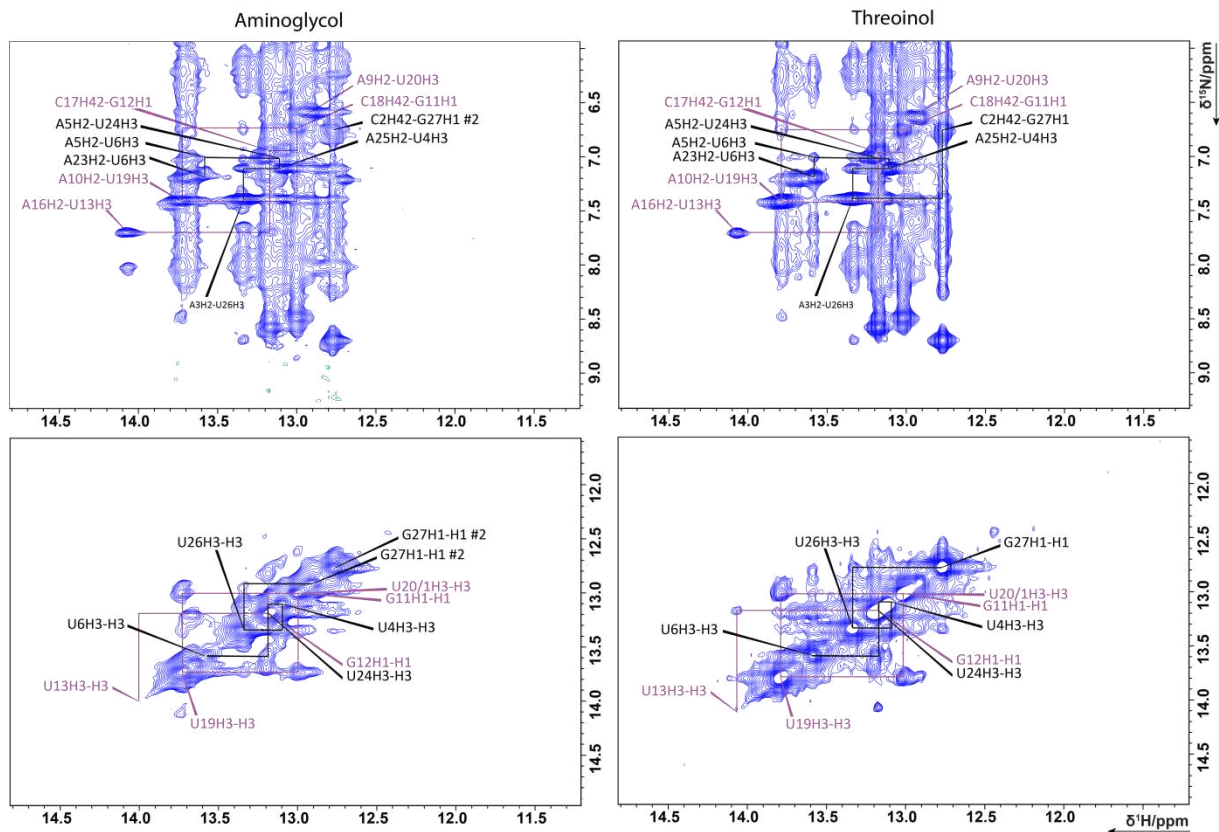


Abbildung 43: Links) $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY- NMR-Spektrum von Aminoglycol bei 298 K in 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,2 mit 2,5 mM MgCl_2 und 5 mM NaCl. Gemessen mit 252 Scans, 32 Dumis-Scans und 2048 Punkten in ω_1 und 512 Punkten in ω_2 bei 600 MHz mit RNS Konzentration von 400 μM Rechts) $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY- NMR-Spektrum von Threoinol bei 298 K in 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,2 mit 2,5 mM MgCl_2 und 5 mM NaCl. Gemessen mit 252 Scans, 64 Dumis-Scans und 2690 Punkten in ω_1 und 512 Punkten in ω_2 bei 800 MHz mit RNS Konzentration von 411 μM .

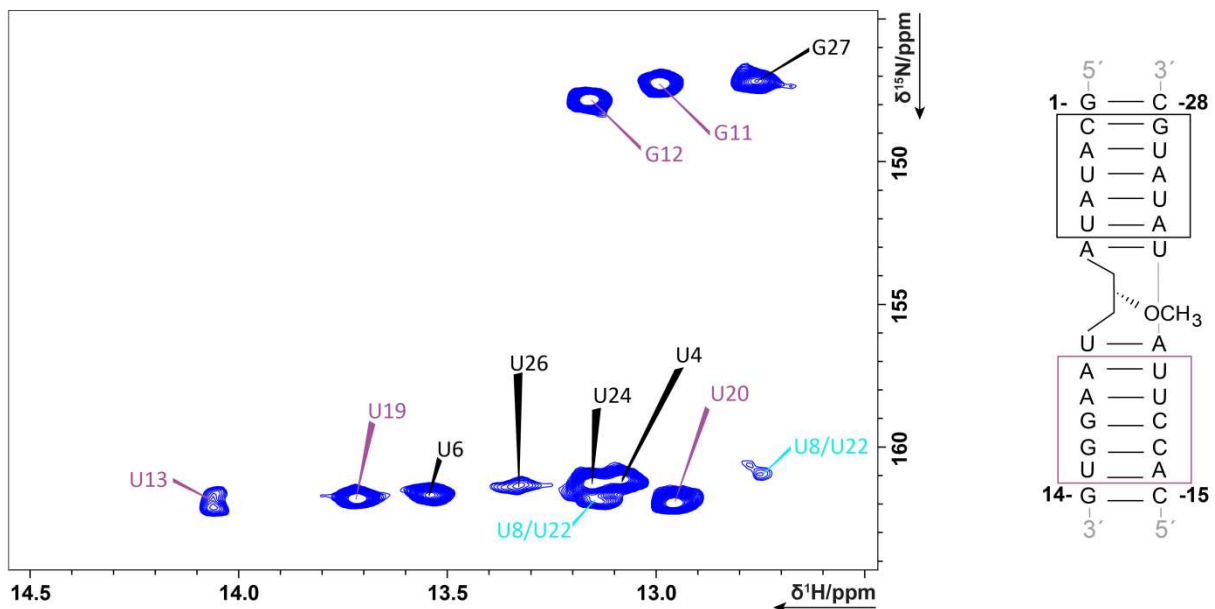


Abbildung 44: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -SFHMQC- NMR-Spektrum von Serinol- COCH_3 bei 298 K in 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,2 mit 2,5 mM MgCl_2 und 5 mM NaCl. Gemessen mit 3392 Scans und 2048 Punkten in ω_1 und 64 Punkten in ω_2 bei 800 MHz mit RNS Konzentration von 400. Die sequenziell zugeordneten Nukleotide sind mit Violett und Schwarz in den Spektren und der Sekundärstruktur gekennzeichnet. In Türkis sind die beiden verbleibenden Uridine markiert, die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten.

Aus der sequenziellen Zuordnung der $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY Spektren ist zu erkennen, dass in allen Konstrukten die beiden äußeren G:C Basenpaare und die A:U Basenpaare um die Modifikation nicht sequenziell zugeordnet werden können. Bei den beiden äußeren G:C Basenpaaren ist der Mangel an sichtbaren Signalen im NOESY (Abb. 42 und Abb. 43) mit einem zu schnellen Austausch der Protonen mit dem umgebenden Wasser zu erklären. Für die beiden inneren A:U Basenpaare ist sicherlich auch eine Abschwächung der Signale durch den Austausch mit Wasser im Gange. Dieser wird durch den strukturstörenden Einfluss von Linker und Spiropyran oder bereits der COCH₃ Gruppe in der Referenz ermöglicht, wie in Abb. 44 an den deutlich schwächeren Signalen für U8/U22 im Vergleich zu den restlichen U-Signalen zu erkennen ist. In den NOESY Spektren aller Konstrukte lassen sich prinzipiell dieselben sequenziellen Zuordnungen vornehmen. Dabei existieren leichte Unterschiede in den chemischen Verschiebungen der einzelnen Atome von Konstrukt zu Konstrukt. Insgesamt sind aber keine großen Unterschiede in den NOESY Spektren zwischen den einzelnen Konstrukten zu erkennen. Die einzige Ausnahme bilden die Spektren vom Aminoglycolkonstrukt, in denen einige Signale, besonders deutlich an den Kreuzsignalen von U19H3 in Abb. 44 zu erkennen, ein weites benachbartes Signal aufweisen. Dieser zusätzliche Satz an benachbarten Signalen lässt eine Nebenkongformation der RNS vermuten. Da Aminoglycol nur 3 anstatt 4 Kohlenstoffeinfachbindungen, im Vergleich zu den anderen Verbindungstücken, besitzt, ist es möglich, dass die geringere konformationelle Flexibilität ausreicht, um zwei leicht unterschiedliche RNS Konformationen zu erzwingen.

5.3.2 Durch Licht geschalteter Zustand der RNS Konstrukte

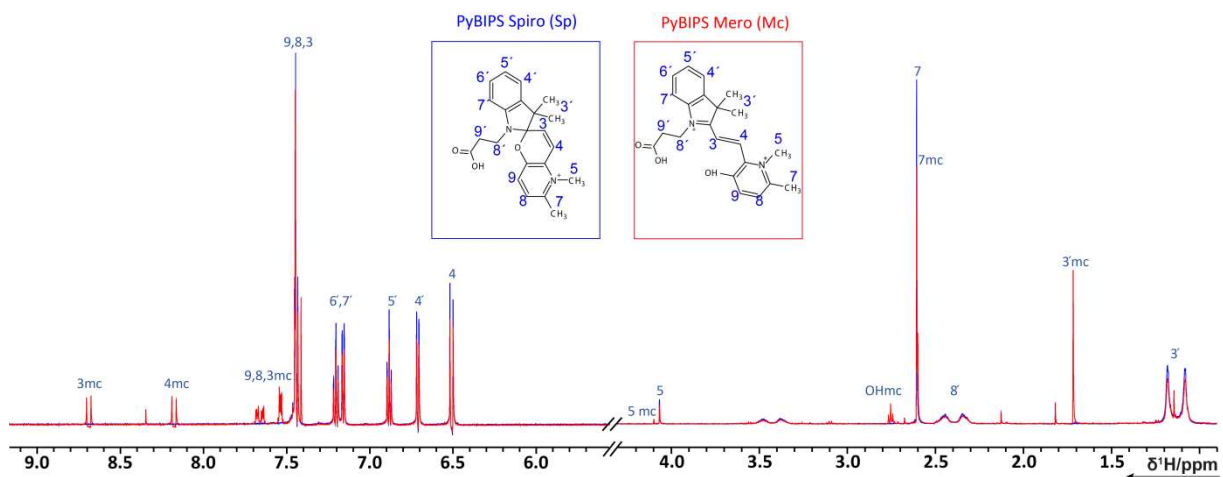


Abbildung 45: ^1H -1D NMR-Spektrum von ByPIBS mit (Rot) und ohne Belichtung (Blau) bei 298 K in 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,2 mit 2,5 mM MgCl_2 und 5 mM NaCl. Gemessen mit 256 Scans bei 600 MHz.

Durch Bestrahlung mit Licht von 365 nm Wellenlänge soll das in der RNS eingebaute Spiropyran in die Merocyanin Form geschaltet werden und so in den Gegenstrang interkalieren. Dadurch soll sich im besten Falle eine reguläre RNS Helix ausbilden, in der die Basenpaare A7/U22 und U8/A20 stabil ausgeformt sind. Aus dem 1D in Abb. 46 ist zu erkennen, dass sich nach der Belichtung keine großen Änderungen in den Spektren vollziehen. Bei Threoinol und Serinol nehmen lediglich einige Signale in ihrer Intensität ab, was eher auf eine Destabilisierung als auf eine Stabilisierung der Sekundärstruktur hinweist. Bei Aminoglycol ist zwar auch eine Abnahme der Intensität einiger Signale zu erkennen, aber immerhin auch das Auftauchen eines schwachen neuen Signals bei 13,6 ppm. Bei Betrachtung der $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -sfHMQC/bTROSY Spektren in Abb. 46 wird deutlich, dass dieses neue Signal von U6 stammt, das bei Aminoglycol im Gegensatz zu allen anderen Konstrukten auch unbelichtet nicht vorhanden ist.

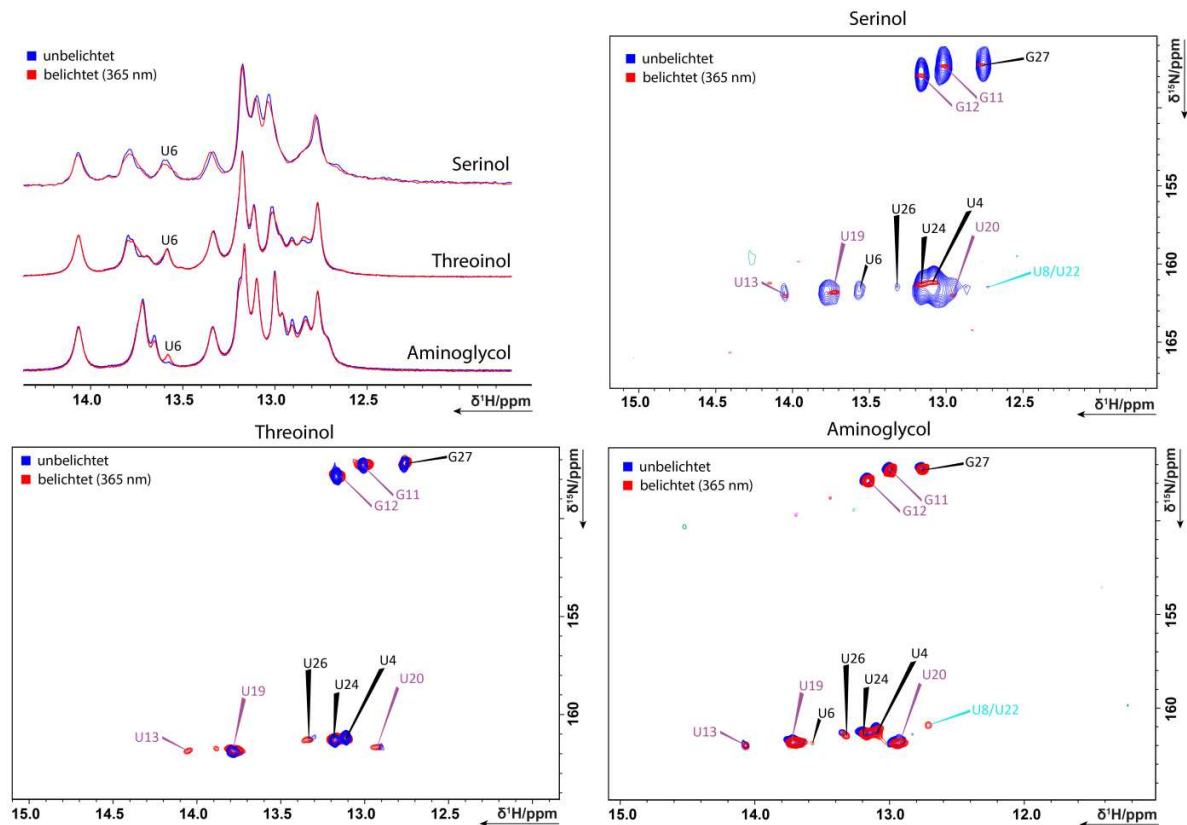


Abbildung 46: Unbelichtete und belichtete ^1H -1D und $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -SFHMQC-NMR-Spektrum der Imino-Region der Konstrukte Serinol, Threoinol und Aminoglycol bei 298 K in 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,2 mit 2,5 mM MgCl_2 und 5 mM NaCl. 1D Serinol gemessen mit 16 Scans und 4096 Punkten, 1D Threoinol und Aminoglycol mit 256 Scans und 16384 Punkten. $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -SFHMQC Serinol unbelichtet gemessen mit 6144 Scans und 2048 Punkten in ω_1 und 32 Punkten in ω_2 bei 800 MHz. $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -bTROSY Serinol belichtet gemessen mit 1517 Scans und 1024 Punkten in ω_1 und 128 Punkten in ω_2 bei 700 MHz. $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -SFHMQC Threoinol unbelichtet gemessen mit 2880 Scans und 2048 Punkten in ω_1 und 64 Punkten in ω_2 bei 800 MHz. $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -bTROSY Threoinol belichtet gemessen mit 3520 Scans und 1024 Punkten in ω_1 und 64 Punkten in ω_2 bei 800 MHz. $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -bTROSY Aminoglycol unbelichtet/belichtet gemessen mit 3520 Scans und 1024 Punkten in ω_1 und 64 Punkten in ω_2 bei 800 MHz.

- unbelichtet
- belichtet (365 nm)

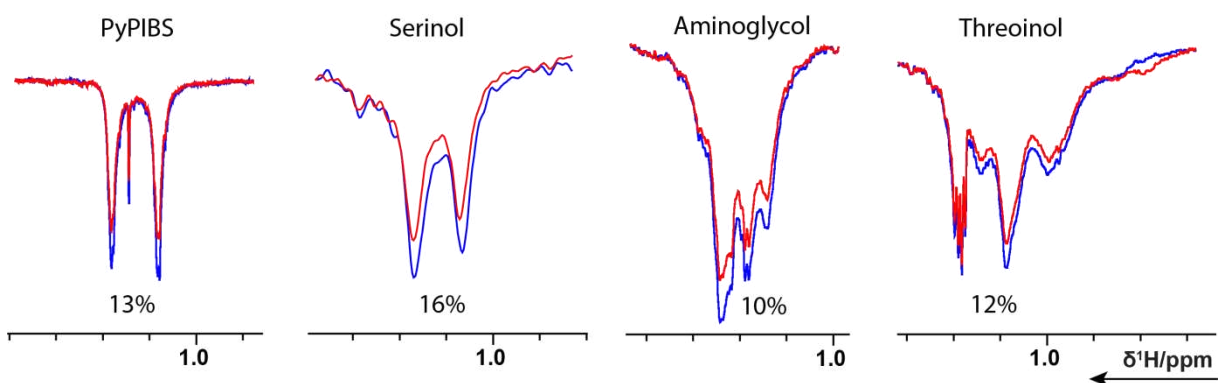


Abbildung 47: Ausschnitt aus den 1D-NMR Spektren der Konstrukte Serinol gemessen mit 16 Scans und 4096 Punkten, 1D Threoinol und Aminoglycol mit 256 Scans und 16384 Punkten sowie freies PyIBS mit 256 Scans und 32768 Punkten. Im Ausschnitt dargestellt sind die Signale der 3'Methylgruppen des freien oder eingebauten Spirophyrans und der Rückgang des Integrals, dieses Signal bei Belichtung ist in % angegeben.

Zusätzlich ist in den Aminoglycol 2D Spektren auch das Auftauchen eines Signals bei 12,7 ppm zu beobachten, bei dem es sich um das Imino-Signal von U8 oder U22 handelt. Daraus kann geschlossen werden, dass der gesamte erste helicale Abschnitt von U1-A7 im Aminoglycol-Konstrukt stärker destabilisiert ist als in allen anderen Konstrukten und das neue Signal bei 12,7 ppm vermutlich U22 zuzuordnen ist. Eine Erklärung, warum dieses Signal ausgerechnet für Aminoglycol sichtbar ist, könnte darin bestehen, dass das Lichtschalten des Merocyanin im Aminoglycol-Konstrukt, die Ausbildung des A7/U22 Basenpaar zwar schwerer behindert als in den anderen Konstrukten, aber trotzdem erst ermöglicht. Gleichzeitig nimmt das Merocyanin jedoch eine räumliche Position ein, die das schwache A7/U22 Basenpaar vor dem Austausch mit Wasser beschützt, sodass das Signal deutlicher im Spektrum auftaucht als es der Stärke der Wasserstoffbrückenbindung entspricht. Hinweise auf das vermutlich U22 zuzuordnende Signal bei 12,7 ppm können auch im unbelichteten 2D Spektrum von Serinol gefunden werden. Hier ist allerdings eine Abschwächung beziehungsweise ein Verschwinden der Signale U6 und U22 nach Belichtung zu beobachten. Vermutlich wird also mit dem Schalten in die flexiblere Form des Merocyanins nur der Austausch mit Wasser befördert, sodass es zu einer Signalabschwächung kommt. Insgesamt lässt sich also für das Serinol-Konstrukt feststellen, dass das eingebaute Spirophyran zusammen mit der Serinol-Verbindung zwar für eine Störung in der Helix sorgt, die die Basenpaarung A7/U22 und U8/A21 zu großen Teilen verhindert, aber durch die Lichtschaltung kein großer Einfluss auf die Struktur genommen werden kann. Das lässt vermuten, dass ein Großteil des störenden Einflusses von der Serinol-Verbindung und nicht vom eingebauten Fotoschalter herrührt, der vermutlich fast frei rotierbar aus der RNS herauschaut. Im direkten Vergleich weisen die 1D Spektren von Threoinol und Aminoglycol große Ähnlichkeiten auf. Allerdings ist die Intensität von U6 im Threoinol-Spektrum nicht von Belichtung beeinflusst und auch im 2D ist kein Ansatz des vermutlichen U22 Signals bei 12,7 ppm zu erkennen. Ob daher die Schaltung des Spirophyrans im Threoinol-Konstrukt die Struktur nur minimal beeinflusst und/oder einfach nur keine vor Wasseraustausch schützende Position einnimmt, wie bei Aminoglycol, ist nicht festzustellen. Mit einem Blick auf die Signale der eingebauten Spiropyrane in Abb. 47 lässt sich allerdings vermuten, dass bei Threoinol und Aminoglycol eine sterische Interaktion mit der RNS vorhanden ist, da hier die Signale aufgespalten sind, was auf mindestens zwei bevorzugte Orientierungen des Spiropyrans hindeutet. Im Gegensatz dazu findet sich keine Aufspaltung in den Signalen von freiem PyBIBS oder im Serinol-Konstrukt, was die These, dass das Spiropyran im Serinol-Konstrukt frei rotiert weiter unterstützt. Handelt es sich beim Signal bei 12,7 ppm, wie vermutet, um U22 wäre das dem verbleibenden Signal U8 bei 13,15 ppm zuzuordnen. Interessanterweise ist dieses Signal, das im Spektrum des Serinol-COCH₃-Konstrukts in Abb. 44 klar erkennbar ist, in keinem der drei Konstrukte mit Fotoschalter zu finden. Das deutet darauf hin, dass die verursachten Störungen in allen Konstrukten unsymmetrisch im Bezug auf die beiden helicalen Abschnitte sind.

5.3.3 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit keinem der gemessenen Konstrukte eine vollständige reversible Doppelstrangfaltung vollzogen werden konnte. Alles deutet darauf hin, dass einer der Hauptgründe für das Fehlen der Schaltbarkeit durch Licht eine mangelnde Integration von Verbindungsstück und Spiropyran/Merocyanin in die Sekundärstrukturabfolge ist. Verbindungsstück und Fotoschalter stören zwar die lokale Struktur, scheinen sich aber nach Belichtung nicht passend in die entstehende Struktur einzufügen. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist es für die Gesamtstruktur einfach entropisch günstiger, den Fotoschalter aus der entstehenden Helix herauszudrehen. Der kleine Erfolg mit dem Konstrukt Aminoglycol deutet darauf hin, dass es zukünftig günstiger sein könnte, den Fotoschalter starrer in ein RNS Konstrukt einzubauen, umso eine Positionierung in der Helix zu forcieren. Allerdings ist bei einem rigideren System natürlich zu befürchten, dass durch die umgebenden Basen, das Spiropyran sterisch an der Schaltung gehindert wird. Daher wäre es bei Konstrukten, die die Flexibilität des Spiropyrans einschränken, wahrscheinlich nützlich, Strukturen schalten zu wollen, die bereits ein leicht zu kippendes Gleichgewicht aufweisen. Dazu könnten sich bistabile RNS-Haarnadelstrukturen eignen, da diese schon zur Umfaltung neigen, wenn wenige Basenpaare in der Helix nicht ausgeformt werden können. Des Weiteren würde es sich empfehlen, bei zukünftigen Konstrukten die Nukleotitabfolgen um den Fotoschalter nichtsymmetrisch zu gestalten. Dies würde die Zuordnung erleichtern und einer Überlagerung von Signalen vorbeugen, was im Zweifelsfall genauere Aussagen ermöglichen würde.

6 SARS-CoV-2 RNA Sekundärstruktur Aufklärung RNA 5_SL1 und 5_SL7

6.1 Biochemischer Hintergrund

Angesichts der weltweiten **Severe acute respiratory syndrome coronaviruses 2 (SARS-CoV2)** oder auch COVID-19 Pandemie wurde das COVID-19 NMR Konsortium gegründet, um die RNA und Proteine von SARS-CoV2 zu erforschen. Als Teil dieses großen Teams wurde im Rahmen dieser Arbeit, die Sekundärstruktur von zwei Abschnitten aus der 5'-UTR von COVID-19 erforscht. Diese Arbeit wurde mit der Hoffnung durchgeführt, dass durch die Erforschung der Strukturen des RNS Genoms von SARS-CoV2 nachfolgend gezielt Medikamente entwickelt werden können.

6.1.1 Covid-19 und seine RNA

Der SARS-CoV2 Virus ist ein *Sarbecovirus* aus der Unterfamilie der *Orthocoronavirinae*, die zu der

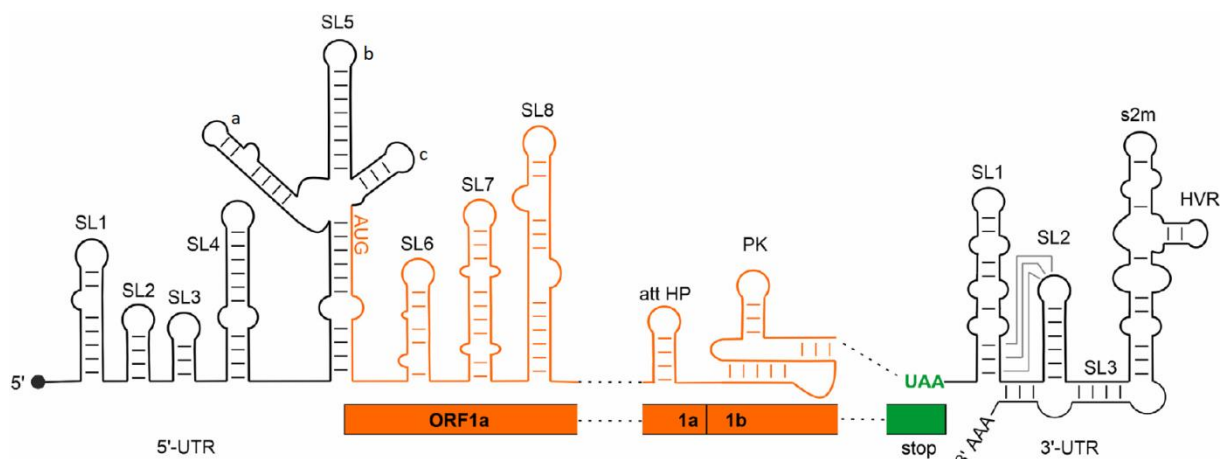


Abbildung 48: Schematische Darstellung der m-RNS von SARS-CoV-2. In Schwarz sind die 5' und 3' untranslatierten Regionen dargestellt, in Orange der erste offene Leserahmen. Die offenen Leserahmen auf der m-RNS enden mit dem Stoppsignal UAA in Grün nach ORF9. Abbildung entnommen aus Wacker et. al 2020²⁵⁴

Familie der *Beta-Coronaviridae* aus der Ordnung der *Nidovirales* gezählt werden^{245,246}. Das RNS Genom von SARS-CoV2 besteht aus positiv orientierter RNS und enthält ca. 30000 Basen. Das Genom besitzt eine 5'-Kappe und eine Polyadenylierung am 3'-Ende und wird dadurch als mRNS im Wirt erkannt. Zwischen regulatorischen RNS Elementen in der 5' und 3' UTR liegen ORFs für Proteine, die für Zellzugang (Spike-Protein), Virusvermehrung (15-16 Proteine des Replikasekomplex) und Struktur (Membran-, Envelope- und Nucleocapsid-Protein) verantwortlich sind^{247,248}. Mehrere Abschnitte der *Coronaviridae* RNS werden zunächst als Polyprotein exprimiert und müssen von Virus- oder Wirtsproteasen geschnitten werden, um funktional zu sein^{247,249}. Die RNS Strukturelemente in der 5' und 3' UTR sind für die Regulation der viralen Replikation, der RNS Synthese und der Umhüllung der Virus RNS zuständig²⁴⁹. Für *Beta-Coronaviridae* sind in der 5'-UTR vier Stammschleifenstrukturen (SL1-4) sowie der aus drei Stammschleifenstrukturen bestehende Abschnitt SL5 als konserviert bekannt (Abb. 48)²⁴⁸. Die nachfolgenden Strukturen 5SL6-8 sind weit weniger über alle *Beta-Coronaviridae* konserviert und ob ihre Struktur eine Funktion für das Virus besitzt ist unbekannt²⁴⁹.

5SL1 ist nach einer Studie von Li. Et al. (2008) für Interaktionen in die 3'-UTR verantwortlich. Diese Interaktionen sind essenziell für die Virusreplikation. Wird der obere Teil von 5SL1 durch Mutationen destabilisiert, entstehen in der Replikation Viren mit Defekten oder tote Viren. Für die Replikation ist die Sequenz des unteren Teils von 5SL1 ebenfalls entscheidend, da Mutationen, die dieser Region neue Basenpaare hinzufügen, ebenfalls zu toten Viren führen²⁵⁰.

5SL2 ist die am meisten über alle Coronaviren konservierte Stamm-Schleifenstruktur der 5'-UTR. 5SL2 besteht aus 5 Basenpaaren, die durch einen Pentabogen verbunden sind. Untersuchungen zeigen, dass der CUUGU Bogen von entscheidender Bedeutung für den Virus ist, da Mutationen, die den Bogen destabilisieren, die Replikation verhindern^{251,252}.

5SL3 ist für Beta-CoV und SARS-CoV Viren ein besonderes Merkmal und enthält die Leiter Transkription Regulation Sequenz (TRS-L), die durch komplementäre Basenpaarung zur Body Transkription Regulation Sequenz (TRS-B), für lang Reichweiten RNS-RNS Interaktionen in die 3' Region der ORF verantwortlich ist^{248,252}. Um diese Funktion erfüllen zu können, liegt die 5SL3 Region bei 37 °C sehr schwach gepaart oder als einzelner Strang vor, wie durch SHAPE²⁵³ und NMR²⁵⁴ Untersuchungen festgestellt wurde.

5SL4 ist für Alpha und Beta Coronaviren konserviert, verträgt aber eine große Anzahl verschiedener Mutationen, ohne dass diese letal werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch das komplette Ausschneiden von 5SL4, die Virusreplikation unterbunden wird. Das Ersetzen von 5SL4 durch eine Stammschleifenstruktur mit absolut anderer Sequenz erzeugt allerdings vitale Viren. Daraus kann geschlossen werden, dass 5SL4 als Platzhalterelement fungiert²⁵⁵. Des Weiteren enthält 5SL4 ein Mini-ORF, dessen Funktion wahrscheinlich darin besteht, die Transkription des nachfolgenden langen ORF1ab zu verstärken^{249,253}. Diese Funktion scheint allerdings nicht essenziell für das Virus zu sein²⁴⁸.

5SL5 besteht aus einer initialen Helix aus der drei Stammschleifenstrukturen (5SL5a-c) entspringen. Der initiale Helix und Teile von 5SL5c Basen paart mit den ersten Nukleotiden des ORF1. Wie sich diese Basenpaarungen auf die Transkription von ORF1 auswirken, ist noch nicht genau bekannt. Für 5SL5a und b ist ein 5'-UUCGU-3' Pentabogen und für 5SL5c ein 5'-GNRA-3' Tetrabogen konserviert²⁴⁹. Mutationen an 5SL5a wirken sich nachteilig auf die DI-RNS Replikation²⁵⁶ aus, während Studien an 5SL5c zu widersprüchlichen Ergebnissen kamen, ob dieser Stamm für eine intakte DI-RNS Replikation wichtig ist^{252,255,256}.

Ein essenzielles Element der mRNS von SARS-CoV2 und anderen Beta-Coronaviren²⁴⁹ ist die Leserahmenverschiebende Region in ORF1. Sie besteht aus der Modulationshaarnadelstruktur (att HP) und einem aus drei Stammschleifenstrukturen bestehenden, als Pseudoknoten bezeichneten, Strukturelement. Att HP scheint dabei für die Modulation der Häufigkeit²⁵⁷ der -1 programmierten Leserahmenverschiebung, die durch den Pseudoknoten ausgelöst wird²⁵⁸, verantwortlich zu sein.

Bei mehreren *Orthocoronavirinae* wurde festgestellt, dass in der 3'-UTR cis-agierende Elemente lokalisiert sind. Diese essenzielle Region erstreckt sich vom Stop-Codon bis in den Poly-A Vorsatz²⁴⁸. Das erste Strukturelement SL1 in der 3'-UTR ist in der Literatur auch als BSL (bulged stem loop) bekannt. Das untere Ende von SL1 kann mit dem nachfolgenden Element SL2 einen Pseudoknoten bilden. Ob SL2 als einzelne Stammschleifenstruktur vorliegt oder als Pseudoknoten, der mit SL1 verbunden ist, hat regulatorische Auswirkungen auf die Kinetik der RNS Synthese²⁵⁹.

Nach dem Pseudoknoten Regulationselement folgt eine kurze flankierende Helix SL3 auf die die hypervariable Region (HVR) der 3'-UTR folgt. Die HVR zeichnet sich durch eine sehr geringe Sequenzkonservierung über alle *Beta-Coronaviridae* aus²⁴⁹. In der HVR gibt es zwei Abschnitte, die stark konserviert sind: s2m und eine 8 Nukleotide Sequenz 5'-GGAAGAGC-3'. Die Funktion der 8 Nukleotidsequenz ist bisher nicht endgültig geklärt und kann wie die gesamte HVR ohne größere Auswirkungen auf die Replikation komplett aus dem Virusgenom entfernt werden. Auch weitgehende Mutationen hatten keine Auswirkungen auf die Virusreplikation. Erste Ergebnisse im Mausmodell deuten allerdings daraufhin, dass die HVR einen großen Einfluss auf die Pathogenität des Virus hat²⁶⁰. S2m ist homolog zu einer Schleife im Ribosom und spielt vermutlich eine Rolle in der Rekrutierung der Translationsmaschinerie des Wirts^{249,261}.

6.2 Material und Methoden

6.2.1 RNA Herstellung²⁵⁴

Die Herstellung der RNS erfolgte über T7-RNS-Polymerase *in-vitro* Transkription und wurde von mehreren Kollegen im Arbeitskreis durchgeführt. Um RNS der gewünschten Sequenz und Reinheit zu erhalten, wurden die RNS-Sequenzen des Ziels und des T7 Promoter über komplementäre Oligonukleotide zusammenhybridisiert. Das fusionierte Oligonukleotid wurde in den pSP64 Vektor (Promega), der das HDV Ribozym mit EcoRI- und NcoI-Sequenzen enthielt, kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde in Zellen des *Escherichia coli* Stamm DH5 α transformiert und anschließend über Zellkulturen vermehrt. Die Plasmid-DNS wurde in einer Konzentration von 2–10 mg Plasmid pro Liter SB Medium mit dem Gigaprep-Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit dem Restriktionsenzym *Hind*III linearisiert. Das linearisierte Plasmid wurde für die preparative Transkription (beschrieben in Abschnitt 2.2.2) eingesetzt. Die Transkription wurde bei 37 °C für 6 h durchgeführt. Für Isotopen markierte Proben wurden bei der präparativen Transkription einheitlich ¹³C und ¹⁵N markiertes Uridin und Guanosin (Cambridge Isotope Laboratories) und unmarkiertes Adenosin und Cytidin (Sigma-Aldrich) eingesetzt. Um die Transkription zu beenden, wurde nach 6 h EDTA zur Lösung hinzugegeben und die RNS mit 2-Propanol gefällt. RNS der gewünschten Länge wurde in einem ersten Schritt über 10-12 % denaturierende PAA Gele abgetrennt. Dazu wurden die RNS-Banden mit 254 nm Licht sichtbar gemacht und aus dem Gel ausgeschnitten. Die RNS wurde durch passive Diffusion in 0,3 M NaOAc aus dem Gel gelöst, mit EtOH/Acetone gefällt und über PD10 Säulen (GE Healthcare) entsalzt. Das in der Lösung verbleibende PAA wurde über inverse-Phasen HPLC, ausgestattet mit einer Kromasil RP 18 Säule und einem Lösungsmittelgradienten von 0–40 % 0,1 M Acetonitril/Triethyl-Ammonium-Acetate, entfernt. Die HPLC Fraktionen wurden eingefroren und das Wasser durch Gefriertrocknung entfernt. Nach Fällung in Aceton mit 2 % Lithiumperchlorat zum Kationenaustausch wurde die RNS in Wasser aufgenommen und gefaltet. Die Faltung erfolgte durch Erhitzen auf 80 °C und anschließend schnelles Abkühlen auf Eis. Für die NMR-Messung wurde die RNS von Wasser in NMR-Puffer (25 mM Kaliumphosphat Puffer, pH 6.2, 50 mM Kaliumchlorid) mittels eines Zentrifugalkonzentrators überführt.

6.2.3 ¹H/¹H-TOCSY

Bei der totalen Korrelationspektroskopie werden Protonen über zusammenhängende J-Kopplungen miteinander korreliert. Im resultierenden 2D Spektrum erscheint auf der Diagonale dieselbe Information wie sie in einem ¹H-1D zu erhalten sind. Zusätzlich können über die Kreuzsignale alle Protonen bestimmt werden, mit denen das jeweilige Proton in einer ungebrochenen Kette an J-Kopplungen verbunden ist. Eine TOCSY Pulssequenz besteht im einfachsten Fall aus drei 90 ° Pulsen. Nach dem ersten 90 ° Puls werden isotrope Mischsequenzen in die Pulssequenz eingebaut um z, x und y Magnetisierung möglichst effizient von Kern zu Kern zu übertragen. Im Rahmen des Sars-Cov2 RNA Projekts wurde als isotrope Mischsequenz Dipsi2²⁶² für 30 ms verwendet. Zur Wasserunterdrückung wurde Excitation sculpting²⁶³ (Anregungsformung) eingesetzt. Durch den Einsatz dieser Pulssequenz konnten die Kreuzsignale der Uridin und Cytidin H5/H6 Protonen deutlich von anderen Signalen, die im NOESY in dieser Region erscheinen, unterschieden werden.

6.2.4 Best-TROSY- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HNN-COSY

Im $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HNN-COSY²⁶⁴ Experiment werden die Wasserstoffbrücken in den RNS Helices durch Korrelation von Donor und Akzeptor Stickstoff mit dem verbindenden Iminoproton direkt beobachtet. Analog zum $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC^{183,184} wird Protonenmagnetisierung von Guanin H1 und Uridin H3 über einen INEPT-Transfer¹⁸⁶ auf den kovalent gebundenen Donor-Stickstoff übertragen. Teile der Magnetisierung werden vom Donor-Stickstoff, durch Ausnutzung der $^2J_{\text{NN}}$ -Kopplung, über einen $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ -COSY Transfer weiter zum Akzeptor-Stickstoff transferiert. Im resultierenden Spektrum ist nach gängiger Praxis die als positiv gephasete Signalgruppe das $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC zu erkennen. Die

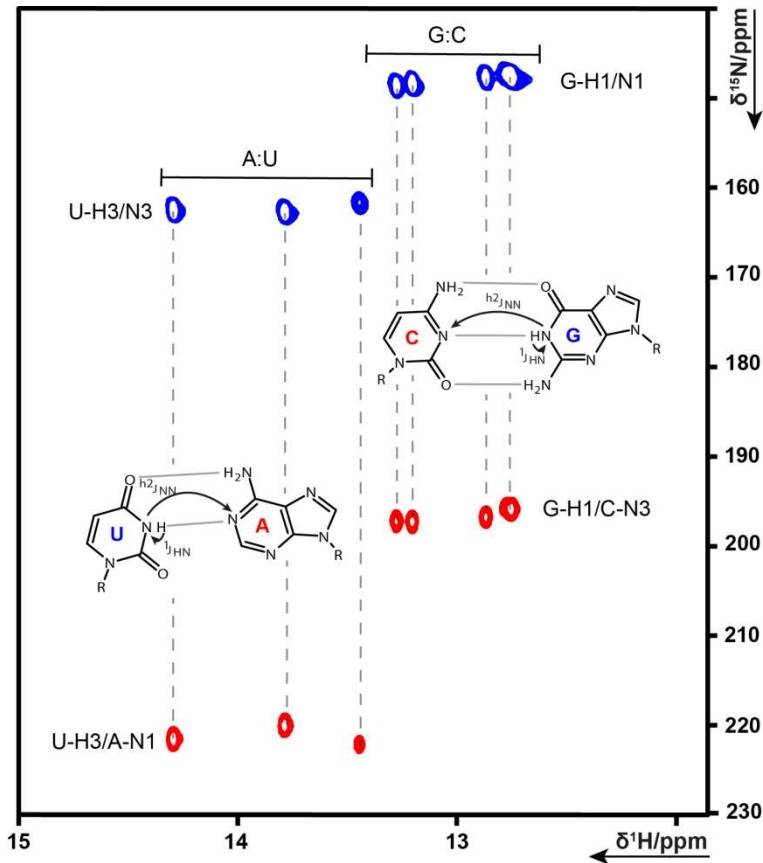


Abbildung 49: Schematische Darstellung des $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HNN-COSY-Spektrums. Die positiven Diagonalpeaks sind in Blau, die negativen Kreuzpeaks in Rot dargestellt. Die Signale der einzelnen Basenpaare sind mit grauen gestrichelten Linien verbunden. Zwischen den positiven und negativen Signalen der Basenpaare ist das entsprechende Basenpaar mit eingezeichnetem Magnetisierungstransfer dargestellt.

Kreuzpeaks sind negativ gephaset und an ihnen ist zu erkennen mit welchen Stickstoffatomen die jeweiligen Guanine oder Uridine ein Basenpaar bilden. Die Kreuzpeaks liegen genau auf der ^1H Verschiebung der Guanine und Uridine, aber auf der ^{15}N Verschiebung der basenpaarenden Adenine 218 ± 16 ppm oder Cytidin 193 ± 10 ppm¹⁸⁵. In der Best-TROSY- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HNN-COSY Variante des Experiments wird der TROSY-Effekt ausgenutzt, um eine bessere Auflösung der Signale zu erreichen. Das intrinsisch schlechte Signal zu Rauschen Verhältnis des HNN-COSY wird durch die Ausnutzung des TROSY-Effekts nicht verbessert. Um dies zu kompensieren wurden selektive Pulse zur Verminderung der d1 Wartezeit nach Art der Best-Pulssequenzen eingesetzt. Durch die Verminderung der d1 Wartezeit können mehr Spektren in derselben Zeit gemessen werden und so das Signal zu Rauschen Verhältnis wieder verbessert werden²⁶⁵⁻²⁶⁷.

6.3 Ergebnis und Diskussion

6.3.1 Sekundärstruktur von 5_SL1

5_SL1 ist das erste Sekundärstrukturelement in der m-RNA von SARS-CoV2. Nach Strukturvorhersage²⁴⁹ sollen die Basen 7-33 eine Haarnadelstruktur mit einer Ausbuchtung, bestehend aus den Nukleotiden 12, 13 und 26-28, zwischen zwei Helices annehmen. Diese Vorhersagen konnten über die Sekundärstrukturbestimmung mittels NMR (Abb. 50) nachvollzogen werden. Über die sequenzielle Zuordnung der Iminoprotonen in einem $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY Spektrum (Abb. 50 A) konnte die Existenz der Helix 7-11/29-33 und 14-16/23-25 nachgewiesen werden. Die Identität der zugeordneten Nukleotide wurde mittels $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -BestTROSY und HNN-COSY (Abb. 50 B und C) überprüft. Durch den Abbruch der sequenziellen Zuordnung bei U24 und U10 und dem im Vergleich schwachem Peak von U11 im $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -BestTROSY kann ebenfalls indirekt die Existenz der Ausbuchtung bei den Nukleotiden 12, 13 und 26-28 nachgewiesen werden. Ausgehend von den initialen Imino- und Zuckerprounordnungen können die chemischen Verschiebungen weiterer Signale ermittelt werden. Durch die starken UH3/AH2 Kreuzsignale im $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY können die AH2 Verschiebungen jedes A:U Basenpaars bestimmt werden. Durch ein Langreichweiten $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HMQC können die an C2 kovalent gebundenen H2 Protonen mit den zu C2 benachbarten Stickstoffen N1 und N3 korreliert werden (Abb. 51 A).

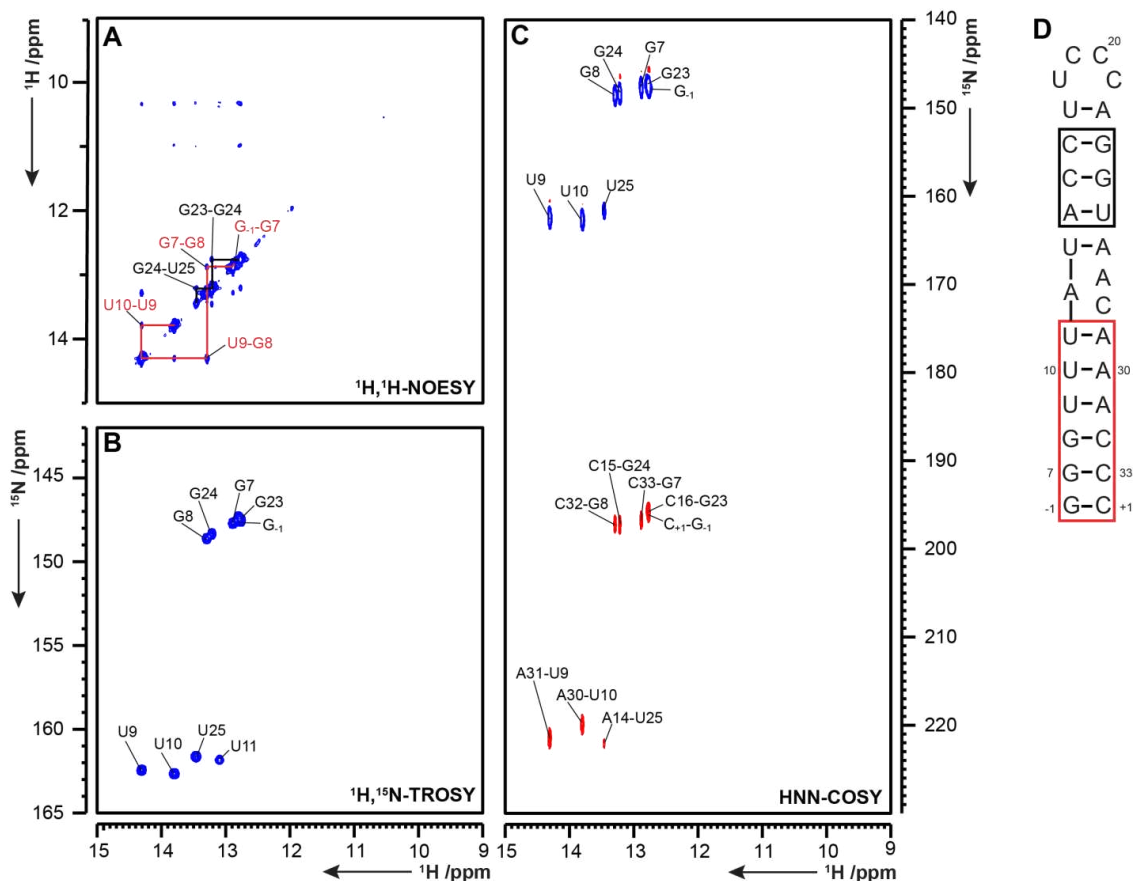


Abbildung 50: Ausschnitte aus den Spektren A) $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY, B) $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY und C) HNN-COSY des Konstrukts 5_SL1. Die gezeigten Ausschnitte dienen dazu die Zuordnung der Imino-Protonen zu verdeutlichen. Positive Signale sind in Blau und negative in Rot angegeben. In A) sind die sequenziellen Imino-Protonen Zuordnungen farblich markiert. Die Farbe der Markierung in A) entspricht der Farbe der Box in D) um die Helix die zugeordnet wurde. Abbildung entnommen aus Wacker et. al 2020²⁵⁴. A) $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY gemessen bei 700 MHz mit 1752/384 Punkten, 256 Scans, einer Mischzeit von 150 ms und einer spektralen Weite von 21 ppm in der ersten und 11,4 ppm in der zweiten Dimension. B) $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY gemessen bei 700 MHz mit 1500/256 Punkten, 16 Scans und einer spektralen Weite von 21 ppm in der ^1H und 25 ppm in der ^{15}N Dimension. C) HNN-COSY gemessen bei 700 MHz mit 1742/192 Punkten, 32 Scans und einer spektralen Weite von 21 ppm in der ^1H und 94 ppm in der ^{15}N Dimension. D) Sekundärstruktur von 5_SL1.

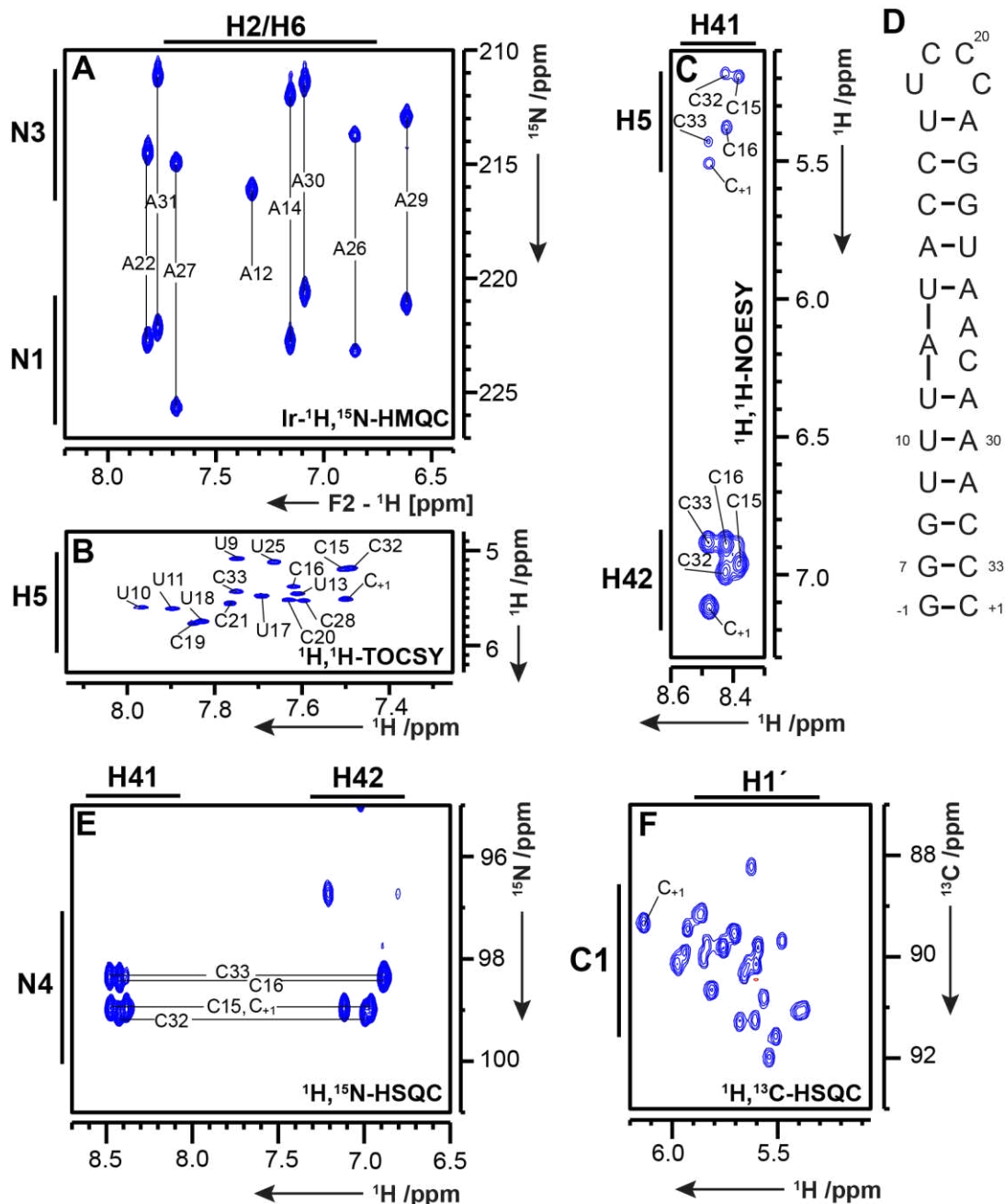


Abbildung 51: Ausschnitte aus den Spektren **A)** Ir- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HMQC, **B)** $^1\text{H}/^1\text{H}$ -TOCSY **C)** $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY **E)** $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC und **F)** $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC des Konstrukts 5_SL1. Die gezeigten Ausschnitte dienen dazu, die Zuordnung der Amino-Protonen (H41, H42) und Stickstoffe (N4), der aromatischen Protonen (H2,H6) und der zu ihnen benachbarten Atome (N1, N3, H5) sowie der Zucker Atome (H1' und C1') zu verdeutlichen. Abbildung entnommen aus Wacker et. al 2020²⁵⁴. **A)** Ir- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HMQC gemessen bei 700 MHz mit 1024/256 Punkten, 32 Scans, einer spektralen Weite von 10 ppm in der ^1H und 78 ppm in der ^{15}N Dimension sowie einem Δ von 20 ms. **B)** $^1\text{H}/^1\text{H}$ -TOCSY gemessen bei 800 MHz mit 1398/512 Punkten, 16 Scans und einer spektralen Weite von 9 ppm in der ersten und 6 ppm in der zweiten Dimension. **C)** $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY gemessen bei 800 MHz mit 2048/512 Punkten, 64 Scans, einer Mischzeit von 150 ms und einer spektralen Weite von 21 ppm in der ersten und 11,9 ppm in der zweiten Dimension. **E)** $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC und gemessen bei 700 MHz mit 1024/192 Punkten, 16 Scans und einer spektralen Weite von 10 ppm in der ^1H und 33 ppm in der ^{15}N Dimension **F)** $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC gemessen bei 700 MHz mit 1024/256 Punkten, 16 Scans und einer spektralen Weite von 8,7 ppm in der ^1H und 20 ppm in der ^{13}C Dimension. **D)** Sekunderstruktur von 5_SL1.

Eine weitere sehr charakteristische Gruppe an Signalen im $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY in Wasser sind die Kreuzsignale der CH41/H42 Aminoprotonen. Diese meist sehr breiten Signale bei 8,0-8,6/6,5-7,5 ppm

sind über ihre Kreuzpeaks mit dem basenpaarenden Guanin H1 gut zuzuordnen. Mit den bekannten H41 Verschiebungen können die C-H5 Protonen, wie in Abb. 53 C gezeigt wird, sowie die C-N4 Stickstoffe (Abb. 53 E) zugeordnet werden. Die bekannten CH5 Verschiebungen ermöglichen es, die Cytidine von Uridinen im $^1\text{H}/^1\text{H}$ -TOCSY (Abb. 53 B) zu unterscheiden. Über Kreuzsignale mit den Imino Protonen von Guanin und Adenin können die H5/H6 Signale der Uridine und Citidie wieder den einzelnen Basenpaaren zugeordnet werden. Mit den bisher beschriebenen Informationen könnte theoretisch die sequenzielle Zuordnung der aromatischen Protonen (H5, H6 und H8) mit den H1' Zuckerprotonen im $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY vollzogen werden. Aufgrund von Überlagerung der Signale in dieser Region gelang diese Zuordnung nicht vollständig und blieb somit unsicher. Daher ist der Ausschnitt aus dem $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC in Abb. 53 F auch nur der Vollständigkeit halber gezeigt, da in diesem Bereich noch weitere Arbeits- und Mess-Zeit investiert werden muss, um eine vollständige Zuordnung zu erreichen. Mit den gemessenen Spektren konnte die Sekundärstruktur von 5_SL1 gut aufgeklärt werden. Für eine Strukturrechnung fehlt allerdings noch die Zuckerzuordnung, um auf die nötige Menge an NOE-Distanzen zu kommen.

6.3.2 Sekundärstruktur von 5_SL7

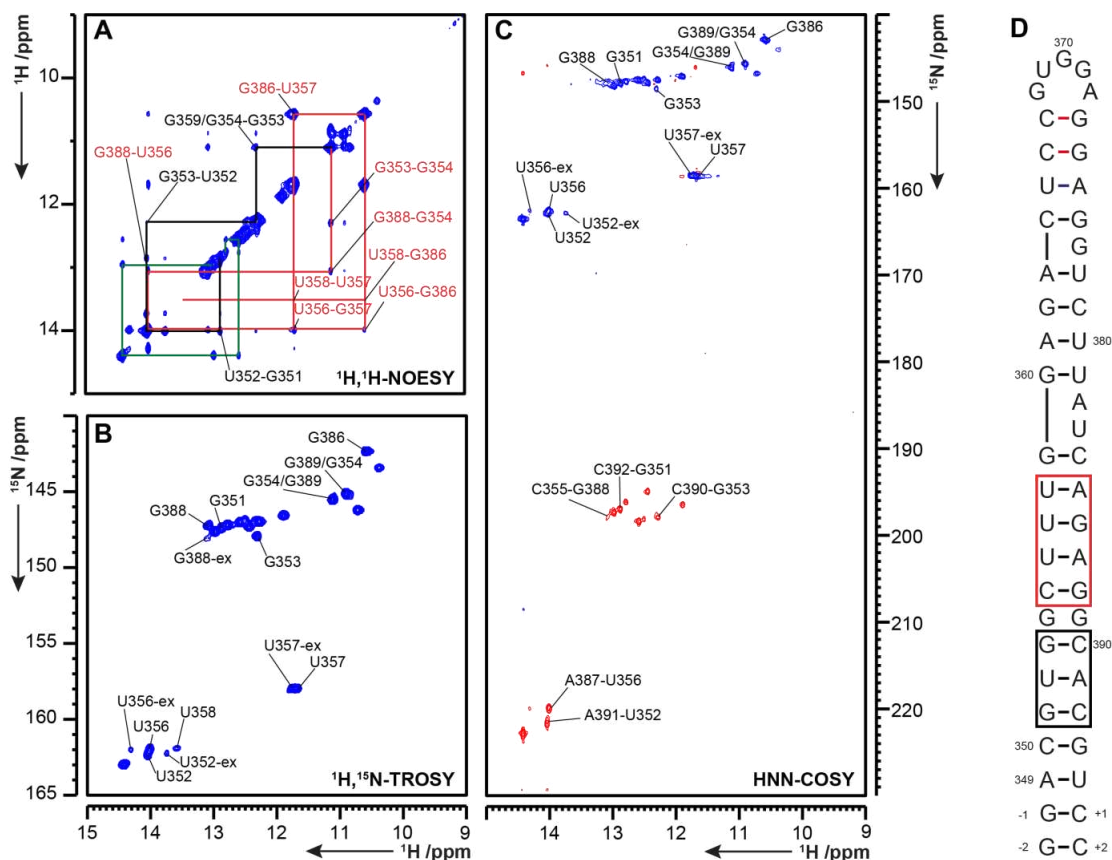


Abbildung 52: Ausschnitte aus den Spektren **A)** $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY, **B)** $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY und **C)** HNN-COSY des Konstrukts 5_SL7. Die gezeigten Ausschnitte dienen dazu, die Zuordnung der Imino-Protonen zu verdeutlichen. Positive Signale sind in Blau und negative in Rot angegeben. In A) sind die sequenziellen Iminoprotonen Zuordnungen farblich markiert. Die Farbe der Markierung in A) entspricht der Farbe der Box in D) um die Helix, die zugeordnet wurde. Der Grüne Pfad in A) entspricht einem existierenden Zuordnungspfad bei dem nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob dieser zur Helix G373-G376 oder G-2-C350 gehört. Bei den mit -ex markierten Signalen handelt es sich wahrscheinlich um Signale einer zweiten Konformation, die im Gleichgewicht vorliegt. Abbildung entnommen aus Wacker et. al 2020²⁵⁴. **A)** $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY gemessen bei 800 MHz mit 2048/352 Punkten, 256 Scans, einer Mischzeit von 150 ms und einer spektralen Weite von 21 ppm in der ersten und 11,9 ppm in der zweiten Dimension. **B)** $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY gemessen bei 800 MHz mit 2214 /280 Punkten, 16 Scans und einer spektralen Weite von 21 ppm in der ^1H und 24,6 ppm in der ^{15}N Dimension. **C)** HNN-COSY gemessen bei 800 MHz mit 1500 /256 Punkten, 32 Scans und einer spektralen Weite von 20,8 ppm in der ^1H und 90,4 ppm in der ^{15}N Dimension.

Regionen um die Nukleotiden 354, 382-383 und 377 Helices annehmen. Diese Vorhersagen konnten über die Sekundärstrukturbestimmung mittel NMR (Abb. 52) nur teilweise nachvollzogen werden.

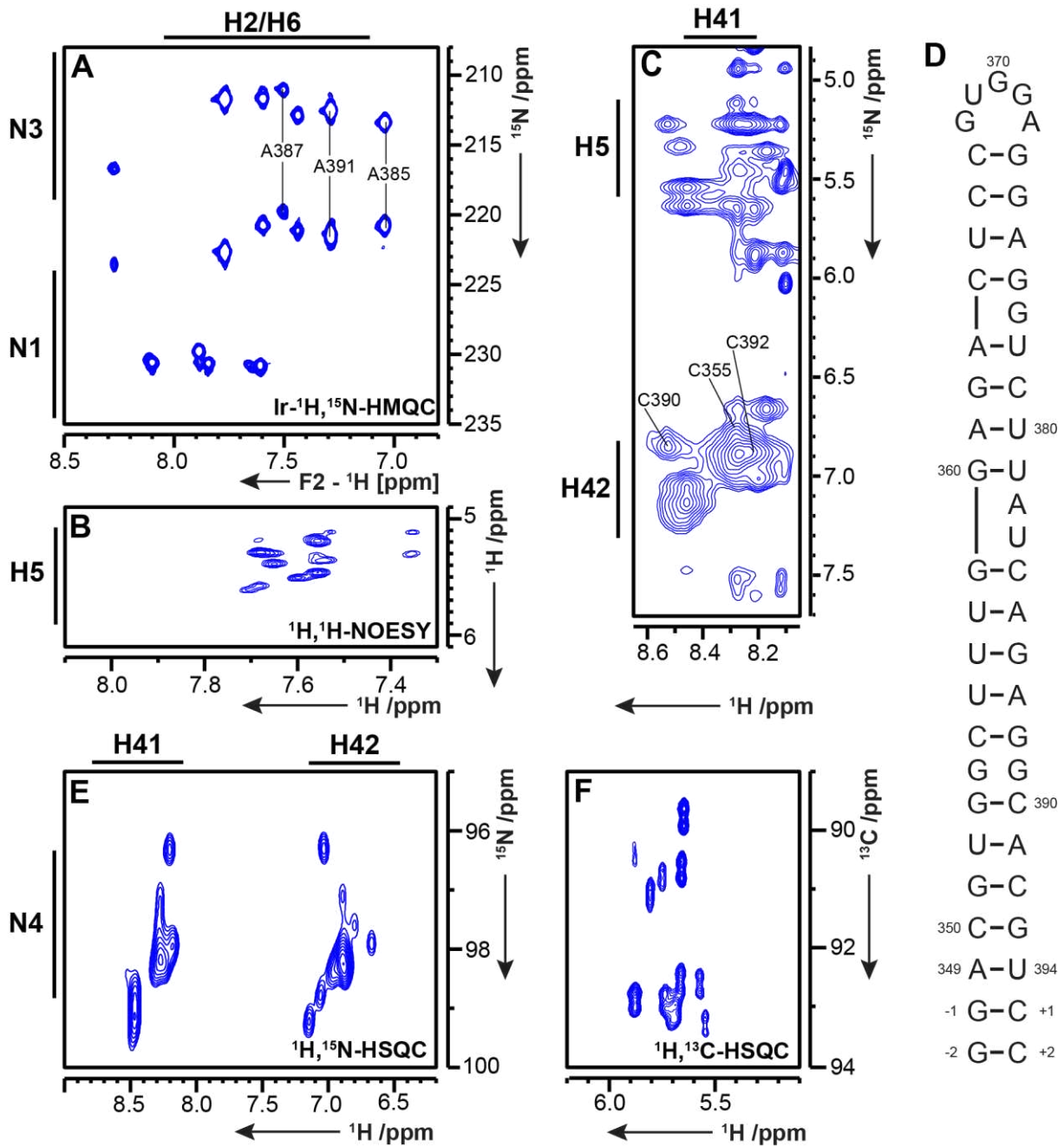


Abbildung 53: Ausschnitte aus den Spektren **A**) Ir- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC, **B**) $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY, **C**) $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY, **E**) $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC und **F**) $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC des Konstrukts 5_SL7. Die gezeigten Ausschnitte dienen dazu, die Zuordnung der Amino-Protonen (H41, H42) und Stickstoffe(N4), der aromatischen Protonen (H2,H6) und der zu ihnen benachbarten Atome (N1, N3, H5) sowie der Zucker Atome (H1' und C1') zu verdeutlichen. Abbildung entnommen aus Wacker et. al 2020²⁵⁴. **A**) Ir- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC gemessen bei 800 MHz mit 1024 /192 Punkten, 32 Scans, einer spektralen Weite von 10 ppm in der ^1H und 78 ppm in der ^{15}N Dimension sowie einem Δ von 20 ms. **B**) $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY gemessen bei 700 MHz mit 1752/512 Punkten, 128 Scans, einer Mischzeit von 150 ms und einer spektralen Weite von 21 ppm in der ersten und 11,9 ppm in der zweiten Dimension. **C**) $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY gemessen bei 800 MHz mit 2048/352 Punkten, 256 Scans, einer Mischzeit von 150 ms und einer spektralen Weite von 21 ppm in der ersten und 11,9 ppm in der zweiten Dimension. **E**) $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC und **F**) $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC gemessen bei 700 MHz mit 1024 /256 Punkten, 16 Scans und einer spektralen Weite von 8,7 ppm in der ^1H und 20 ppm in der ^{13}C Dimension.

Über die sequenzielle Zuordnung der Iminoprotonen in einem $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY (Abb. 52 A) konnte die Existenz der Helix 351-353/390-392 und 355-358/385-388 nachgewiesen werden. Die Identität der zugeordneten Nukleotide wurde mittels $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -BestTROSY und HNN-COSY (Abb. 50 B und C) überprüft. Problematisch beim 5_SL7 Konstrukt erwies sich die Tatsache, dass die helicalen Bereiche G-2-C350/G393-C+2 und C364-C367/G373-G376 beide eine G-U-G-G Signalfolge in der sequenziellen Zuordnung ergeben. Diese Signalabfolge konnte aber nur einmal im $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY (Abb 52 A grüner Pfad) gefunden werden und über die Kreuzsignale ließ sich nicht eindeutig zuordnen, welche der beiden Möglichkeiten die richtige ist. Dass allerdings nur ein Signalpfad gefunden werden konnte, der dieser Signalfolge entspricht, deutet darauf hin, dass entweder das Ende oder die Bogenregion von 5_SL7 deutlich instabiler ist, als es die Sekundärstrukturvorhersage vermuten lässt. Eine weitere Eigenschaft des Konstruktes besteht darin, dass die Nukleotide um die G354:G389 in allen Spektren vermutlich Signale für eine zweite Konformation aufweisen. Die G:G Fehlpaarung wirkt wahrscheinlich wie ein Scharnier und sorgt für zwei leicht unterschiedlich gekippte Konformationen von 5_SL7. Ausgehend von den initialen Iminozuordnungen konnten die chemischen Verschiebungen weiterer Signale ermittelt und die Iminozuordnungen überprüft werden. Die starken UH3/AH2 Kreuzsignale im $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY ermöglichen, die AH2 Verschiebungen des zugeordneten A:U Basenpaars zu bestimmen. Durch ein Langreichweiten $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HMQC können die an C2 kovalent gebundenen H2 Protonen mit den zu C2 benachbarten Stickstoffen N1 und N3 korreliert werden (Abb. 53 A). Eine weitere sehr charakteristische Gruppe an Signalen im $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY in Wasser sind die Kreuzsignale der CH41/H42 Aminoprotonen. Diese hier sehr breiten Signale (Abb. 53 C) sind über ihre Kreuzsignale mit dem basenpaarenden Guanin H1 zuzuordnen, wenn ein eindeutiger Schwerpunkt des CH41/H42 Kreuzsignals bestimmt werden kann. Mit den bekannten H41 Verschiebungen können theoretisch die CH5 Protonen wie in Abb. 53 C und die CN4 Stickstoffe (Abb. 53 E) zugeordnet werden. Aufgrund der Signalüberlagerung, ausgelöst durch die Größe und die vermuteten zwei Konformationen der Probe, war dies für 5_SL7 nicht möglich. Daher konnte die weitere sequenzielle Zuordnung, wie für 5_SL1 in 6.3.1 beschrieben, nicht durchgeführt werden, auch wenn die nötigen nachfolgenden Spektren mit annehmbarer Auflösung aufgenommen werden konnten, wie in Abb 53 B, E und F zu sehen ist. Ausgehend von den AH2 Protonen könnte theoretisch die sequenzielle Zuordnung der aromatischen Protonen (H5, H6 und H8) mit den H1' Zuckerprotonen durchgeführt werden. Dies scheiterte bei 5_SL7 allerdings auch an der massiven Signalüberlagerung in diesem Bereich des $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY. Somit konnte für 5_SL7 nur ein Ausschnitt der Sekundärstruktur bestätigt werden, so dass der Rest der Struktur fraglich bleibt. Die gefundenen Hinweise auf die Dynamik des Fragments könnten sich allerdings für zukünftige Untersuchungen als hilfreich erweisen.

7 Quellen

- (1) Miao, L.; Zhang, Y.; Huang, L. mRNA Vaccine for Cancer Immunotherapy. *Mol. Cancer* **2021**, *20* (41), 1–23. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01335-5>.
- (2) Regulski, E. E.; Breaker, R. R. *In-Line Probing Analysis of Riboswitches*, 419th ed.; Humana Press, New York, NY, 2008. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-59745-033-1_4.
- (3) Leontis, N. B.; Westhof, E. Geometric Nomenclature and Classification of RNA Base Pairs. *Rna* **2001**, *7* (4), 499–512. <https://doi.org/10.1017/S1355838201002515>.
- (4) Varani, G.; McClain, W. H. The G-U Wobble Base Pair Diverse Biological Systems. *EMBO Rep.* **2000**, *1* (1), 18–23.
- (5) Hendrix, D. K.; Brenner, S. E.; Holbrook, S. R. RNA Structural Motifs: Building Blocks of a Modular Biomolecule. *Q. Rev. Biophys.* **2005**, *38* (3), 221–243. <https://doi.org/10.1017/S0033583506004215>.
- (6) Antao, V. P.; Lai, S. Y.; Tinoco, I. A Thermodynamic Study of Unusually Stable RNA and DNA Hairpins. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19* (21), 5901–5905. <https://doi.org/10.1093/nar/19.21.5901>.
- (7) Nozinovic, S.; Fürtig, B.; Jonker, H. R. A.; Richter, C.; Schwalbe, H. High-Resolution NMR Structure of an RNA Model System: The 14-Mer CUUCGg Tetraloop Hairpin RNA. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *38* (2), 683–694. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp956>.
- (8) Correll, C. C.; Swinger, K. Common and Distinctive Features of GNRA Tetraloops Based on a GUAA Tetraloop Structure at 1.4 Å Resolution. *Rna* **2003**, *9* (3), 355–363. <https://doi.org/10.1261/rna.2147803>.
- (9) Schroeder, S.; Kim, J.; Turner, D. H. G·A and U·U Mismatches Can Stabilize RNA Internal Loops of Three Nucleotides. *Biochemistry* **1996**, *35* (50), 16105–16109. <https://doi.org/10.1021/bi961789m>.
- (10) Salmon, L.; Bascom, G.; Andricioaei, I.; Al-Hashimi, H. M. A General Method for Constructing Atomic-Resolution RNA Ensembles Using NMR Residual Dipolar Couplings: The Basis for Interhelical Motions Revealed. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (14), 5457–5466. <https://doi.org/10.1021/ja400920w>.
- (11) Mustoe, A. M.; Al-Hashimi, H. M.; Brooks, C. L. Coarse Grained Models Reveal Essential Contributions of Topological Constraints to the Conformational Free Energy of RNA Bulges. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (10), 2615–2627. <https://doi.org/10.1021/jp411478x>.
- (12) Merriman, D. K.; Yuan, J.; Shi, H.; Majumdar, A.; Herschlag, D.; Al-Hashimi, H. M. Increasing the Length of Poly-Pyrimidine Bulges Broadens RNA Conformational Ensembles with Minimal Impact on Stacking Energetics. *RNA* **2018**, *24* (10), 1363–1376. <https://doi.org/10.1261/rna.066258.118>.
- (13) Mustoe, A. M.; Bailor, M. H.; Teixeira, R. M.; Brooks, C. L.; Al-Hashimi, H. M. New Insights into the Fundamental Role of Topological Constraints as a Determinant of Two-Way Junction Conformation. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (2), 892–904. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr751>.
- (14) Stelzer, A. C.; Frank, A. T.; Kratz, J. D.; Swanson, M. D.; Gonzalez-Hernandez, M. J.; Lee, J.; Andricioaei, I.; Markovitz, D. M.; Al-Hashimi, H. M. Discovery of Selective Bioactive Small Molecules by Targeting an RNA Dynamic Ensemble. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7* (8), 553–559. <https://doi.org/10.1038/nchembio.596>.
- (15) Patwardhan, N. N.; Ganser, L. R.; Kapral, G. J.; Eubanks, C. S.; Lee, J.; Sathyamoorthy, B.; Al-

- Hashimi, H. M.; Hargrove, A. E. Amiloride as a New RNA-Binding Scaffold with Activity against HIV-1 TAR. *Medchemcomm* **2017**, *8* (5), 1022–1036. <https://doi.org/10.1039/C6MD00729E>.
- (16) Eichhorn, C. D.; Feng, J.; Suddala, K. C.; Walter, N. G.; Brooks, C. L.; Al-Hashimi, H. M. Unraveling the Structural Complexity in a Single-Stranded RNA Tail: Implications for Efficient Ligand Binding in the Prequeuosine Riboswitch. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (3), 1345–1355. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr833>.
- (17) Eichhorn, C. D.; Al-Hashimi, H. M. Structural Dynamics of a Single-Stranded RNA - Helix Junction Using NMR. *Rna* **2014**, *20* (6), 782–791. <https://doi.org/10.1261/rna.043711.113>.
- (18) Butcher, S. E.; Pyle, A. M. The Molecular Interactions That Stabilize RNA Tertiary Structure: RNA Motifs, Patterns, and Networks. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (12), 1302–1311. <https://doi.org/10.1021/ar200098t>.
- (19) Kim, S. H.; Suddath, F. L.; Quigley, G. J.; McPherso, A.; Sussman, J. L.; Wang, A. H. J.; Seeman, N. C.; Rich, A. Three-Dimensional Tertiary Structure of Yeast Phenylalanine Transfer RNA. *Science (80-.).* **1974**, *185* (August), 435–440.
- (20) Lescoute, A.; Westhof, E. Topology of Three-Way Junctions in Folded RNAs. *Rna* **2006**, *12* (1), 83–93. <https://doi.org/10.1261/rna.2208106>.
- (21) Nissen, P.; Ippolito, J. A.; Ban, N.; Moore, P. B.; Steitz, T. A. RNA Tertiary Interactions in the Large Ribosomal Subunit: The A-Minor Motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2001**, *98* (9), 4899–4903. https://doi.org/10.1142/9789811215865_0061.
- (22) Ikawa, Y.; Naito, D.; Aono, N.; Shiraishi, H.; Inoue, T. A Conserved Motif in Group IC3 Introns Is a New Class of GNRA Receptor. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27* (8), 1859–1865. <https://doi.org/10.1093/nar/27.8.1859>.
- (23) Weinberg, Z.; Barrick, J. E.; Yao, Z.; Roth, A.; Kim, J. N.; Gore, J.; Wang, J. X.; Lee, E. R.; Block, K. F.; Sudarsan, N.; Neph, S.; Tompa, M.; Ruzzo, W. L.; Breaker, R. R. Identification of 22 Candidate Structured RNAs in Bacteria Using the CMfinder Comparative Genomics Pipeline. **2007**, *35* (14), 4809–4819. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm487>.
- (24) Romling, U.; Galperin, M. Y.; Gomelsky, M. Cyclic Di-GMP: The First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2013**, *77* (1), 1–52. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00043-12>.
- (25) Ryjenkov, D. A.; Tarutina, M.; Moskvina, O. V.; Gomelsky, M. Cyclic Diguanylate Is a Ubiquitous Signaling Molecule in Bacteria: Insights into Biochemistry of the GGDEF Protein Domain. *J. Bacteriol.* **2005**, *187* (5), 1792–1798. <https://doi.org/10.1128/JB.187.5.1792-1798.2005>.
- (26) Simm, R.; Morr, M.; Kader, A.; Nimtz, M.; Römling, U. GGDEF and EAL Domains Inversely Regulate Cyclic Di-GMP Levels and Transition from Sessibility to Motility. *Mol. Microbiol.* **2004**, *53* (4), 1123–1134. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04206.x>.
- (27) Wang, F.; Wang, Y.; Cen, C.; Fu, L.; Wang, Y. A Tandem GGDEF-EAL Domain Protein-Regulated c-Di-GMP Signal Contributes to Spoilage-Related Activities of *Shewanella Baltica* OS155. *Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol.* **2020**, *104*, 2205–2216.
- (28) Stelitano, V.; Giardina, G.; Paiardini, A.; Castiglione, N.; Cutruzzolà, F.; Rinaldo, S. C-Di-GMP Hydrolysis by *Pseudomonas Aeruginosa* HD-GYP Phosphodiesterases: Analysis of the Reaction Mechanism and Novel Roles for PGpG. *PLoS One* **2013**, *8* (9), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074920>.
- (29) Bordeleau, E.; Fortier, L. C-Di-GMP Turn-Over in *Clostridium Difficile* Is Controlled by a Plethora of Diguanylate Cyclases and Phosphodiesterases. **2011**, *7* (3).

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002039>.

- (30) Amikam, D.; Galperin, M. Y. PilZ Domain Is Part of the Bacterial C-Di-GMP Binding Protein. *Bioinformatics* **2006**, *22* (1), 3–6. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti739>.
- (31) Benach, J.; Swaminathan, S. S.; Tamayo, R.; Handelman, S. K.; Folta-Stogniew, E.; Ramos, J. E.; Forouhar, F.; Neely, H.; Seetharaman, J.; Camilli, A.; Hunt, J. F. The Structural Basis of Cyclic Diguanylate Signal Transduction by PilZ Domains. *EMBO J.* **2007**, *26* (24), 5153–5166. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601918>.
- (32) Ramelot, T. A.; Yee, A.; Cort, J. R.; Semesi, A.; Arrowsmith, C. H.; Kennedy, M. A. NMR Structure and Binding Studies Confirm That PA4608 from *Pseudomonas Aeruginosa* Is a PilZ Domain and a C-di-GMP Binding Protein. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2007**, *66* (2), 266–271.
- (33) D. Boyd, C.; O'Toole, G. A. Second Messenger Regulation of Biofilm Formation: Breakthroughs in Understanding c-Di-GMP Effector Systems. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2012**, *28*, 439–462. <https://doi.org/doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155705>.
- (34) Krasteva, P.; Fong, J. C. N.; Shikuma, N. J.; Beyhan, S.; Navarro, M.; Yildiz, F. H.; Sondermann, H. *Vibrio Cholerae* VpsT Regulates Matrix Production and Motility by Directly Sensing Cyclic Di-GMP. *Science (80-.)*. **2010**, *327* (5967), 866–868. <https://doi.org/10.1126/science.1181185.Vibrio>.
- (35) Zhang, Z.; Gaffney, B. L.; Jones, R. A. C-Di-GMP Displays A Monovalent Metal Ion-Dependent Polymorphism. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (51), 16700–16701. <https://doi.org/10.1021/ja0449832>.
- (36) Nakayama, S.; Kelsey, I.; Wang, J.; Sintim, H. O. C-Di-GMP Can Form Remarkably Stable G-Quadruplexes at Physiological Conditions in the Presence of Some Planar Intercalators. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (16), 4766–4768. <https://doi.org/10.1039/c0cc05432a>.
- (37) Zhang, Z.; Kim, S.; Gaffney, B. L.; Jones, R. A. Polymorphism of the Signaling Molecule C-Di-GMP. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (21), 7015–7024. <https://doi.org/10.1021/ja0613714>.
- (38) Oglesby, L. L.; Jain, S.; Ohman, D. E. Membrane Topology and Roles of *Pseudomonas Aeruginosa* Alg8 and Alg44 in Alginate Polymerization Lashanda. *Microbiology* **2008**, *154* (6), 1605–1615. <https://doi.org/doi:10.1099/mic.0.2007/015305-0>.
- (39) Merighi, M.; Lee, V. T.; Hyodo, M.; Hayakawa, Y.; Lory, S. The Second Messenger Bis-(3'-5')-Cyclic-GMP and Its PilZ Domain-Containing Receptor Alg44 Are Required for Alginate Biosynthesis in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **2007**, *65* (4), 876–895. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05817.x>.
- (40) Pitzer, J. E.; Sultan, S. Z.; Hayakawa, Y.; Hobbs, G.; Miller, M. R.; Motaleb, M. A. Analysis of the *Borrelia Burgdorferi* Cyclic-Di-GMP-Binding Protein PlzA Reveals a Role in Motility and Virulence. *Infect. Immun.* **2011**, *79* (5), 1815–1825. <https://doi.org/10.1128/IAI.00075-11>.
- (41) Freedman, J. C.; Rogers, E. A.; Kostick, J. L.; Zhang, H.; Iyer, R.; Schwartz, I.; Marconi, R. T. Identification and Molecular Characterization of a Cyclic-Di-GMP Effector Protein, PlzA (BB0733): Additional Evidence for the Existence of a Functional Cyclic-Di-GMP Regulatory Network in the Lyme Disease Spirochete, *Borrelia Burgdorferi*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2010, pp 285–294. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00635.x>.
- (42) Christen, M.; Christen, B.; Allan, M. G.; Folcher, M.; Jenö, P.; Grzesiek, S.; Jenal, U. DgrA Is a Member of a New Family of Cyclic Diguanosine Monophosphate Receptors and Controls Flagellar Motor Function in *Caulobacter Crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (10), 4112–4117. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607738104>.

- (43) Ross, P.; Weinhouse, H.; Aloni, Y.; Michaeli, D.; Weinberger-Ohana, P.; Mayer, R.; Braun, S.; Vroom, E. de; Marel, G. A. van der; Boom, J. H. van; Benziman, M. Regulation of Cellulose Synthesis in *Acetobacter Xylinum* by Cyclic Diguanylic Acid. *Nature* **1987**, *325* (6101), 279–281.
- (44) Ryjenkov, D. A.; Simm, R.; Römling, U.; Gomelsky, M. The PilZ Domain Is a Receptor for the Second Messenger C-Di-GMP: The PilZ Domain Protein YcgR Controls Motility in Enterobacteria. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (41), 30310–30314. <https://doi.org/10.1074/jbc.C600179200>.
- (45) Pratt, J. T.; Tamayo, R.; Tischler, A. D.; Camilli, A. PilZ Domain Proteins Bind Cyclic Diguanylate and Regulate Diverse Processes in *Vibrio Cholerae*. *J Biol Chem.* **2007**, *282* (17), 12860–12870. <https://doi.org/doi:10.1074/jbc.M611593200>. PilZ.
- (46) Wilksch, J. J.; Yang, J.; Clements, A.; Gabbe, J. L.; Short, K. R.; Cao, H.; Cavaliere, R.; James, C. E.; Whitchurch, C. B.; Schembri, M. A.; Chuah, M. L. C.; Liang, Z. X.; Wijburg, O. L.; Jenney, A. W.; Lithgow, T.; Strugnell, R. A. MrKH, a Novel c-Di-GMP-Dependent Transcriptional Activator, Controls *Klebsiella Pneumoniae* Biofilm Formation by Regulating Type 3 Fimbriae Expression. *PLoS Pathog.* **2011**, *7* (8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002204>.
- (47) Hickman, Jason; Harwood, C. Identification of FleQ from *Pseudomonas Aeruginosa* as a C-Di-GMP-Responsive Transcription Factor. *Mol Microbiol.* **2008**, *69* (2), 376–389. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06281.x>. Identification.
- (48) Srivastava, D.; Hsieh, M. L.; Khataokar, A.; Neiditch, M. B.; Waters, C. M. Cyclic Di-GMP Inhibits *Vibrio Cholerae* Motility by Repressing Induction of Transcription and Inducing Extracellular Polysaccharide Production. *Mol. Microbiol.* **2013**, *90* (6), 1262–1276. <https://doi.org/10.1111/mmi.12432>.
- (49) Leduc, J. L.; Roberts, G. P. Cyclic Di-GMP Allosterically Inhibits the CRP-like Protein (Clp) of *Xanthomonas Axonopodis* Pv. Citri. *J. Bacteriol.* **2009**, *191* (22), 7121–7122. <https://doi.org/10.1128/JB.00845-09>.
- (50) Chin, K.-H.; Lee, Y.-C.; Tu, Z.-L.; Chen, C.-H.; Tseng, Y.-H.; Wang, J.-M.; Ryan, R. P.; McCarthy, Y.; Dow, J. M.; H.-J., A.; Chou, S.-H. The CAMP Receptor-Like Protein CLP Is a Novel c-Di-GMP Receptor Linking Cell–Cell Signaling to Virulence Gene Expression in *Xanthomonas Campestris*. *J. Mol. Biol.* **2010**, *396* (3), 646–662.
- (51) Tao, F.; He, Y. W.; Wu, D. H.; Swarup, S.; Zhang, L. H. The Cyclic Nucleotide Monophosphate Domain of *Xanthomonas Campestris* Global Regulator Clp Defines a New Class of Cyclic Di-GMP Effectors. *J. Bacteriol.* **2010**, *192* (4), 1020–1029. <https://doi.org/10.1128/JB.01253-09>.
- (52) Fazli, M.; O’Connell, A.; Nilsson, M.; Niehaus, K.; Dow, J. M.; Givskov, M.; Ryan, R. P.; Tolker-Nielsen, T. The CRP/FNR Family Protein Bcam1349 Is a c-Di-GMP Effector That Regulates Biofilm Formation in the Respiratory Pathogen *Burkholderia Cenocepacia*. *Mol. Microbiol.* **2011**, *82* (2), 327–341. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07814.x>.
- (53) Qi, Y.; Chuah, M. L. C.; Dong, X.; Xie, K.; Luo, Z.; Tang, K.; Liang, Z. X. Binding of Cyclic Diguanylate in the Non-Catalytic EAL Domain of FimX Induces a Long-Range Conformational Change. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (4), 2910–2917. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.196220>.
- (54) Huang, B.; Whitchurch, C. B.; Mattick, J. S. FimX, a Multidomain Protein Connecting Environmental Signals to Twitching Motility in *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **2003**, *185* (24), 7068–7076. <https://doi.org/10.1128/JB.185.24.7068-7076.2003>.
- (55) Kazmierczak, B. I.; Lebron, M. B.; Murray, T. S. Analysis of FimX, a Phosphodiesterase That Governs Twitching Motility in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **2006**, *60* (4), 1026–1043. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05156.x>.

- (56) Navarro, M. V. A. S.; De, N.; Bae, N.; Wang, Q.; Sondermann, H. Structural Analysis of the GGDEF-EAL Domain-Containing c-Di-GMP Receptor FimX. *Structure* **2009**, *17* (8), 1104–1116. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.06.010>.
- (57) Lee, V. T.; Matewish, J. M.; Kessler, J. L.; Hyodo, M.; Hayakawa, Y.; Lory, S. A Cyclic-Di-GMP Receptor Required for Bacterial Exopolysaccharide Production. *Mol. Microbiol.* **2007**, *65* (6), 1474–1484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05879.x>.
- (58) Duerig, A.; Abel, S.; Folcher, M.; Nicollier, M.; Schwede, T.; Amiot, N.; Giese, B.; Jenal, U. Second Messenger-Mediated Spatiotemporal Control of Protein Degradation Regulates Bacterial Cell Cycle Progression. *Genes Dev.* **2009**, *23* (1), 93–104. <https://doi.org/10.1101/gad.502409>.
- (59) Abel, S.; Chien, P.; Wassmann, P.; Schirmer, T.; Kaefer, V.; Laub, M. T.; Baker, T. A.; Jenal, U. Regulatory Cohesion of Cell Cycle and Cell Differentiation through Interlinked Phosphorylation and Second Messenger Networks. *Mol. Cell* **2011**, *43* (4), 550–560. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.018>.
- (60) Tuckerman, J. R.; Gonzalez, G.; Gilles-Gonzalez, M.-A. Cyclic Di-GMP Activation of Polynucleotide Phosphorylase Signal-Dependent RNA Processing. *J Mol Biol.* **2011**, *407* (5), 633–639. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.02.019>.
- (61) Srivastava, D.; Harris, R. C.; Waters, C. M. Integration of Cyclic Di-GMP and Quorum Sensing in the Control of VpsT and AphA in *Vibrio Cholerae*. *J. Bacteriol.* **2011**, *193* (22), 6331–6341. <https://doi.org/10.1128/JB.05167-11>.
- (62) Chambers, J. R.; Liao, J.; Schurr, M. J.; Sauer, K. BrIR from *Pseudomonas Aeruginosa* Is a C-Di-GMP-Responsive Transcription Factor. *Mol Microbiol.* **2014**, *92* (3), 471–487. <https://doi.org/doi:10.1111/mmi.12562>. BrIR.
- (63) Winkler, W.; Nahvi, A.; Breaker, R. R. Thiamine Derivatives Bind Messenger RNAs Directly to Regulate Bacterial Gene Expression. *Nature* **2002**, *419* (6910), 952–956. <https://doi.org/10.1038/nature01145>.
- (64) Nahvi, A.; Sudarsan, N.; Ebert, M. S.; Zou, X.; Brown, K. L.; Breaker, R. R. Genetic Control by a Metabolite Binding mRNA. *Chem. Biol.* **2002**, *9* (9), 1043–1049. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00224-7](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00224-7).
- (65) Mironov, A. S.; Gusarov, I.; Rafikov, R.; Lopez, L. E.; Shatalin, K.; Kreneva, R. A.; Perumov, D. A.; Nudler, E. Sensing Small Molecules by Nascent RNA: A Mechanism to Control Transcription in Bacteria. *Cell* **2002**, *111* (5), 747–756. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01134-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01134-0).
- (66) Breaker, R. R. Riboswitches and the RNA World. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4* (2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003566>.
- (67) Vitreschak, A. G.; Rodionov, D. A.; Mironov, A. A.; Gelfand, M. S. Riboswitches: The Oldest Mechanism for the Regulation of Gene Expression? *Trends Genet.* **2004**, *20* (1), 44–50.
- (68) Mccown, P. J.; Corbino, K. A.; Stav, S.; Sherlock, M. E.; Breaker, R. R. Riboswitch Diversity and Distribution. *Rna* **2017**, *23* (7), 995–1011. <https://doi.org/10.1261/rna.061234.117>.
- (69) Serganov, A.; Nudler, E. A Decade of Riboswitches. *Cell.* **2013**, *152* (0), 17–24. <https://doi.org/10.1038/nature13314.A>.
- (70) Bocobza, S.; Adato, A.; Mandel, T.; Shapira, M.; Nudler, E.; Aharoni, A. Riboswitch-Dependent Gene Regulation and Its Evolution in the Plant Kingdom. *Genes Dev.* **2007**, *21* (22), 2874–2879. <https://doi.org/10.1101/gad.443907>.
- (71) Sudarsan, N.; Barrick, J. E.; Breaker, R. R. Metabolite-Binding RNA Domains Are Present in the

- Genes of Eukaryotes. *Rna* **2003**, 9 (6), 644–647. <https://doi.org/10.1261/rna.5090103>.
- (72) Choudhary, P. K.; Duret, A.; Rohrbach-Brandt, E.; Holliger, C.; Sigel, R. K. O.; Maillard, J. Diversity of Cobalamin Riboswitches in the Corrinoid-Producing Organohalide Respirer Desulfitobacterium Hafniense. *J. Bacteriol.* **2013**, 195 (22), 5186–5195. <https://doi.org/10.1128/JB.00730-13>.
- (73) Johnson, E. J. J.; Reyes, F. E.; Polaski, J. T.; Batey, R. T. B12 Cofactors Directly Stabilize an mRNA Regulatory Switch. *Nature* **2012**, 492 (7427), 133–137. <https://doi.org/10.1038/nature11607.B>.
- (74) Vicens, Q.; Mondragón, E.; Reyes, F. E.; Coish, P.; Berman, J.; Kaur, H.; Kells, K. W.; Wickens, P.; Wilson, J.; Gadwood, R. C.; Schostarez, H. J.; Suto, R. K.; Blount, K. F.; Batey, R. T. Structure-Activity Relationship of Flavin Analogs That Target the FMN Riboswitch. *ACS Chem Biol.* **2018**, 13 (10), 2908–2919. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00533.Structure-activity>.
- (75) Pedrolli, D. B.; Matern, A.; Wang, J.; Ester, M.; Siedler, K.; Breaker, R.; MacK, M. A Highly Specialized Flavin Mononucleotide Riboswitch Responds Differently to Similar Ligands and Confers Roseoflavin Resistance to *Streptomyces Davawensis*. *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40 (17), 8662–8673. <https://doi.org/10.1093/nar/gks616>.
- (76) Trausch, J. J.; Batey, R. A Disconnect between High Affinity Binding and Efficient Regulation by Antifolates and Purines in the Tetrahydrofolate (THF) Riboswitch. *Chem Biol.* **2014**, 21 (2), 205–216. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.11.012.A>.
- (77) Trausch, J. J.; Ceres, P.; Reyes, F. E.; Robert T. Batey. The Structure of a Tetrahydrofolate Sensing Riboswitch Reveals Two Ligand Binding Sites in a Single Aptamer. *Structure.* **2011**, 19 (10), 1413–1423. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.06.019.The>.
- (78) Huang, L.; Ishibe-Murakami, S.; Patel, D. J.; Serganov, A. Long-Range Pseudoknot Interactions Dictate the Regulatory Response in the Tetrahydrofolate Riboswitch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, 108 (36), 14801–14806. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111701108>.
- (79) Chen, X.; Arachchilage, G. M.; Breaker, R. R. Biochemical Validation of a Second Class of Tetrahydrofolate Riboswitches in Bacteria. *Rna* **2019**, 25 (9), 1091–1097. <https://doi.org/10.1261/rna.071829.119>.
- (80) Batey, R. T. Recognition of S-Adenosylmethionine by Riboswitches. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2011**, 2 (2), 299–311. <https://doi.org/10.1002/wrna.63.Recognition>.
- (81) Roth, A.; Breaker, R. R. The Structural and Functional Diversity of Metabolite-Binding Riboswitches. *Annu Rev Biochem.* **2009**, 78, 305–334. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.070507.135656.The>.
- (82) Batey, R. T. Structure and Mechanism of Purine Binding Riboswitches Robert. *Q Rev Biophys.* **2012**, 45 (3), 345–381. <https://doi.org/10.1017/S0033583512000078.Structure>.
- (83) Lemay, J.-F.; Penedo, J. C.; Tremblay, R.; Lilley, D. M. J.; Lafontaine, D. A. L. Folding of the Adenine Riboswitch. *Chem. Biol.* **2006**, 13 (8), 857–868.
- (84) Edwards, A. L.; Batey, R. T. A Structural Basis for the Recognition of 2'-Deoxyguanosine by the Purine Riboswitch. *J. Mol. Biol.* **2009**, 385 (3), 938–948. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.074>.
- (85) Kim, J. N.; Roth, A.; Breaker, R. R. Guanine Riboswitch Variants from *Mesoplasma Florum* Selectively Recognize 2'-Deoxyguanosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104 (41), 16092–16097. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705884104>.
- (86) Noeske, J.; Buck, J.; Fürtig, B.; Nasiri, H. R.; Schwalbe, H.; Wöhnert, J. Interplay of 'induced Fit'

- and Preorganization in the Ligand Induced Folding of the Aptamer Domain of the Guanine Binding Riboswitch. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (2), 572–583.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkl1094>.
- (87) Buck, J.; Wacker, A.; Warkentin, E.; Wöhnert, J.; Wirmer-Bartoschek, J.; Schwalbe, H. Influence of Ground-State Structure and Mg²⁺ Binding on Folding Kinetics of the Guanine-Sensing Riboswitch Aptamer Domain. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39* (22), 9768–9778.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr664>.
- (88) Morris, R. C.; Elliott, M. S. Queuosine Modification of tRNA: A Case for Convergent Evolution. *Mol. Genet. Metab.* **2001**, *74* (1–2), 147–159.
- (89) Eichhorn, C. D.; Kang, M.; Feigon, J. Structure and Function of PreQ1 Riboswitches. *Biochim Biophys Acta.* **2014**, *231839* (110), 939–950.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.04.019>.Structure.
- (90) Green, N. J.; Grundy, F. J.; Henkin, T. M. The T Box Mechanism: tRNA as a Regulatory Molecule. *FEBS Lett.* **2010**, *584* (2), 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.11.056>.
- (91) Kwon, M.; Strobel, S. A. Chemical Basis of Glycine Riboswitch Cooperativity. *RNA* **2008**, *14*, 25–25. <https://doi.org/10.1261/rna.771608.small>.
- (92) Sherman, E. M.; Esquiaqui, J.; Elsayed, G.; Ye, J. D. An Energetically Beneficial Leader-Linker Interaction Abolishes Ligand-Binding Cooperativity in Glycine Riboswitches. *Rna* **2012**, *18* (3), 496–507. <https://doi.org/10.1261/rna.031286.111>.
- (93) Sudarsan, N.; Wickiser, J. K.; Nakamura, S.; Ebert, M. S.; Breaker, R. R. An mRNA Structure in Bacteria That Controls Gene Expression by Binding Lysine. *Genes Dev.* **2003**, *17* (21), 2688–2697. <https://doi.org/10.1101/gad.1140003>.
- (94) Grundy, F. J.; Lehman, S. C.; Henkin, T. M. The L Box Regulon: Lysine Sensing by Leader RNAs of Bacterial Lysine Biosynthesis Genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (21), 12057–12062. <https://doi.org/10.1073/pnas.2133705100>.
- (95) Huang, L.; Wang, J.; Watkins, A. M.; Das, R.; Lilley, D. M. J. Structure and Ligand Binding of the Glutamine-II Riboswitch. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47* (14), 7666–7675.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz539>.
- (96) Klähn, S.; Bolay, P.; Wright, P. R.; Atilho, R. M.; Brewer, K. I.; Hagemann, M.; Breaker, R. R.; Hess, W. R. A Glutamine Riboswitch Is a Key Element for the Regulation of Glutamine Synthetase in Cyanobacteria. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46* (19), 10082–10094.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky709>.
- (97) Ferré-D'Amaré, A. R.; Winkler, W. C. The Roles of Metal Ions in Regulation by Riboswitches. *Met. Ions Life Sci.* **2011**, *9*, 141–173. <https://doi.org/10.1039/9781849732512-00141>.
- (98) Dann, C. E.; Wakeman, C. A.; Sieling, C. L.; Baker, S. C.; Irnov, I.; Winkler, W. C. Structure and Mechanism of a Metal-Sensing Regulatory RNA. *Cell* **2007**, *130* (5), 878–892.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.051>.
- (99) Price, I. R.; Gaballa, A.; Ding, F.; Helmann, J. D.; Ke, A. Mn²⁺-Sensing Mechanisms of YybP-YkoY Orphan Riboswitches. *Mol Cell.* **2015**, *57* (6), 1110–1123.
<https://doi.org/doi:10.1016/j.molcel.2015.02.016>. Mn²⁺-Sensing.
- (100) Martin, J. E.; Le, M. T.; Bhattarai, N.; Capdevila, D. A.; Shen, J.; Winkler, M. E.; Giedroc, D. P. A Mn-Sensing Riboswitch Activates Expression of a Mn²⁺/Ca²⁺ ATPase Transporter in *Streptococcus*. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47* (13), 6885–6899.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz494>.

- (101) Ren, A.; Rajashankar, K. R.; Patel, D. J. Fluoride Ion Encapsulation by Mg²⁺ and Phosphates in a Fluoride Riboswitch. *Nature* **2013**, *486* (7401), 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>.
- (102) Furukawa, K.; Ramesh, A.; Zhou, Z.; Weinberg, Z.; Vallery, T.; Winkler, W. C.; Breaker, R. R. Bacterial Riboswitches Cooperatively Bind Ni²⁺ or Co²⁺ Ions and Control Expression of Heavy Metal Transporters. *Mol Cell*. **2015**, *57* (6), 1088–1098. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.009>.Bacterial.
- (103) Reiss, C. W.; Xiong, Y.; Strobel, S. A. Structural Basis for Ligand Binding to the Guanidine-I Riboswitch. *Structure* **2017**, *25* (1), 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.11.020>.
- (104) Huang, L.; Wang, J.; Lilley, D. M. J. The Structure of the Guanidine-II Riboswitch. *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24* (6), 695-702.e2. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.05.014>.
- (105) Huang, L.; Wang, J.; Wilson, T. J.; Lilley, D. M. J. Structure of the Guanidine III Riboswitch. *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24* (11), 1407-1415.e2. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.08.021>.
- (106) Salvail, H.; Balaji, A.; Yu, D.; Roth, A.; Breake, R. R. Biochemical Validation of a Fourth Guanidine Riboswitch Class in Bacteria. *Biochemistry* **2020**, *59* (49), 4654–4662.
- (107) Nelson, J. W.; Atilho, R. M.; Sherlock, M. E.; Stockbridge, R. B.; Breaker, R. R. Metabolism of Free Guanidine in Bacteria Is Regulated by a Widespread Riboswitch Class. *Mol. Cell* **2017**, *65* (2), 220–230. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.019>.
- (108) Winkler, W. C.; Nahvi, A.; Roth, A.; Collins, J. A.; Breaker, R. R. Control of Gene Expression by a Natural Metabolite-Responsive Ribozyme. *Nature* **2004**, *428* (6980), 281–286. <https://doi.org/10.1038/nature02362>.
- (109) Klein, D. J.; Ferré-D'Amaré, A. R. Structural Basis of GlmS Ribozyme Activation by Glucosamine-6-Phosphate. *Science* (80-.). **2006**, *313* (5794), 1752–1756.
- (110) Cochrane, J. C.; Lipchock, S. V.; Strobel, S. A. Structural Investigation of the GlmS Ribozyme Bound to Its Catalytic Cofactor. *Chem Biol.* **2007**, *14* (1), 97–105.
- (111) Hampel, K. J.; Tinsley, M. M. Evidence for Preorganization of the GlmS Ribozyme Ligand Binding Pocket. *Biochemistry* **2006**, *45* (25), 7861–7871. <https://doi.org/10.1021/bi060337z>.
- (112) Jansen, J. A.; McCarthy, T. J.; Soukup, G. A.; Soukup, J. K. Backbone and Nucleobase Contacts to Glucosamine-6-Phosphate in the GlmS Ribozyme. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13* (6), 517–523. <https://doi.org/10.1038/nsmb1094>.
- (113) Xin, Y.; Hamelberg, D. Deciphering the Role of Glucosamine-6-Phosphate in the Riboswitch Action of GlmS Ribozyme. *RNA* **2010**, *16* (12), 2455–2463. <https://doi.org/10.1261/rna.2334110>.
- (114) Li, S.; Hwang, X. Y.; Stav, S.; Breaker, R. R. The YjdF Riboswitch Candidate Regulates Gene Expression by Binding Diverse Azaaromatic Compounds. *Rna* **2016**, *22* (4), 530–541. <https://doi.org/10.1261/rna.054890.115>.
- (115) Gusarov, I.; Nudler, E. The Mechanism of Intrinsic Transcription Termination. **1999**, *3*, 495–504.
- (116) Steinert, H.; Sochor, F.; Wacker, A.; Buck, J.; Helmling, C.; Hiller, F.; Keyhani, S.; Noeske, J.; Grimm, S.; Rudolph, M. M.; Keller, H.; Mooney, R. A.; Landick, R.; Suess, B.; Fürtig, B.; Wöhnert, J.; Schwalbe, H. Pausing Guides RNA Folding to Populate Transiently Stable RNA Structures for Riboswitch-Based Transcription Regulation. *Elife* **2017**, *6*, 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.21297>.

- (117) Keene, R. G.; Mueller, A.; Landick, R.; London, L. Transcriptional Pause, Arrest and Termination Sites for RNA Polymerase II in Mammalian N- and c-Myc Genes. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27* (15), 3173–3182. <https://doi.org/10.1093/nar/27.15.3173>.
- (118) Ray-soni, A.; Bellecourt, M. J.; Landick, R. Mechanisms of Bacterial Transcription Termination : All Good Things Must End. **2016**, 319–350. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014844>.
- (119) Komissarova, N.; Becker, J.; Solter, S.; Kireeva, M.; Kashlev, M. Shortening of RNA:DNA Hybrid in the Elongation Complex of RNA Polymerase Is a Prerequisite for Transcription Termination. *Mol. Cell* **2002**, *10* (5), 1151–1162. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00738-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00738-4).
- (120) Touloukhonov, I.; Zhang, J.; Palangat, M.; Landick, R. A Central Role of the RNA Polymerase Trigger Loop in Active-Site Rearrangement during Transcriptional Pausing. *Mol. Cell* **2007**, *27* (3), 406–419. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.008>.
- (121) Yin, H.; Artsimovitch, I.; Landick, R.; Gelles, J. Nonequilibrium Mechanism of Transcription Termination from Observations of Single RNA Polymerase Molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96* (23), 13124–13129. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13124>.
- (122) Kashlev, M.; Komissarova, N. Transcription Termination: Primary Intermediates and Secondary Adducts. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (17), 14501–14508. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200215200>.
- (123) Larson, M. H.; Greenleaf, W. J.; Landick, R.; Block, S. M. Applied Force Reveals Mechanistic and Energetic Details of Transcription Termination. *Cell*. **2008**, *132* (6), 971–982.
- (124) Epshtein, V.; Cardinale, C. J.; Ruckenstein, A. E.; Borukhov, S.; Nudler, E. An Allosteric Path to Transcription Termination. *Mol. Cell* **2007**, *28* (6), 991–1001. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.011>.
- (125) Lowery Goldhammer, C.; Richardson, J. P. An RNA Dependent Nucleoside Triphosphate Phosphohydrolase (ATPase) Associated with Rho Termination Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1974**, *71* (5), 2003–2007. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.5.2003>.
- (126) McSwigge, J. A.; Bear, D. G.; von Hippel, P. H. Interactions of Escherichia Coli Transcription Termination Factor Rho with RNA. I. Binding Stoichiometries and Free Energies. *J Mol Biol.* **1988**, *199* (4), 609–622. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90305-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90305-1).
- (127) Koslover, D. J.; Fazal, F. M.; Mooney, R. A.; Landick, R.; Block, S. M. Binding and Translocation of Termination Factor Rho Studied at the Single-Molecule Level. *J Mol Biol.* **2012**, *423* (5), 664–676. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.07.027>.
- (128) Ding Jun Jin; Burgess, R. R.; Richardson, J. P.; Gross, C. A. Termination Efficiency at Rho-Dependent Terminators Depends on Kinetic Coupling between RNA Polymerase and Rho. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89* (4), 1453–1457. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.4.1453>.
- (129) Johnson, G. E.; Lalanne, J. B.; Peters, M. L.; Li, G. W. Functionally Uncoupled Transcription–Translation in *Bacillus Subtilis*. *Nature* **2020**, *585* (7823), 124–128. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2638-5>.
- (130) Wickiser, J. K.; Winkler, W. C.; Breaker, R. R.; Crothers, D. M. The Speed of RNA Transcription and Metabolite Binding Kinetics Operate an FMN Riboswitch. *Mol. Cell* **2005**, *18* (1), 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.02.032>.
- (131) Neuman, K. C.; Abbondanzieri, E. A.; Landick, R.; Gelles, J.; Block, S. M. Ubiquitous Transcriptional Pausing Is Independent of RNA Polymerase Backtracking. *Cell* **2003**, *115* (4),

437–447. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00845-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00845-6).

- (132) Davenport, R. J.; Wuite, G. J. L.; Landick, R.; Bustamante, C. Single-Molecule Study of Transcriptional Pausing and Arrest by *E. Coli* RNA Polymerase. *Science (80-.)*. **2000**, *287* (5462), 2497–2500. <https://doi.org/10.1126/science.287.5462.2497>.
- (133) Kireeva, M. L.; Kashlev, M. Mechanism of Sequence-Specific Pausing of Bacterial RNA Polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (22), 8900–8905. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900407106>.
- (134) Watters, K. E.; Strobel, E. J.; Yu, A. M.; Lis, J. T.; Lucks, J. B. Cotranscriptional Folding of a Riboswitch at Nucleotide Resolution. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23* (12), 1124–1131. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3316>.
- (135) Hua, B.; Jones, C. P.; Mitra, J.; Murray, P. J.; Rosenthal, R.; Ferré-D’Amaré, A. R.; Ha, T. Real-Time Monitoring of Single ZTP Riboswitches Reveals a Complex and Kinetically Controlled Decision Landscape. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18283-1>.
- (136) Kramer, F. R.; Mills, D. Secondary Structure Formation during RNA Synthesis Nucleic. *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9* (19), 698–703.
- (137) Plumridge, A.; Katz, A. M.; Calvey, G. D.; Elber, R.; Kirmizialtin, S.; Pollack, L. Revealing the Distinct Folding Phases of an RNA Three-Helix Junction. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46* (14), 7354–7365. <https://doi.org/10.1093/nar/gky363>.
- (138) Mustoe, A. M.; Brooks, C. L.; Al-Hashimi, H. M. Hierarchy of RNA Functional Dynamics Anthony. *Annu Rev Biochem.* **2014**, *83*, 441–466. <https://doi.org/doi:10.1146/annurev-biochem-060713-035524>.
- (139) Kuznetsov, S. V.; Ansari, A. A Kinetic Zipper Model with Intrachain Interactions Applied to Nucleic Acid Hairpin Folding Kinetics. *Biophys. J.* **2012**, *102* (1), 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.11.4017>.
- (140) Barrick, J. E.; Corbino, K. A.; Winkler, W. C.; Nahvi, A.; Mandal, M.; Collins, J.; Lee, M.; Roth, A.; Sudarsan, N.; Jona, I.; Wickiser, J. K.; Breaker, R. R. New RNA Motifs Suggest an Expanded Scope for Riboswitches in Bacterial Genetic Control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (17), 6421–6426. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308014101>.
- (141) Block, K. F.; Hammond, M. C.; Breaker, R. R. Evidence for Widespread Gene Control Function by the YdaO Riboswitch Candidate. *J. Bacteriol.* **2010**, *192* (15), 3983–3989. <https://doi.org/10.1128/JB.00450-10>.
- (142) Nelson, J. W.; Sudarsan, N.; Furukawa, K.; Weinberg, Z.; Wang, J. X.; Breaker, R. R. Riboswitches in Eubacteria Sense the Second Messenger C-Di-AMP. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9* (12), 834–839. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1363>.
- (143) Wang, X.; Cai, X.; Ma, H.; Yin, W.; Zhu, L.; Li, X.; Lim, H. M.; Chou, S. H.; He, J. A C-Di-AMP Riboswitch Controlling KdpFABC Operon Transcription Regulates the Potassium Transporter System in *Bacillus Thuringiensis*. *Commun. Biol.* **2019**, *2* (1), 151. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0414-6>.
- (144) Jones, C. P.; Ferré-D’Amaré, A. R. Crystal Structure of a C-di-AMP Riboswitch Reveals an Internally Pseudo-dimeric RNA. *EMBO J.* **2014**, *33* (22), 2692–2703. <https://doi.org/10.15252/embj.201489209>.
- (145) Gao, A.; Serganov, A. Structural Insights into Recognition of C-Di-AMP by the YdaO Riboswitch. *Nat Chem Biol.* **2014**, *10* (9), 787–792. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1607>.

- (146) Kim, P. B.; Nelson, J. W.; Breaker, R. R. An Ancient Riboswitch Class in Bacteria Regulates Purine Biosynthesis and One-Carbon Metabolism. *Mol. Cell* **2015**, *57* (2), 317–328. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.001>.
- (147) Jones, C. P.; Ferré-D'Amaré, A. R. Recognition of the Bacterial Alarmone ZMP through Long-Distance Association of Two RNA Sub-Domains. *Nat Struct Mol Biol.* **2015**, *22* (9), 679–685. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3073>. Recognition.
- (148) Ren, A.; Rajashankar, K. R.; Patel, D. J. Global RNA Fold and Molecular Recognition for a Pfl Riboswitch Bound to ZMP, a Master Regulator of One-Carbon Metabolism. *Structure* **2015**, *23* (8), 1375–1381. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.05.016>.
- (149) Binas, O.; Chamber, T.; Schwalbe, H. The Conformational Landscape of Transcription Intermediates Involved in the Regulation of the ZMP-Sensing Riboswitch from *Thermosinus Carboxydvorans*. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48* (12), 6970–6979. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa427>.
- (150) Severin, G. B.; Ramliden, M. S.; Hawver, L. A.; Wang, K.; Pell, M. E.; Kieninger, A. K.; Khataoakar, A.; O'Hara, B. J.; Behrmann, L. V.; Neiditch, M. B.; Benning, C.; Waters, C. M.; Ng, W. L. Direct Activation of a Phospholipase by Cyclic GMP-AMP in El Tor *Vibrio Cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115* (26), E6048–E6055. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801233115>.
- (151) Li, F.; Cimdins, A.; Rohde, M.; Jänsch, L.; Kaefer, V.; Nimtz, M.; Römling, U. DncV Synthesizes Cyclic GMP-AMP and Regulates Biofilm Formation and Motility in *Escherichia Coli* ECOR31. *MBio* **2019**, *10* (2), 1–21. <https://doi.org/10.1128/mBio.02492-18>.
- (152) Kellenberger, C. A.; Wilson, S. C.; Hickey, S. F.; Gonzalez, T. L.; Su, Y.; Hallberg, Z. F.; Brewer, T. F.; Iavarone, A. T.; Carlson, H. K.; Hsieh, Y. F.; Hammond, M. C. GEMM-I Riboswitches from *Geobacter* Sense the Bacterial Second Messenger Cyclic AMP-GMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112* (17), 5383–5388. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419328112>.
- (153) Ren, A.; Wang, X. C.; Kellenberger, C. A.; Rajashankar, K. R.; Jones, R.; Hammond, M. C.; Patel, D. J. Structural Basis for Molecular Discrimination by a 3',3'-CGAMP Sensing Riboswitch. *Cell Rep.* **2015**, *11* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.004>. Structural.
- (154) Li, C.; Zhao, X.; Zhu, X.; Xie, P.; Chen, G. Structural Studies of the 3',3'-CGAMP Riboswitch Induced by Cognate and Noncognate Ligands Using Molecular Dynamics Simulation. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (3527), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms19113527>.
- (155) Nelson, J. W.; Sudarsan, N.; Phillips, G. E.; Stav, S.; Lünse, C. E.; McCown, P. J.; Breaker, R. R. Control of Bacterial Exoelectrogenesis by C-AMP-GMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112* (17), 5389–5394. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419264112>.
- (156) Smith, K. D.; Lipchock, S. V.; Ames, T. D.; Wang, J.; Breaker, R. R.; Strobel, S. A. Structural Basis of Ligand Binding by a C-Di-GMP Riboswitch. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16* (12), 1218–1223. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1702>.
- (157) Lee, E. R.; Baker, J. L.; Weinberg, Z.; Sudarsan, N.; Breaker, R. R. An Allosteric Self-Splicing Ribozyme Triggered by a Bacterial Second Messenger. *Science (80-.)*. **2010**, *329* (5993), 845–848. <https://doi.org/10.1126/science.1190713>.
- (158) Luo, Y.; Zhou, J.; Wang, J.; Dayie, T. K.; Sintim, H. O. Selective Binding of 2'-F-c-Di-GMP to Ct-E88 and Cb-E43, New Class i Riboswitches from *Clostridium Tetani* and *Clostridium Botulinum* Respectively. *Mol. Biosyst.* **2013**, *9* (6), 1535–1539. <https://doi.org/10.1039/c3mb25560c>.
- (159) Sudarsan, N.; Lee, E. R.; Weinberg, Z.; Moy, R. H.; Kim, J. N.; Link, K. H.; Breaker, R. R. Riboswitches in Eubacteria Sense the Second Messenger Cyclic Di-GMP. *Science (80-.)*. **2008**, *321* (July), 411–414.

- (160) Kulshina, N.; Baird, N. J.; Ferré-D'Amaré, A. R. Recognition of the Bacterial Second Messenger Cyclic Diguanylate by Its Cognate Riboswitch. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16* (12), 1212–1217. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1701>.
- (161) Pursley, B. R.; Maiden, M. M.; Hsieh, M. L.; Fernandez, N. L.; Severin, G. B.; Waters, C. M. Cyclic Di-GMP Regulates TfoY in *Vibrio Cholerae* to Control Motility by Both Transcriptional and Posttranscriptional Mechanisms. *J. Bacteriol.* **2018**, *200* (7), 1–19. <https://doi.org/10.1128/JB.00578-17>.
- (162) Metzger, L. C.; Matthey, N.; Stoudmann, C.; Collas, E. J.; Blokesch, M. Ecological Implications of Gene Regulation by TfoX and TfoY among Diverse *Vibrio* Species. *Environ. Microbiol.* **2019**, *21* (7), 2231–2247. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14562>.
- (163) Inuzuka, S.; Kakizawa, H.; Nishimura, K. I.; Naito, T.; Miyazaki, K.; Furuta, H.; Matsumura, S.; Ikawa, Y. Recognition of Cyclic-Di-GMP by a Riboswitch Conducts Translational Repression through Masking the Ribosome-Binding Site Distant from the Aptamer Domain. *Genes to Cells* **2018**, *23* (6), 435–447. <https://doi.org/10.1111/gtc.12586>.
- (164) Inuzuka, S.; Nishimura, K. I.; Kakizawa, H.; Fujita, Y.; Furuta, H.; Matsumura, S.; Ikawa, Y. Mutational Analysis of Structural Elements in a Class-I Cyclic Di-GMP Riboswitch to Elucidate Its Regulatory Mechanism. *J. Biochem.* **2016**, *160* (3), 153–162. <https://doi.org/10.1093/jb/mvw026>.
- (165) Chen, A. G. Y.; Sudarsan, N.; Breaker, R. R. Mechanism for Gene Control by a Natural Allosteric Group I Ribozyme. *Rna* **2011**, *17* (11), 1967–1972. <https://doi.org/10.1261/rna.2757311>.
- (166) Smith, K. D.; Shanahan, C. A.; Moore, E. L.; Simon, A. C.; Strobel, S. A. Structural Basis of Differential Ligand Recognition by Monophosphate-Binding Riboswitches. **2011**, *108* (19), 7757–7762. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018857108>.
- (167) Lübbert, C.; John, E.; von Müller, L. Clostridium Difficile Infection: Guideline-Based Diagnosis and Treatment. *Dtsch. Arztebl. Int.* **2014**, *111* (43), 723–731. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2014.0723>.
- (168) Monaghan, T.; Boswell, T.; Mahida, Y. R. Recent Advances in Clostridium Difficile-Associated Disease. *Gut Microbes* **2008**, *57*, 850–860. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.128157>.
- (169) Lyras, D.; O'Connor, J. R.; Howarth, P. M.; Sambol, S. P.; Carter, G. P.; Phumoonna, T.; Poon, R.; Adams, V.; Vedantam, G.; Johnson, S.; Gerding, D. N.; Rood, J. I. Toxin B Is Essential for Virulence of Clostridium Difficile. *Nature* **2009**, *458* (7242), 1176–1179. <https://doi.org/10.1038/nature07822>.
- (170) Kuehne, S. A.; Cartman, S. T.; Heap, J. T.; Kelly, M. L.; Cockayne, A.; Minton, N. P. The Role of Toxin A and Toxin B in Clostridium Difficile Infection. *Nature* **2010**, *467* (7316), 711–713. <https://doi.org/10.1038/nature09397>.
- (171) Purcell, E. B.; Tamayo, R. Cyclic Diguanylate Signaling in Gram-Positive Bacteria. *FEMS* **2016**, *40* (5), 753–773. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw013>.
- (172) Bordeleau, E.; Purcell, E. B.; Lafontaine, D. A.; Fortier, L.; Tamayo, R. Cyclic Di-GMP Riboswitch-Regulated Type IV Pili Contribute to Aggregation of Clostridium Difficile. **2015**, *197* (5), 819–832. <https://doi.org/10.1128/JB.02340-14>.
- (173) McKee, R. W.; Harvest, C. K.; Tamayo, R. Cyclic Diguanylate Regulates Virulence Factor Genes via Multiple Riboswitches in Clostridium Difficile. *mSphere* **2018**, *3* (5), 1–15. <https://doi.org/10.1128/msphere.00423-18>.
- (174) Anjuwon-Foster, B. R.; Tamayo, R. A Genetic Switch Controls the Production of Flagella and

- Toxins in *Clostridium Difficile*. *PLoS Genet.* **2017**, *13* (3), 1–33.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006701>.
- (175) Oligo Extinction Coefficient Calculator <http://www.fechem.uzh.ch/MT/links/ext.html> (accessed Aug 18, 2020).
- (176) Keller, Sandro; Vargas, Carolyn; Zhao, Huaying; Piszczek, Grzegorz; Brautigam, Chad; A. Schuck, P. High-Precision Isothermal Titration Calorimetry with Automated Peak Shape Analysis. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (11), 5066–5073. <https://doi.org/10.1021/ac3007522>. High-Precision.
- (177) Zhao, H.; Piszczek, G.; Schuck, P. SEDPHAT – a Platform for Global ITC Analysis and Global Multi- Method Analysis of Molecular Interactions. *Methods* **2015**, *76*, 137–148.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.11.012>. SEDPHAT.
- (178) Sklenar V. Suppression of Radiation Damping in Multidimensional NMR Experiments Using Magnetic Field Gradients. *J. Magn. Reson. Ser. A* **1995**, *114* (1), 132–135.
- (179) Plateau, P.; Guéron, M. Exchangeable Proton NMR without Base-Line Distortion, Using New Strong-Pulse Sequences. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104* (25), 7310–7311.
<https://doi.org/10.1021/ja00389a067>.
- (180) Kumar, A.; Ernst, R. R.; Wüthrich, K. A Two-Dimensional Nuclear Overhauser Enhancement (2D NOE) Experiment for the Elucidation of Complete Proton-Proton Cross-Relaxation Networks in Biological Macromolecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *95* (1), 1–6.
- (181) Overhauser, A. W. Polarization of Nuclei in Metals. *Phys. Rev.* **1953**, *92* (2), 411–415.
<https://doi.org/10.1103/PhysRev.92.411>.
- (182) Fürtig, B.; Richter, C.; Wöhnert, J.; Schwalbe, H. NMR Spectroscopy of RNA. *ChemBioChem* **2003**, *4* (10), 936–962. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300700>.
- (183) Mori, S.; Abeygunawardana, C.; Johnson, M. O.; Zijl, P. C. M. Van. 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. Ser. B* **1995**, *108* (1), 94–98. <https://doi.org/10.1006/jmrb.1995.1109>.
- (184) Bodenhausen, G.; Ruben, D. J. Natural Abundance Nitrogen-15 NMR by Enhanced Heteronuclear Spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69* (1), 185–189.
[https://doi.org/10.1016/0009-2614\(80\)80041-8](https://doi.org/10.1016/0009-2614(80)80041-8).
- (185) Ulrich, E. L.; Akutsu, H.; Doreleijers, J. F.; Harano, Y.; Ioannidis, Y. E.; Lin, J.; Livny, M.; Mading, S.; Maziuk, D.; Miller, Z.; Nakatani, E.; Schulte, C. F.; Tolmie, D. E.; Kent Wenger, R.; Yao, H.; Markley, J. L. BioMagResBank. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36* (SUPPL. 1), 402–408.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkm957>.
- (186) Gareth A. Morris; Freeman, R. Enhancement of Nuclear Magnetic Resonance Signals by Polarization Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101* (3), 760–762.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ja00497a058>.
- (187) Solyom, Z.; Schwarten, M.; Geist, L.; Konrat, R.; Willbold, D.; Brutscher, B. BEST-TROSY Experiments for Time-Efficient Sequential Resonance Assignment of Large Disordered Proteins. *J. Biomol. NMR.* **2013**, *55* (4), 311–321.
- (188) Favier, A.; Brutsche, B. Recovering Lost Magnetization: Polarization Enhancement in Biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR.* **2011**, *49* (1), 9–15. <https://doi.org/doi:10.1007/s10858-010-9461-5>.
- (189) Schanda, P.; Kupce, E.; Brutscher, B. SOFAST-HMQC Experiments for Recording Two-

- Dimensional Heteronuclear Correlation Spectra of Proteins within a Few Seconds. *J Biomol NMR* **2005**, *33* (4), 199–211. <https://doi.org/doi: 10.1007/s10858-005-4425-x>.
- (190) Schanda, P.; Brutscher, B. Very Fast Two-Dimensional NMR Spectroscopy for Real-Time Investigation of Dynamic Events in Proteins on the Time Scale of Seconds. *J Am Chem Soc.* **2005**, *127* (22), 8014–8015. <https://doi.org/doi: 10.1021/ja051306e>.
- (191) Breeze, A. L. Isotope-Filtered NMR Methods for the Study of Biomolecular Structure and Interactions. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2000**, *36* (4), 323–372. [https://doi.org/10.1016/S0079-6565\(00\)00020-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6565(00)00020-0).
- (192) Helmling, C.; Klötzner, D. P.; Sochor, F.; Mooney, R. A.; Wacker, A.; Landick, R.; Fürtig, B.; Heckel, A.; Schwalbe, H. Life Times of Metastable States Guide Regulatory Signaling in Transcriptional Riboswitches. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03375-w>.
- (193) Prinz, J. H.; Wu, H.; Sarich, M.; Keller, B.; Senne, M.; Held, M.; Chodera, J. D.; Schütte, C.; Noé, F. Markov Models of Molecular Kinetics: Generation and Validation. *J. Chem. Phys.* **2011**, *134* (174105). <https://doi.org/10.1063/1.3565032>.
- (194) Fürtig, B.; Wenter, P.; Reymond, L.; Richter, C.; Pitsch, S.; Schwalbe, H. Conformational Dynamics of Bistable RNAs Studied by Time-Resolved NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (51), 16222–16229. <https://doi.org/10.1021/ja076739r>.
- (195) Landgraf, T.; Völklein, A. E.; Fürtig, B.; Schwalbe, H. The Cotranscriptional Folding Landscape for Two Cyclic Di-Nucleotide-Sensing Riboswitches with Highly Homologous Aptamer Domains Acting Either as ON- or OFF-Switches. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50* (12), 6639–6655. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac514>.
- (196) Ren, A.; Wang, X. C.; Kellenberger, C. A.; Rajashankar, K. R.; Jones, R. A.; Hammond, M. C.; Patel, D. J. Structural Basis for Molecular Discrimination by a 3',3'-CGAMP Sensing Riboswitch. *Cell Rep.* **2015**, *11* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.004>.
- (197) Smith, K. D.; Lipchock, S. V.; Livingston, A. L.; Shanahan, C. A.; Strobel, S. A. Structural and Biochemical Determinants of Ligand Binding by the C-Di-GMP Riboswitch. *Biochemistry* **2010**, *49* (34), 7351–7359. <https://doi.org/10.1021/bi100671e>.
- (198) Smith, K. D.; Strobel, S. A. Interactions of the C-Di-GMP Riboswitch with Its Second Messenger Ligand Kathryn. *Biochem Soc Trans.* **2013**, *39* (2), 647–651. <https://doi.org/doi:10.1042/BST0390647>.
- (199) Ren, A.; Wang, X. C.; Kellenberger, C. A.; Rajashankar, K. R.; Jones, R. A.; Hammond, M. C.; Patel, D. J. Structural Basis for Molecular Discrimination by a 3',3'-CGAMP Sensing Riboswitch. *Cell Rep.* **2015**, *11* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.004>.
- (200) Schafer, D. A.; Gelles, J.; Sheetz, M. P.; Landick, R. Transcription by Single Molecules of RNA Polymerase Observed by Light Microscopy. *Nature.* 1991, p 1.
- (201) Vogel, U.; Jensen, K. A. J. F. The RNA Chain Elongation Rate in Escherichia Coli Depends on the Growth Rate. *J. Bacteriol.* **1994**, *176* (10), 2807–2813.
- (202) Adelman, K.; La Porta, A.; Santangelo, T. J.; Lis, J. T.; Roberts, J. W.; Wang, M. D. Single Molecule Analysis of RNA Polymerase Elongation Reveals Uniform Kinetic Behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (21), 13538–13543. <https://doi.org/10.1073/pnas.212358999>.
- (203) Schnieders, R.; Knezic, B.; Zetzsche, H.; Sudakov, A.; Matzel, T.; Richter, C.; Hengesbach, M.; Schwalbe, H.; Fürtig, B. NMR Spectroscopy of Large Functional RNAs: From Sample

- Preparation to Low-Gamma Detection. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2020**, *82* (e116), 1–73. <https://doi.org/10.1002/cpnc.116>.
- (204) Turk, M.; Baumeister, W. The Promise and the Challenges of Cryo-Electron Tomography. *FEBS Lett.* **2020**, *594* (20), 3243–3261. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13948>.
- (205) Binas, O.; de Jesus, V.; Landgraf, T.; Völklein, A. E.; Martins, J.; Hyman, D.; Kaur Bains, J.; Berg, H.; Biedenbänder, T.; Fürtig, B.; Lakshmi Gande, S.; Niesteruk, A.; Oxenfarth, A.; Shahin Qureshi, N.; Schamber, T.; Schnieders, R.; Tröster, A.; Wacker, A.; Wirmer-Bartoschek, J.; Wirtz Martin, M. A.; Stirnal, E.; Azzaoui, K.; Richter, C.; Sreeramulu, S.; José Blommers, M. J.; Schwalbe, H. 19F NMR-Based Fragment Screening for 14 Different Biologically Active RNAs and 10 DNA and Protein Counter-Screens. *ChemBioChem* **2021**, *22* (2), 423–433. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000476>.
- (206) Vicens, Q.; Westhof, E. RNA as a Drug Target: The Case of Aminoglycosides. *ChemBioChem* **2003**, *4* (1018–1023).
- (207) Warner, K. D.; Hajdin, C. E.; Weeks, K. M. Principles for Targeting RNA with Drug-like Small Molecules. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17* (8), 547–558. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.93>.
- (208) Goldau, T.; Murayama, K.; Brieke, C.; Steinwand, S.; Mondal, P.; Biswas, M.; Burghardt, I.; Wachtveitl, J.; Asanuma, H.; Heckel, A. Reversible Photoswitching of RNA Hybridization at Room Temperature with an Azobenzene C-Nucleoside. *Chemistry* **2014**, 1–11. <https://doi.org/10.1002/chem.201405840>.
- (209) Silva, J. M.; Silva, E.; Reis, R. L. Light-Triggered Release of Photocaged Therapeutics - Where Are We Now? *J. Control. Release* **2019**, *298* (October 2018), 154–176. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.02.006>.
- (210) Pirrung, M. C.; Shuey, S. W. Benzoin Photoremovable Protecting Groups for Phosphorylation of Chiral Alcohols. Asymmetric Synthesis of Phosphotriesters of (–)-3',5'-Dimethoxybenzoin. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (14), 3890–3897. <https://doi.org/10.1021/jo00093a021>.
- (211) Menge, C.; Heckel, A. Coumarin-Caged DG for Improved Wavelength-Selective Uncaging of DNA. **2011**, No. c. <https://doi.org/10.1002/sml.201100182.10.1021/ol201842x>.
- (212) Hassner, A.; Yagudayev, D.; Pradhan, T. K.; Nudelman, A.; Amit, B. Light-Sensitive Protecting Groups for Amines and Alcohols: The Photosolvolysis of n-Substituted 7-Nitroindolines. *Synlett* **2007**, No. 15, 2405–2409. <https://doi.org/10.1055/s-2007-985580>.
- (213) Hagen, V.; Dzeja, C.; Bendig, J.; Baeger, I.; Kaupp, U. B. Novel Caged Compounds of Hydrolysis-Resistant 8-Br-CAMP and 8-Br-CGMP: Photolabile NPE Esters. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1998**, *42* (1), 71–78. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(97\)00125-5](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(97)00125-5).
- (214) Aujard, I.; Benbrahim, C.; Gouget, M.; Ruel, O.; Baudin, J. B.; Neveu, P.; Jullien, L. O-Nitrobenzyl Photolabile Protecting Groups with Red-Shifted Absorption: Syntheses and Uncaging Cross-Sections for One- And Two-Photon Excitation. *Chem. - A Eur. J.* **2006**, *12* (26), 6865–6879. <https://doi.org/10.1002/chem.200501393>.
- (215) Jana, A.; Ikbali, M.; Singh, N. D. P. Perylen-3-Ylmethyl: Fluorescent Photoremovable Protecting Group (FPPRG) for Carboxylic Acids and Alcohols. *Tetrahedron* **2012**, *68* (4), 1128–1136. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.11.074>.
- (216) Salahi, F.; Purohit, V.; Ferraudi, G.; Stauffacher, C.; Wiest, O.; Helquist, P. PHP-Tethered N-Acyl Carbamate: A Photocage for Nicotinamide. *Organic Letters*. 2018, pp 2547–2550. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b00697>.

- (217) Zayat, L.; Salierno, M.; Etchenique, R. Ruthenium(II) Bipyridyl Complexes as Photolabile Caging Groups for Amines. *Inorg. Chem.* **2006**, *45* (4), 1728–1731. <https://doi.org/10.1021/ic0512983>.
- (218) Brieke, C.; Heckel, A. Spiropyran Photoswitches in the Context of DNA: Synthesis and Photochromic Properties. *Chem. - A Eur. J.* **2013**, *19* (46), 15726–15734. <https://doi.org/10.1002/chem.201302640>.
- (219) Lotz, T. S.; Halbritter, T.; Kaiser, C.; Rudolph, M. M.; Kraus, L.; Groher, F.; Steinwand, S.; Wachtveitl, J.; Heckel, A.; Suess, B. A Light-Responsive RNA Aptamer for an Azobenzene Derivative. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47* (4), 2029–2040. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1225>.
- (220) Andersson, J.; Li, S.; Lincoln, P.; Joakim, A. Photo-Switched DNA-Binding of a Photochromic Spiropyran. *J Am Chem Soc.* **2008**, *130*, 11836–11837. <https://doi.org/10.1021/ja801968f> CCC:
- (221) Rodrigues-Correia, A.; Weyel, X. M. M.; Heckel, A. Four Levels of Wavelength-Selective Uncaging for Oligonucleotides. *Org. Lett.* **2013**, *15* (21), 5500–5503. <https://doi.org/10.1021/ol402657j>.
- (222) Grebenovsky, N.; Hermanns, V.; Heckel, A. Photoswitchable 2-Phenyldiazenyl-Purines and Their Influence on DNA Hybridization. *ChemPhotoChem* **2020**, *4* (11), 5245–5248. <https://doi.org/10.1002/cptc.202000162>.
- (223) Thevarpadam, J.; Bessi, I.; Binas, O.; Gonçalves, D. P. N.; Slavov, C.; Jonker, H. R. A.; Richter, C.; Wachtveitl, J.; Schwalbe, H.; Heckel, A. Photoresponsive Formation of an Intermolecular Minimal G-Quadruplex Motif. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2016**, *in print*. <https://doi.org/10.1002/anie.201510269>.
- (224) Grün, J. T.; Blümler, A.; Burkhart, I.; Wirmer-Bartoschek, J.; Heckel, A.; Schwalbe, H. Unraveling the Kinetics of Spare-Tire DNA G-Quadruplex Folding. *Journal of the American Chemical Society.* 2021, pp 6185–6193. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c01089>.
- (225) Kahlstatt, J.; Reiß, P.; Halbritter, T.; Essen, L. O.; Koert, U.; Heckel, A. A Light-Triggered Transmembrane Porin. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (69), 9623–9626. <https://doi.org/10.1039/c8cc05221b>.
- (226) Lerch, M. M.; Hansen, M. J.; Velema, W. A.; Szymanski, W.; Feringa, B. L. Orthogonal Photoswitching in a Multifunctional Molecular System. *Nat. Commun.* **2016**, *7* (May), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms12054>.
- (227) Sambandan, S.; Akbalik, G.; Kochen, L.; Rinne, J.; Kahlstatt, J.; Glock, C.; Tushev, G.; Alvarez-Castelao, B.; Heckel, A.; Schuman, E. M. Activity-Dependent Spatially Localized miRNA Maturation in Neuronal Dendrites. *Science (80-)*. **2017**, *355* (6325), 634–637. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8995>.
- (228) Yang, Y.; Shao, Q.; Deng, R.; Wang, C.; Teng, X.; Cheng, K.; Cheng, Z.; Huang, L.; Liu, Z.; Liu, X.; Xing, B. In Vitro and In Vivo Uncaging and Bioluminescence Imaging by Using Photocaged Upconversion Nanoparticles. *Angew. Chemie* **2012**, *124* (13), 3179–3183. <https://doi.org/10.1002/ange.201107919>.
- (229) Theer, P.; Hasan, M. T.; Denk, W. Two-Photon Imaging to a Depth of 1000 Mm in Living Brains by Use of a Ti:Al₂O₃ Regenerative Amplifier. *Opt. Lett.* **2003**, *28* (12), 1022–1024.
- (230) Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Webb, W. W. Nonlinear Magic: Multiphoton Microscopy in the Biosciences. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21* (11), 1369–1377. <https://doi.org/10.1038/nbt899>.
- (231) Schäfer, F.; Wagner, J.; Knau, A.; Dimmeler, S.; Heckel, A. Regulating Angiogenesis with Light-

- Inducible Antimirs. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52* (51), 13558–13561. <https://doi.org/10.1002/anie.201307502>.
- (232) Linder, P. Dead-Box Proteins: A Family Affair - Active and Passive Players in RNP-Remodeling. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (15), 4168–4180. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl468>.
- (233) Monroe, W. T.; McQuain, M. M.; Chang, M. S.; Alexander, J. S.; Haselton, F. R. Targeting Expression with Light Using Caged DNA. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (30), 20895–20900. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.20895>.
- (234) Ghosn, B.; Haselton, F. R.; Gee, K. R.; Monroe, W. T. Control of DNA Hybridization with Photocleavable Adducts¶. *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81* (4), 953. <https://doi.org/10.1562/2004-11-15-ra-373r1.1>.
- (235) Ando, H.; Furuta, T.; Tsien, R. Y.; Okamoto, H. Photo-Mediated Gene Activation Using Caged RNA/DNA in Zebrafish Embryos. *Nat. Genet.* **2001**, *28* (4), 317–325. <https://doi.org/10.1038/ng583>.
- (236) Ogasawara, S.; Maeda, M. Straightforward and Reversible Photoregulation of Hybridization by Using a Photochromic Nucleoside. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47* (46), 8839–8842. <https://doi.org/10.1002/anie.200803496>.
- (237) Mao, S.; Chang, Z.; Zheng, Y. Y.; Shekhtman, A.; Sheng, J. DNA Functionality with Photoswitchable Hydrazone Cytidine. *Chemistry (Easton)*. **2021**, *27* (32), 8372–8379. <https://doi.org/doi:10.1002/chem.20210074>.
- (238) Li, J.; Wang, X.; Liang, X. Modification of Nucleic Acids by Azobenzene Derivatives and Their Applications in Biotechnology and Nanotechnology. *Chem. - An Asian J.* **2014**, *9* (12), 3344–3358. <https://doi.org/10.1002/asia.201402758>.
- (239) Weston, C. E.; Richardson, R. D.; Haycock, P. R.; White, A. J. P.; Fuchter, M. J. Arylazopyrazoles: Azoheteroarene Photoswitches Offering Quantitative Isomerization and Long Thermal Half-Lives. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (34), 11878–11881. <https://doi.org/10.1021/ja505444d>.
- (240) Adam, V.; Prusty, D. K.; Centola, M.; Škugor, M.; Hannam, J. S.; Valero, J.; Klöckner, B.; Famulok, M. Expanding the Toolbox of Photoswitches for DNA Nanotechnology Using Arylazopyrazoles. *Chemistry (Easton)*. **2018**, *24* (5), 1062–1066. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/chem.201705500>.
- (241) Barrois, S.; Wagenknecht, H. A. Diarylethene-Modified Nucleotides for Switching Optical Properties in DNA. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 905–914. <https://doi.org/10.3762/bjoc.8.103>.
- (242) Özçoban, C.; Halbritter, T.; Steinwand, S.; Herzig, L. M.; Kohl-Landgraf, J.; Askari, N.; Groher, F.; Fürtig, B.; Richter, C.; Schwalbe, H.; Suess, B.; Wachtveitl, J.; Heckel, A. Water-Soluble Py-BIPS Spiropyrans as Photoswitches for Biological Applications. *Org. Lett.* **2015**, *17* (6), 1517–1520. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b00397>.
- (243) Thevarpadam, J.; Bessi, I.; Binas, O.; Gonçalves, D. P. N.; Slavov, C.; Jonker, H. R. A.; Richter, C.; Wachtveitl, J.; Schwalbe, H.; Heckel, A. Photoresponsive Formation of an Intermolecular Minimal G-Quadruplex Motif. *Angew. Chemie* **2016**, *128* (8), 2788–2792. <https://doi.org/10.1002/ange.201510269>.
- (244) Kühn, T.; Schwalbe, H. Monitoring the Kinetics of Ion-Dependent Protein Folding by Time-Resolved NMR Spectroscopy at Atomic Resolution. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (26), 6169–6174. <https://doi.org/10.1021/ja994212b>.

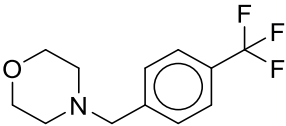
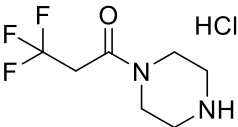
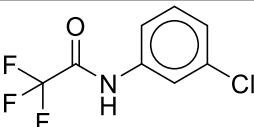
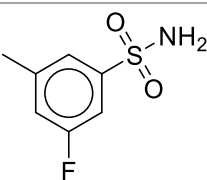
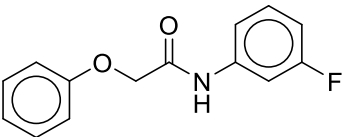
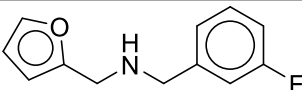
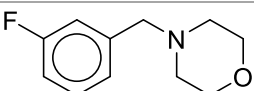
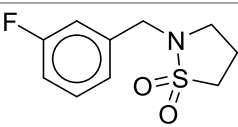
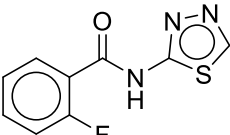
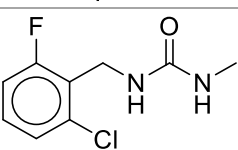
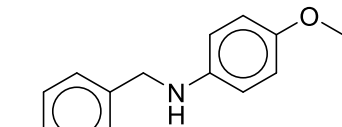
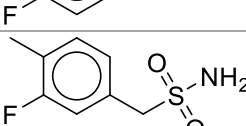
- (245) Gorbalenya, A. E.; Baker, S. C.; Baric, R. S.; de Groot, R. J.; Drosten, C.; Gulyaeva, A. A.; Haagmans, B. L.; Lauber, C.; Leontovich, A. M.; Neuman, B. W.; Penzar, D.; Perlman, S.; Poon, L. L. M.; Samborskiy, D. V.; Sidorov, I. A.; Sola, I.; Ziebuhr, J. The Species Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus: Classifying 2019-NCoV and Naming It SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* **2020**, *5* (4), 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.
- (246) Chan, J. F. W.; Kok, K. H.; Zhu, Z.; Chu, H.; To, K. K. W.; Yuan, S.; Yuen, K. Y. Genomic Characterization of the 2019 Novel Human-Pathogenic Coronavirus Isolated from a Patient with Atypical Pneumonia after Visiting Wuhan. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9* (1), 221–236. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>.
- (247) Fehr, A. R.; Perlman, S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Coronaviruses* **2015**, *1282*, 1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1.
- (248) Madhugiri, R.; Fricke, M.; Marz, M.; Ziebuhr, J. Coronavirus Cis-Acting RNA Elements. *Adv. Virus Res.* **2016**, *96*, 127–163.
- (249) Rangan, R.; Zheludev, I. N.; Hagey, R. J.; Pham, E. A.; Wayment-Steele, H. K.; Glenn, J. S.; Das, R. RNA Genome Conservation and Secondary Structure in SARS-CoV-2 and SARS-Related Viruses: A First Look. *Rna* **2020**, *26* (8), 937–959. <https://doi.org/10.1261/RNA.076141.120>.
- (250) Li, L.; Kang, H.; Liu, P.; Makkinje, N.; Williamson, S. T.; Leibowitz, J. L.; Giedroc, D. P. Structural Lability in Stem-Loop 1 Drives a 5′ UTR-3′ UTR Interaction in Coronavirus Replication. *J. Mol. Biol.* **2008**, *377* (3), 790–803. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.01.068>.
- (251) Liu, P.; Li, L.; Millership, J. J.; Kang, H.; Leibowitz, J. L.; Giedroc, D. P. A U-Turn Motif-Containing Stem-Loop in the Coronavirus 5′ Untranslated Region Plays a Functional Role in Replication. *Rna*. 2007, pp 763–780. <https://doi.org/10.1261/rna.261807>.
- (252) Yang, D.; Leibowitz, J. L. The Structure and Functions of Coronavirus Genomic 3′ and 5′ Ends. *Virus Research*. 2015, pp 120–133.
- (253) Madhugiri, R.; Fricke, M.; Marz, M.; Ziebuhr, J. RNA Structure Analysis of Alphacoronavirus Terminal Genome Regions. *Virus Res.* **2014**, *194*, 76–89.
- (254) Wacker, A.; Weigand, J. E.; Akabayov, S. R.; Altincekic, N.; Bains, J. K.; Banijamali, E.; Binas, O.; Castillo-Martinez, J.; Cetiner, E.; Ceylan, B.; Chiu, L. Y.; Davila-Calderon, J.; Dhamotharan, K.; Duchardt-Ferner, E.; Ferner, J.; Frydman, L.; Fürtig, B.; Gallego, J.; Tassilo Grün, J.; Hacker, C.; Haddad, C.; Hähnke, M.; Hengesbach, M.; Hiller, F.; Hohmann, K. F.; Hymon, D.; de Jesus, V.; Jonker, H.; Keller, H.; Knezic, B.; Landgraf, T.; Löhr, F.; Luo, L.; Mertinkus, K. R.; Muhs, C.; Novakovic, M.; Oxenfarth, A.; Palomino-Schätzlein, M.; Petzold, K.; Peter, S. A.; Pyper, D. J.; Qureshi, N. S.; Riad, M.; Richter, C.; Saxena, K.; Schamber, T.; Scherf, T.; Schlagnitweit, J.; Schlundt, A.; Schnieders, R.; Schwalbe, H.; Simba-Lahuasi, A.; Sreeramulu, S.; Stinal, E.; Sudakov, A.; Tants, J. N.; Tolbert, B. S.; Vögele, J.; Weiß, L.; Wirmer-Bartoschek, J.; Wirtz Martin, M. A.; Wöhnert, J.; Zetzsche, H. Secondary Structure Determination of Conserved SARS-CoV-2 RNA Elements by NMR Spectroscopy. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48* (22), 12415–12435. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1013>.
- (255) Yang, D.; Liu, P.; Giedroc, D. P.; Leibowitz, J. Mouse Hepatitis Virus Stem-Loop 4 Functions as a Spacer Element Required To Drive Subgenomic RNA Synthesis. *J. Virol.* **2011**, *85* (17), 9199–9209. <https://doi.org/10.1128/jvi.05092-11>.
- (256) Brown, C. G.; Nixon, K. S.; Senanayake, S. D.; Brian, D. A. An RNA Stem-Loop within the Bovine Coronavirus Nsp1 Coding Region Is a Cis-Acting Element in Defective Interfering RNA Replication. *J. Virol.* **2007**, *81* (14), 7716–7724. <https://doi.org/10.1128/jvi.00549-07>.
- (257) Cho, C. P.; Lin, S. C.; Chou, M. Y.; Hsu, H. T.; Chang, K. Y. Regulation of Programmed Ribosomal Frameshifting by Co-Translational Refolding RNA Hairpins. *PLoS One* **2013**, *8* (4), 1–11.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062283>.

- (258) Ishimaru, D.; Plant, E. P.; Sims, A. C.; Yount, B. L.; Roth, B. M.; Eldho, N. V.; Pérez-Alvarado, G. C.; Armbruster, D. W.; Baric, R. S.; Dinman, J. D.; Taylor, D. R.; Hennig, M. RNA Dimerization Plays a Role in Ribosomal Frameshifting of the SARS Coronavirus. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (4), 2594–2608. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1361>.
- (259) Goebel, S. J.; Hsue, B.; Dombrowski, T. F.; Masters, P. S. Characterization of the RNA Components of a Putative Molecular Switch in the 3' Untranslated Region of the Murine Coronavirus Genome. *J. Virol.* **2004**, *78* (2), 669–682. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.2.669-682.2004>.
- (260) Goebel, S. J.; Miller, T. B.; Bennett, C. J.; Bernard, K. A.; Masters, P. S. A Hypervariable Region within the 3' Cis-Acting Element of the Murine Coronavirus Genome Is Nonessential for RNA Synthesis but Affects Pathogenesis. *Journal of Virology.* 2007, pp 1274–1287. <https://doi.org/10.1128/jvi.00803-06>.
- (261) Robertson, M. P.; Igel, H.; Baertsch, R.; Haussler, D.; Ares, M.; Scott, W. G. The Structure of a Rigorously Conserved RNA Element within the SARS Virus Genome. *PLoS Biol.* **2005**, *3* (1), 0086–0094. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030005>.
- (262) Rucker, S. P.; Shaka, A. J. Broadband Homonuclear Cross Polarization in 2D N.M.R. Using DIPSI-2. *Mol. Phys.* **1989**, *68* (2), 509–517. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/00268978900102331>.
- (263) T.L., H.; A.J., S. Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *J. Magn. Reson. Ser. A* **1995**, *112* (2), 275–279.
- (264) Dingley, A. J.; Nisius, L.; Cordier, F.; Grzesiek, S. Direct Detection of N-H[...]¹⁵N Hydrogen Bonds in Biomolecules by NMR Spectroscopy. *Nat. Protoc.* **2008**, *3* (2), 242–248. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.497>.
- (265) Schulte-Herbrüggen, T.; Sorensen, O. W. Clean TROSY: Compensation for Relaxation-Induced Artifacts. *J. Magn. Reson.* **2000**, *144* (1), 123–128. <https://doi.org/10.1006/jmre.2000.2020>.
- (266) Lescop, E.; Kern, T.; Brutscher, B. Guidelines for the Use of Band-Selective Radiofrequency Pulses in Hetero-Nuclear NMR: Example of Longitudinal-Relaxation-Enhanced BEST-Type ¹H-¹⁵N Correlation Experiments. *J. Magn. Reson.* **2010**, *203* (1), 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2009.12.001>.
- (267) Favier, A.; Brutscher, B. Recovering Lost Magnetization: Polarization Enhancement in Biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR* **2011**, *49*, 9–15.

Appendix

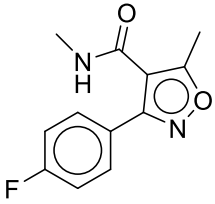
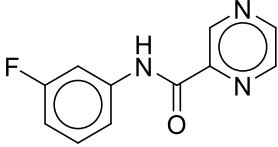
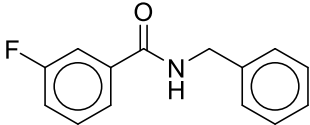
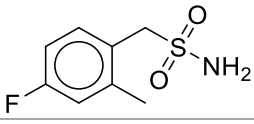
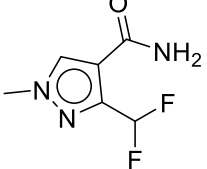
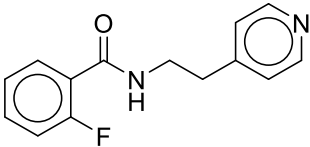
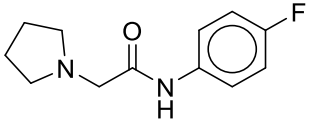
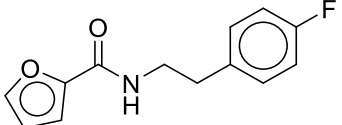
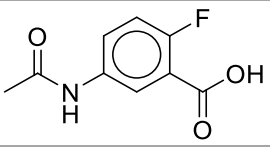
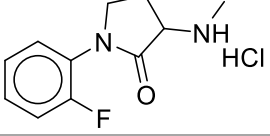
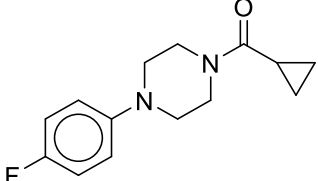
A1: ¹⁹F Fragmentbibliothek

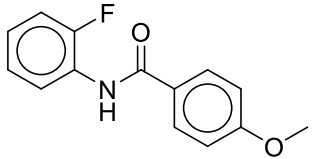
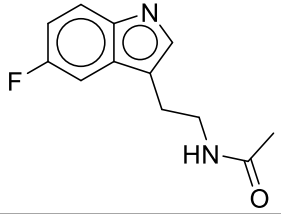
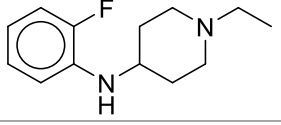
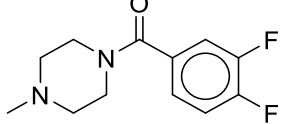
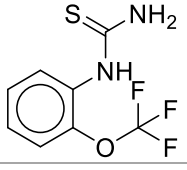
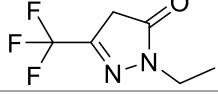
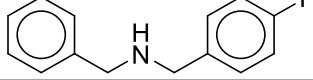
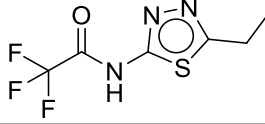
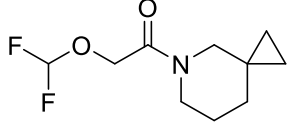
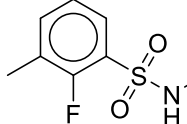
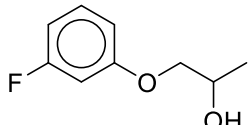
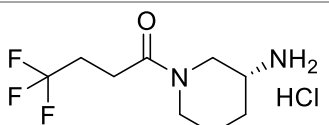
	Summenformel	Struktur
1.	C ₁₂ H ₁₄ F ₃ NO	
2.	C ₇ H ₁₂ ClF ₃ N ₂ O	
3.	C ₈ H ₅ ClF ₃ NO	
4.	C ₇ H ₈ FNO ₂ S	
5.	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₂	
6.	C ₁₂ H ₁₂ FNO	
7.	C ₁₁ H ₁₄ FNO	
8.	C ₁₀ H ₁₂ FNO ₂ S	
9.	C ₉ H ₆ FN ₃ OS	
10.	C ₉ H ₁₀ ClFNO ₂	
11.	C ₁₄ H ₁₄ FNO	
12.	C ₈ H ₁₀ FNO ₂ S	

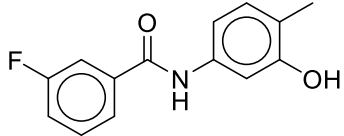
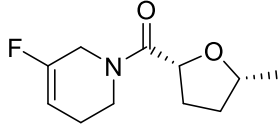
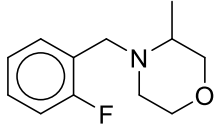
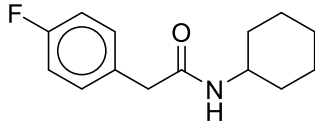
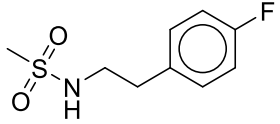
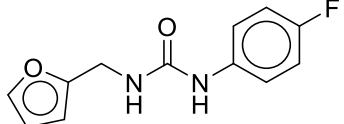
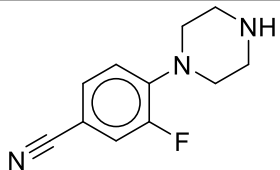
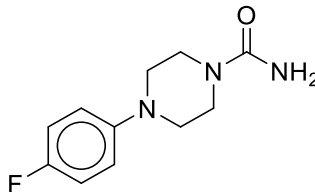
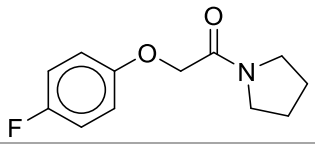
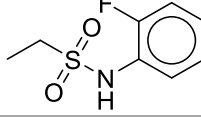
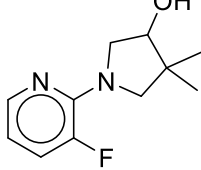
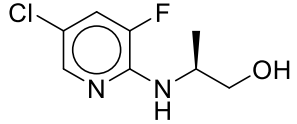
	Summenformel	Struktur
13.	C ₁₂ H ₁₆ FN ₃ O	
14.	C ₉ H ₇ F ₂ N ₅ O	
15.	C ₁₂ H ₁₅ FN ₂ O ₂	
16.	C ₉ H ₁₃ FN ₂ O	
17.	C ₁₁ H ₁₄ FN ₂ O ₂	
18.	C ₁₀ H ₁₀ FN ₃	
19.	C ₁₁ H ₁₂ FN ₂ O ₂	
20.	C ₁₀ H ₁₃ FN ₂ O	
21.	C ₈ H ₅ F ₃ O ₃	
22.	C ₁₀ H ₁₄ F ₃ N ₃ O	
23.	C ₉ H ₁₄ F ₃ N ₂ O ₂	

	Summenformel	Struktur
24.	C ₆ H ₄ F ₃ N ₃ O	
25.	C ₁₀ H ₈ F ₃ NO ₂	
26.	C ₉ H ₁₇ Cl ₃ F ₂ N ₄	
27.	C ₉ H ₉ BrFNO	
28.	C ₁₅ H ₁₃ FN ₂	
29.	C ₉ H ₁₂ FN ₃ S	
30.	C ₁₃ H ₁₅ F ₂ NO	
31.	C ₉ H ₁₄ FNO ₂ S	
32.	C ₈ H ₈ FNO	
33.	C ₉ H ₈ FNO ₃	
34.	C ₁₄ H ₁₁ F ₂ NO	
35.	C ₁₂ H ₁₅ F ₂ NO	

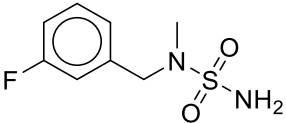
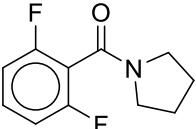
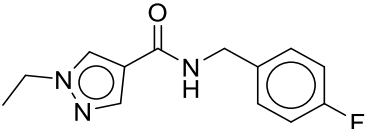
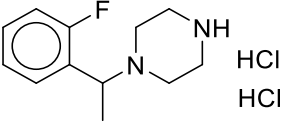
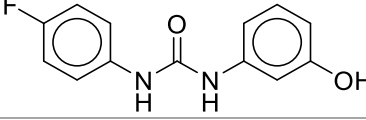
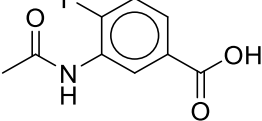
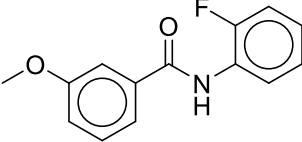
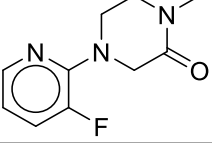
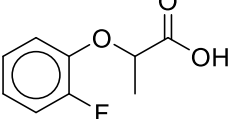
	Summenformel	Struktur
36.	C ₁₀ H ₁₀ FN ₃	
37.	C ₁₁ H ₁₅ FN ₂ O	
38.	C ₁₀ H ₁₀ FN ₃ S	
39.	C ₉ H ₁₂ FNO ₂ S	
40.	C ₁₁ H ₁₅ FN ₂ O	
41.	C ₇ H ₆ ClF ₃ N ₂	
42.	C ₉ H ₁₄ F ₃ NO	
43.	C ₁₀ H ₈ F ₃ NO ₃	
44.	C ₇ H ₁₁ F ₂ NO	
45.	C ₁₄ H ₁₁ FN ₂	

	Summenformel	Struktur
46.	C ₁₂ H ₁₁ FN ₂ O ₂	
47.	C ₁₁ H ₈ FN ₃ O	
48.	C ₁₄ H ₁₂ FNO	
49.	C ₈ H ₁₀ FNO ₂ S	
50.	C ₆ H ₇ F ₂ N ₃ O	
51.	C ₁₄ H ₁₃ FN ₂ O	
52.	C ₁₂ H ₁₅ FN ₂ O	
53.	C ₁₃ H ₁₂ FNO ₂	
54.	C ₉ H ₈ FNO ₃	
55.	C ₁₁ H ₁₄ ClFN ₂ O	
56.	C ₁₄ H ₁₇ FN ₂ O	

	Summenformel	Struktur
57.	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₂	
58.	C ₁₂ H ₁₃ FN ₂ O	
59.	C ₁₃ H ₁₉ FN ₂	
60.	C ₁₂ H ₁₄ F ₂ N ₂ O	
61.	C ₈ H ₇ F ₃ N ₂ OS	
62.	C ₆ H ₇ F ₃ N ₂ O	
63.	C ₁₄ H ₁₄ FN	
64.	C ₆ H ₆ F ₃ N ₃ OS	
65.	C ₁₀ H ₁₅ F ₂ N ₂ O ₂	
66.	C ₈ H ₁₀ FNO ₂ S	
67.	C ₉ H ₁₁ FO ₂	
68.	C ₉ H ₁₆ ClF ₃ N ₂ O	

	Summenformel	Struktur
69.	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₂	
70.	C ₁₁ H ₁₆ FNO ₂	
71.	C ₁₂ H ₁₆ FNO	
72.	C ₁₄ H ₁₈ FNO	
73.	C ₉ H ₁₂ FNO ₂ S	
74.	C ₁₂ H ₁₁ FN ₂ O ₂	
75.	C ₁₁ H ₁₂ FN ₃	
76.	C ₁₁ H ₁₄ FN ₃ O	
77.	C ₁₂ H ₁₄ FNO ₂	
78.	C ₈ H ₁₀ FNO ₂ S	
79.	C ₁₁ H ₁₅ FN ₂ O	
80.	C ₈ H ₁₀ ClFN ₂ O	

	Summenformel	Struktur
81.	C ₈ H ₈ F ₃ NO	
82.	C ₈ H ₇ F ₃ N ₂ OS	
83.	C ₁₂ H ₁₅ F ₃ N ₂	
84.	C ₇ H ₁₀ ClF ₃ N ₄ O	
85.	C ₉ H ₁₀ F ₃ N	
86.	C ₁₃ H ₁₀ F ₂ N ₂ O	
87.	C ₉ H ₈ F ₂ O ₂	
88.	C ₉ H ₈ FN ₅ O	
89.	C ₁₀ H ₁₀ FN ₃ O ₃	
90.	C ₁₁ H ₁₂ FN ₂ O ₂	
91.	C ₁₂ H ₁₆ FNO	
92.	C ₉ H ₁₃ ClFN	

	Summenformel	Struktur
93.	C ₈ H ₁₁ FN ₂ O ₂ S	
94.	C ₁₁ H ₁₁ F ₂ NO	
95.	C ₁₃ H ₁₄ FN ₃ O	
96.	C ₁₂ H ₁₉ Cl ₂ FN ₂	
97.	C ₁₃ H ₁₁ FN ₂ O ₂	
98.	C ₉ H ₈ FN ₃ O ₃	
99.	C ₁₄ H ₁₂ FN ₂ O ₂	
100.	C ₁₀ H ₁₂ FN ₃ O	
101.	C ₉ H ₉ FO ₃	

A2: Beispiel Mathematica Markov Modeling Script

```
l=74;
states=3;
n=l*states+1
KM=Array[k,{n,n},{1,1}];
KM//MatrixForm;

For[j=1,j<n+1,j++,For[i=1,i<n+1,i++,k[i,j]=0]]
KM//MatrixForm;

For[i=1,i<n+1,i++,k[i,i+1]=synth]
k[1+1,1+2]=0;
k[2*1+1,2*1+2]=0;

(* pausing at 110 length for few seconds*)
lengthxitthunnel=10
pausingduration=30
k[60-lengthxitthunnel,1+60-lengthxitthunnel]=(1.0/pausingduration);
k[1+60-lengthxitthunnel,1+60-lengthxitthunnel]=(1.0/pausingduration);
k[2*1+60-lengthxitthunnel,2*1+60-lengthxitthunnel]=(1.0/pausingduration);

KM//MatrixForm;
m2=2; (*87*)

m3=3;(*88*)

m4=4;(*89*)

m5=5;(*90*)

m6=6;(*91*)

m7=7;(*92*)

m8=8;(*93*)

m9=9;(*94*)

m10=10;(*95*)

m11=11;(*96*)

m12=12;(*97*)

m13=13;(*98*)

m14=14;(*99*)

m15=15;(*100*)

m16=16;(*101*)

m17=17;(*102*)

m18=18;(*103*)

m19=19;(*104*)

m20=20;(*105*)

m21=21;(*106*)

m22=22;(*107*)

m23=23;(*108*)

m24=24;(*109*)

m25=25;(*110*)

m26=26;(*111*)

m27=27;(*112*)

m28=28;(*113*)

m29=29;(*114*)

m30=30;(*115*)

m31=31;(*116*)

m32=32;(*117*)

m33=33;(*118*)

m34=34;(*119*)

m35=35;(*120*)
```

m36=36;(*121*)
 m37=37;(*122*)
 m38=38;(*123*)
 m39=39;(*124*)
 m40=40;(*125*)
 m41=41;(*126*)
 m42=42;(*127*)
 m43=43;(*128*)
 m44=44;(*129*)
 m45=45;(*130*)
 m46=46;(*131*)
 m47=47;(*132*)
 m48=48;(*133*)
 m49=49;(*134*)
 m50=50;(*135*)
 m51=51;(*136*)
 m52=52;(*137*)
 m53=53;(*138*)
 m54=54;(*139*)
 m55=55;(*140*)
 m56=56;(*141*)
 m57=57;(*142*)
 m58=58;(*143*)
 m59=59;(*144*)
 m60=60;(*145*)
 m61=61;(*146*)
 m62=62;(*147*)
 m63=63;(*148*)
 m64=64;(*149*)
 m65=65;(*150*)
 m66=66;(*151*)
 m67=67;(*152*)
 m68=68;(*153*)
 m69=69;(*154*)
 m70=70;(*155*)
 m71=71;(*156*)
 m72=72;(*157*)
 m73=73;(*158*)
 m74=74;(*159*)
 m75=75;(*160*)

 (*apo->holo *with kon*conc *)
 k[m2,m2+1*2]=kon*conc;(*87*)
 k[m3,m3+1*2]=kon*conc;(*88*)
 k[m4,m4+1*2]=kon*conc;(*89*)
 k[m5,m5+1*2]=kon*conc;(*90*)

k[m6,m6+! *2]=kon*conc;(*91*)
k[m7,m7+! *2]=kon*conc;(*92*)
k[m8,m8+! *2]=kon*conc;(*93*)
k[m9,m9+! *2]=kon*conc;(*94*)
k[m10,m10+! *2]=kon*conc;(*95*)
k[m11,m11+! *2]=kon*conc;(*96*)
k[m12,m12+! *2]=kon*conc;(*97*)
k[m13,m13+! *2]=kon*conc;(*98*)
k[m14,m14+! *2]=kon*conc;(*99*)
k[m15,m15+! *2]=kon*conc;(*100*)
k[m16,m16+! *2]=kon*conc;(*101*)
k[m17,m17+! *2]=kon*conc;(*102*)
k[m18,m18+! *2]=kon*conc;(*103*)
k[m19,m19+! *2]=kon*conc;(*104*)
k[m20,m20+! *2]=kon*conc;(*105*)
k[m21,m21+! *2]=kon*conc;(*106*)
k[m22,m22+! *2]=kon*conc;(*107*)
k[m23,m23+! *2]=kon*conc;(*108*)
k[m24,m24+! *2]=kon*conc;(*109*)
k[m25,m25+! *2]=kon*conc;(*110*)
k[m26,m26+! *2]=kon*conc;(*111*)
k[m27,m27+! *2]=kon*conc;(*112*)
k[m28,m28+! *2]=kon*conc;(*113*)
k[m29,m29+! *2]=kon*conc;(*114*)
k[m30,m30+! *2]=kon*conc;(*115*)
k[m31,m31+! *2]=kon*conc;(*116*)
k[m32,m32+! *2]=kon*conc;(*117*)
k[m33,m33+! *2]=kon*conc;(*118*)
k[m34,m34+! *2]=kon*conc;(*119*)
k[m35,m35+! *2]=kon*conc;(*120*)
k[m36,m36+! *2]=kon*conc;(*121*)
k[m37,m37+! *2]=kon*conc;(*122*)
k[m38,m38+! *2]=kon*conc;(*123*)
k[m39,m39+! *2]=kon*conc;(*124*)
k[m40,m40+! *2]=kon*conc;(*125*)
k[m41,m41+! *2]=kon*conc;(*126*)
k[m42,m42+! *2]=kon*conc;(*127*)
k[m43,m43+! *2]=kon*conc; (*128*)
k[m44,m44+! *2]=kon*conc;(*129*)
k[m45,m45+! *2]=kon*conc;(*130*)
k[m46,m46+! *2]=kon*conc;(*131*)
k[m47,m47+! *2]=kon*conc;(*132*)
k[m48,m48+! *2]=kon*conc;(*133*)
k[m49,m49+! *2]=kon*conc;(*134*)
k[m50,m50+! *2]=kon*conc;(*135*)

$k[m51, m51+1*2]=kon*conc; (*136*)$
 $k[m52, m52+1*2]=kon*conc; (*137*)$
 $k[m53, m53+1*2]=kon*conc; (*138*)$
 $k[m54, m54+1*2]=kon*conc; (*139*)$
 $k[m55, m55+1*2]=kon*conc; (*140*)$
 $k[m56, m56+1*2]=kon*conc; (*141*)$
 $k[m57, m57+1*2]=kon*conc; (*142*)$
 $k[m58, m58+1*2]=kon*conc; (*143*)$
 $k[m59, m59+1*2]=kon*conc; (*144*)$
 $k[m60, m60+1*2]=kon*conc; (*145*)$
 $k[m61, m61+1*2]=kon*conc; (*146*)$
 $k[m62, m62+1*2]=kon*conc; (*147*)$
 $k[m63, m63+1*2]=kon*conc; (*148*)$
 $k[m64, m64+1*2]=kon*conc; (*149*)$
 $k[m65, m65+1*2]=kon*conc; (*150*)$
 $k[m66, m66+1*2]=kon*conc; (*151*)$
 $k[m67, m67+1*2]=kon*conc; (*152*)$
 $k[m68, m68+1*2]=kon*conc; (*153*)$
 $k[m69, m69+1*2]=kon*conc; (*154*)$
 $k[m70, m70+1*2]=kon*conc; (*155*)$
 $k[m71, m71+1*2]=kon*conc; (*156*)$
 $k[m72, m72+1*2]=kon*conc; (*157*)$
 $k[m73, m73+1*2]=kon*conc; (*158*)$
 $k[m74, m74+1*2]=kon*conc; (*159*)$
 $k[m75, m75+1*2]=kon*conc; (*160*)$

(*holo->apo* with const kon to calculate koff from kd*)

$k[m2+1*2, m2]=kd*kon; (*87*)$
 $k[m3+1*2, m3]=kd*kon; (*88*)$
 $k[m4+1*2, m4]=kd*kon; (*89*)$
 $k[m5+1*2, m5]=kd*kon; (*90*)$
 $k[m6+1*2, m6]=kd*kon; (*91*)$
 $k[m7+1*2, m7]=kd*kon; (*92*)$
 $k[m8+1*2, m8]=kd*kon; (*93*)$
 $k[m9+1*2, m9]=kd*kon; (*94*)$
 $k[m10+1*2, m10]=kd*kon; (*95*)$
 $k[m11+1*2, m11]=kd*kon; (*96*)$
 $k[m12+1*2, m12]=kd*kon; (*97*)$
 $k[m13+1*2, m13]=kd*kon; (*98*)$
 $k[m14+1*2, m14]=kd*kon; (*99*)$
 $k[m15+1*2, m15]=kd*kon; (*100*)$
 $k[m16+1*2, m16]=kd*kon; (*101*)$
 $k[m17+1*2, m17]=kd*kon; (*102*)$
 $k[m18+1*2, m18]=kd*kon; (*103*)$

$k[m19+!^*2,m19]=kd^*kon;(*104^*)$
 $k[m20+!^*2,m20]=kd^*kon;(*105^*)$
 $k[m21+!^*2,m21]=kd^*kon;(*106^*)$
 $k[m22+!^*2,m22]=kd^*kon;(*107^*)$
 $k[m23+!^*2,m23]=kd^*kon;(*108^*)$
 $k[m24+!^*2,m24]=kd^*kon;(*109^*)$
 $k[m25+!^*2,m25]=kd^*kon;(*110^*)$
 $k[m26+!^*2,m26]=kd^*kon;(*111^*)$
 $k[m27+!^*2,m27]=kd^*kon;(*112^*)$
 $k[m28+!^*2,m28]=kd^*kon;(*113^*)$
 $k[m29+!^*2,m29]=kd^*kon;(*114^*)$
 $k[m30+!^*2,m30]=kd^*kon;(*115^*)$
 $k[m31+!^*2,m31]=kd^*kon;(*116^*)$
 $k[m32+!^*2,m32]=kd^*kon;(*117^*)$
 $k[m33+!^*2,m33]=kd^*kon;(*118^*)$
 $k[m34+!^*2,m34]=kd^*kon;(*119^*)$
 $k[m35+!^*2,m35]=kd^*kon;(*120^*)$
 $k[m36+!^*2,m36]=kd^*kon;(*121^*)$
 $k[m37+!^*2,m37]=kd^*kon;(*122^*)$
 $k[m38+!^*2,m38]=kd^*kon;(*123^*)$
 $k[m39+!^*2,m39]=kd^*kon;(*124^*)$
 $k[m40+!^*2,m40]=kd^*kon;(*125^*)$
 $k[m41+!^*2,m41]=kd^*kon;(*126^*)$
 $k[m42+!^*2,m42]=kd^*kon;(*127^*)$
 $k[m43+!^*2,m43]=kd^*kon;(*128^*)$
 $k[m44+!^*2,m44]=kd^*kon;(*129^*)$
 $k[m45+!^*2,m45]=kd^*kon;(*130^*)$
 $k[m46+!^*2,m46]=kd^*kon;(*131^*)$
 $k[m47+!^*2,m47]=kd^*kon;(*132^*)$
 $k[m48+!^*2,m48]=kd^*kon;(*133^*)$
 $k[m49+!^*2,m49]=kd^*kon;(*134^*)$
 $k[m50+!^*2,m50]=kd^*kon;(*135^*)$
 $k[m51+!^*2,m51]=kd^*kon;(*136^*)$
 $k[m52+!^*2,m52]=kd^*kon;(*137^*)$
 $k[m53+!^*2,m53]=kd^*kon;(*138^*)$
 $k[m54+!^*2,m54]=kd^*kon;(*139^*)$
 $k[m55+!^*2,m55]=kd^*kon;(*140^*)$
 $k[m56+!^*2,m56]=kd^*kon;(*141^*)$
 $k[m57+!^*2,m57]=kd^*kon;(*142^*)$
 $k[m58+!^*2,m58]=kd^*kon;(*143^*)$
 $k[m59+!^*2,m59]=kd^*kon;(*144^*)$
 $k[m60+!^*2,m60]=kd^*kon;(*145^*)$
 $k[m61+!^*2,m61]=kd^*kon;(*146^*)$
 $k[m62+!^*2,m62]=kd^*kon;(*147^*)$
 $k[m63+!^*2,m63]=kd^*kon;(*148^*)$

k[m64+!^2,m64]=kd*kon;(*149*)
k[m65+!^2,m65]=kd*kon;(*150*)
k[m66+!^2,m66]=kd*kon;(*151*)
k[m67+!^2,m67]=kd*kon;(*152*)
k[m68+!^2,m68]=kd*kon;(*153*)
k[m69+!^2,m69]=kd*kon;(*154*)
k[m70+!^2,m70]=kd*kon;(*155*)
k[m71+!^2,m71]=kd*kon;(*156*)
k[m72+!^2,m72]=kd*kon;(*157*)
k[m73+!^2,m73]=kd*kon;(*158*)
k[m74+!^2,m74]=kd*kon;(*159*)
k[m75+!^2,m75]=kd*kon;(*160*)

(*apo->AT*)

k[m2,m2+]=0;(*87*)
k[m3,m3+]=0;(*88*)
k[m4,m4+]=0;(*89*)
k[m5,m5+]=0;(*90*)
k[m6,m6+]=0;(*91*)
k[m7,m7+]=0;(*92*)
k[m8,m8+]=0;(*93*)
k[m9,m9+]=0;(*94*)
k[m10,m10+]=0;(*95*)
k[m11,m11+]=0;(*96*)
k[m12,m12+]=0;(*97*)
k[m13,m13+]=0;(*98*)
k[m14,m14+]=0;(*99*)
k[m15,m15+]=0;(*100*)
k[m16,m16+]=0;(*101*)
k[m17,m17+]=0;(*102*)
k[m18,m18+]=0;(*103*)
k[m19,m19+]=0;(*104*)
k[m20,m20+]=0;(*105*)
k[m21,m21+]=0;(*106*)
k[m22,m22+]=0;(*107*)
k[m23,m23+]=0;(*108*)
k[m24,m24+]=0;(*109*)
k[m25,m25+]=0;(*110*)
k[m26,m26+]=0;(*111*)
k[m27,m27+]=0;(*112*)
k[m28,m28+]=0;(*113*)
k[m29,m29+]=0;(*114*)
k[m30,m30+]=0;(*115*)
k[m31,m31+]=0;(*116*)

$k[m32,m32+]=0; (*117*)$
 $k[m33,m33+]=0; (*118*)$
 $k[m34,m34+]=0; (*119*)$
 $k[m35,m35+]=0; (*120*)$
 $k[m36,m36+]=0; (*121*)$
 $k[m37,m37+]=0; (*122*)$
 $k[m38,m38+]=0; (*123*)$
 $k[m39,m39+]=0; (*124*)$
 $k[m40,m40+]=0;(*125*)$
 $k[m41,m41+]=0;(*126*)$
 $k[m42,m42+]=0;(*127*)$
 $k[m43,m43+]=0;(*128*)$
 $k[m44,m44+]=0;(*129*)$
 $k[m45,m45+]=0;(*130*)$
 $k[m46,m46+]=0;(*131*)$
 $k[m47,m47+]=0;(*132*)$
 $k[m48,m48+]=0;(*133*)$
 $k[m49,m49+]=baseclosing ;(*134*)$
 $k[m50,m50+]=baseclosing ;(*135*)$
 $k[m51,m51+]=baseclosing ;(*136*)$
 $k[m52,m52+]=baseclosing ;(*137*)$
 $k[m53,m53+]=baseclosing ;(*138*)$
 $k[m54,m54+]=baseclosing ;(*139*)$
 $k[m55,m55+]=baseclosing ;(*140*)$
 $k[m56,m56+]=baseclosing ;(*141*)$
 $k[m57,m57+]=baseclosing ;(*142*)$
 $k[m58,m58+]=baseclosing ;(*143*)$
 $k[m59,m59+]=baseclosing ;(*144*)$
 $k[m60,m60+]=baseclosing ;(*145*)$
 $k[m61,m61+]=(*baseclosing ;*)2.590597845; (*-1*) (*146*)$
 $k[m62,m62+]=(*baseclosing ;*)1.056087738; (*-2*)(*147*)$
 $k[m63,m63+]=(*baseclosing ;*)0.43052661;(*-3*)(*148*)$
 $k[m64,m64+]=(*baseclosing ;*)0.175509246;(*-4*)(*149*)$
 $k[m65,m65+]=(*baseclosing ;*)0.071548412;(*-5*)(*150*)$
 $k[m66,m66+]=(*baseclosing ;*)0.029167553;(*-6*)(*151*)$
 $k[m67,m67+]=(*baseclosing ;*)0.011890497;(*-7*)(*152*)$
 $k[m68,m68+]=(*baseclosing ;*)0.004847301;(*-8*)(*153*)$
 $k[m69,m69+]=(*baseclosing ;*)0.001976059;(*-9*)(*154*)$
 $k[m70,m70+]=(*baseclosing ;*)0.000805564;(*-10*)(*155*)$
 $k[m71,m71+]=(*baseclosing ;*)0.000805564;(*-10*)(*156*)$
 $k[m72,m72+]=(*baseclosing ;*)0.000805564;(*-10*)(*157*)$
 $k[m73,m73+]=(*baseclosing ;*)0.000805564;(*-10*)(*158*)$
 $k[m74,m74+]=(*baseclosing ;*)0.000805564;(*-10*)(*159*)$
 $k[m75,m75+]=(*baseclosing ;*)0.000805564;(*-10*)(*160*)$

(*AT->apo*)

k[m2+l,m2]=0;

k[m3+l,m3]=0;

k[m4+l,m4]= 0;

k[m5+l,m5]= 0;

k[m6+l,m6]= 0;

k[m7+l,m7]= 0;

k[m8+l,m8]= 0;

k[m9+l,m9]= 0;

k[m10+l,m10]= 0;

k[m11+l,m11]= 0;

k[m12+l,m12]= 0;

k[m13+l,m13]= 0;

k[m14+l,m14]= 0;

k[m15+l,m15]= 0;

k[m16+l,m16]= 0;

k[m17+l,m17]= 0;

k[m18+l,m18]= 0;

k[m19+l,m19]= 0;

k[m20+l,m20]= 0;

k[m21+l,m21]= 0;

k[m22+l,m22]= 0;

k[m23+l,m23]= 0;

k[m24+l,m24]= 0;

k[m25+l,m25]= 0;

k[m26+l,m26]= 0;

k[m27+l,m27]= 0;

k[m28+l,m28]= 0;

k[m29+l,m29]= 0;

k[m30+l,m30]= 0;

k[m31+l,m31]= 0;

k[m32+l,m32]= 0;

k[m33+l,m33]= 0;

k[m34+l,m34]= 0;

k[m35+l,m35]= 0;

k[m36+l,m36]= 0;

k[m37+l,m37]= 0;

k[m38+l,m38]= 0;

k[m39+l,m39]= 0;

k[m40+l,m40]= 0;

k[m41+l,m41]= 0;

k[m42+l,m42]= 0;

k[m43+l,m43]= 0;

k[m44+l,m44]= 0;

k[m45+l,m45]= 0;

$k[m46+l,m46]=0;$
 $k[m47+l,m47]=0;$
 $k[m48+l,m48]=0;$
 $k[m49+l,m49]=2.590597845;(*-1*)(*134*)$
 $k[m50+l,m50]=1.056087738;(*-2*)(*135*)$
 $k[m51+l,m51]=0.43052661;(*-3*)(*136*)$
 $k[m52+l,m52]=0.175509246;(*-4*)(*137*)$
 $k[m53+l,m53]=0.175509246;(*-4*)(*138*)$
 $k[m54+l,m54]=0.175509246;(*-4*)(*139*)$
 $k[m55+l,m55]=0.071548412;(*-5*)(*140*)$
 $k[m56+l,m56]=0.029167553;(*-6*)(*141*)$
 $k[m57+l,m57]=0.011890497;(*-7*)(*142*)$
 $k[m58+l,m58]=0.004847301;(*-8*)(*143*)$
 $k[m59+l,m59]=0.001976059;(*-9*)(*144*)$
 $k[m60+l,m60]=0.000805564;(*-10*)(*145*)$
 $k[m61+l,m61]=0.000328398;(*-11*)(*146*)$
 $k[m62+l,m62]=0.000133875;(*-12*)(*147*)$
 $k[m63+l,m63]=0.000054576;(*-13*)(*148*)$
 $k[m64+l,m64]=0.000054576;(*-13*)(*149*)$
 $k[m65+l,m65]=0.000054576;(*-13*)(*150*)$
 $k[m66+l,m66]=0.000054576;(*-13*)(*151*)$
 $k[m67+l,m67]=0.000054576;(*-13*)(*152*)$
 $k[m68+l,m68]=0.000054576;(*-13*)(*153*)$
 $k[m69+l,m69]=0.000054576;(*-13*)(*154*)$
 $k[m70+l,m70]=0.000054576;(*-13*)(*155*)$
 $k[m71+l,m71]=0.000054576;(*-13*)(*156*)$
 $k[m72+l,m72]=0.000054576;(*-13*)(*157*)$
 $k[m73+l,m73]=0.000054576;(*-13*)(*158*)$
 $k[m74+l,m74]=0.000054576;(*-13*)(*159*)$
 $k[m75+l,m75]=0.000054576;(*-13*)(*160*)$

(*AT->Term*)

$k[m2+l,m2+l*2]=0;(*87*)$
 $k[m3+l,m3+l*2]=0;(*88*)$
 $k[m4+l,m4+l*2]=0;(*89*)$
 $k[m5+l,m5+l*2]=0;(*90*)$
 $k[m6+l,m6+l*2]=0;(*91*)$
 $k[m7+l,m7+l*2]=0;(*92*)$
 $k[m8+l,m8+l*2]=0;(*93*)$
 $k[m9+l,m9+l*2]=0;(*94*)$
 $k[m10+l,m10+l*2]=0;(*95*)$
 $k[m11+l,m11+l*2]=0;(*96*)$
 $k[m12+l,m12+l*2]=0;(*97*)$
 $k[m13+l,m13+l*2]=0;(*98*)$

$k[m14+,m14+*2]=0;(*99*)$
 $k[m15+,m15+*2]=0;(*100*)$
 $k[m16+,m16+*2]=0;(*101*)$
 $k[m17+,m17+*2]=0;(*102*)$
 $k[m18+,m18+*2]=0;(*103*)$
 $k[m19+,m19+*2]=0;(*104*)$
 $k[m20+,m20+*2]=0;(*105*)$
 $k[m21+,m21+*2]=0;(*106*)$
 $k[m22+,m22+*2]=0;(*107*)$
 $k[m23+,m23+*2]=0;(*108*)$
 $k[m24+,m24+*2]=0;(*109*)$
 $k[m25+,m25+*2]=0;(*110*)$
 $k[m26+,m26+*2]=0;(*111*)$
 $k[m27+,m27+*2]=0;(*112*)$
 $k[m28+,m28+*2]=0;(*113*)$
 $k[m29+,m29+*2]=0;(*114*)$
 $k[m30+,m30+*2]=0;(*115*)$
 $k[m31+,m31+*2]=0;(*116*)$
 $k[m32+,m32+*2]=0;(*117*)$
 $k[m33+,m33+*2]=0;(*118*)$
 $k[m34+,m34+*2]=0;(*119*)$
 $k[m35+,m35+*2]=0;(*120*)$
 $k[m36+,m36+*2]=0;(*121*)$
 $k[m37+,m37+*2]=0;(*122*)$
 $k[m38+,m38+*2]=0;(*123*)$
 $k[m39+,m39+*2]=0;(*124*)$
 $k[m40+,m40+*2]=0;(*125*)$
 $k[m41+,m41+*2]=0;(*126*)$
 $k[m42+,m42+*2]=0;(*127*)$
 $k[m43+,m43+*2]=0;(*128*)$
 $k[m44+,m44+*2]=0;(*129*)$
 $k[m45+,m45+*2]=0;(*130*)$
 $k[m46+,m46+*2]=0;(*131*)$
 $k[m47+,m47+*2]=0;(*132*)$
 $k[m48+,m48+*2]=0;(*133*)$
 $k[m49+,m49+*2]=kon*conc;(*-1*) (*134*)$
 $k[m50+,m50+*2]=kon*conc;(*-2*) (*135*)(*low conc limit*)$
 $k[m51+,m51+*2]=kon*conc;(*-3*)(*136*)(*low conc limit*)$
 $k[m52+,m52+*2]=kon*conc;(*-4*) (*137*)(*low conc limit*)$
 $k[m53+,m53+*2]=kon*conc;(*-4*) (*138*)(*low conc limit*)$
 $k[m54+,m54+*2]=kon*conc;(*-4*) (*139*)(*low conc limit*)$
 $k[m55+,m55+*2]=kon*conc;(*-5*)(*140*)(*low conc limit*)$
 $k[m56+,m56+*2]=kon*conc;(*-6*) (*141*)(*low conc limit*)$
 $k[m57+,m57+*2]=0.011890497;(*-7*) (*142*)$
 $k[m58+,m58+*2]=0.004847301;(*-8*)(*143*)$

$k[m59+l,m59+l*2]=0.001976059;(*-9*)(*144*)$
 $k[m60+l,m60+l*2]=0.000805564;(*-10*)(*145*)$
 $k[m61+l,m61+l*2]=0.000328398;(*-11*)(*146*)$
 $k[m62+l,m62+l*2]=0.000133875;(*-12*)(*147*)$
 $k[m63+l,m63+l*2]=0.000054576;(*-13*)(*148*)$
 $k[m64+l,m64+l*2]=0.000054576;(*-13*)(*149*)$
 $k[m65+l,m65+l*2]=0.000054576;(*-13*)(*150*)$
 $k[m66+l,m66+l*2]=0.000054576;(*-13*)(*151*)$
 $k[m67+l,m67+l*2]=0.000054576;(*-13*)(*152*)$
 $k[m68+l,m68+l*2]=0.000054576;(*-13*)(*153*)$
 $k[m69+l,m69+l*2]=0.000054576;(*-13*)(*154*)$
 $k[m70+l,m70+l*2]=0.000054576;(*-13*)(*155*)$
 $k[m71+l,m71+l*2]=0.000054576;(*-13*)(*156*)$
 $k[m72+l,m72+l*2]=0.000054576;(*-13*)(*157*)$
 $k[m73+l,m73+l*2]=0.000054576;(*-13*)(*158*)$
 $k[m74+l,m74+l*2]=0.000054576;(*-13*)(*159*)$
 $k[m75+l,m75+l*2]=0.000054576;(*-13*)(*160*)$

(*Term->AT*)

$k[m2+l*2,m2+l]=0;(*87*)$
 $k[m3+l*2,m3+l]=0;(*88*)$
 $k[m4+l*2,m4+l]=0;(*89*)$
 $k[m5+l*2,m5+l]=0;(*90*)$
 $k[m6+l*2,m6+l]=0;(*91*)$
 $k[m7+l*2,m7+l]=0;(*92*)$
 $k[m8+l*2,m8+l]=0;(*93*)$
 $k[m9+l*2,m9+l]=0;(*94*)$
 $k[m10+l*2,m10+l]=0;(*95*)$
 $k[m11+l*2,m11+l]=0;(*96*)$
 $k[m12+l*2,m12+l]=0;(*97*)$
 $k[m13+l*2,m13+l]=0;(*98*)$
 $k[m14+l*2,m14+l]=0;(*99*)$
 $k[m15+l*2,m15+l]=0;(*100*)$
 $k[m16+l*2,m16+l]=0;(*101*)$
 $k[m17+l*2,m17+l]=0;(*102*)$
 $k[m18+l*2,m18+l]=0;(*103*)$
 $k[m19+l*2,m19+l]=0;(*104*)$
 $k[m20+l*2,m20+l]=0;(*105*)$
 $k[m21+l*2,m21+l]=0;(*106*)$
 $k[m22+l*2,m22+l]=0;(*107*)$
 $k[m23+l*2,m23+l]=0;(*108*)$
 $k[m24+l*2,m24+l]=0;(*109*)$
 $k[m25+l*2,m25+l]=0;(*110*)$
 $k[m26+l*2,m26+l]=0;(*111*)$

$k[m27+1*2,m27+1]=0;(*112*)$
 $k[m28+1*2,m28+1]=0;(*113*)$
 $k[m29+1*2,m29+1]=0;(*114*)$
 $k[m30+1*2,m30+1]=0;(*115*)$
 $k[m31+1*2,m31+1]=0;(*116*)$
 $k[m32+1*2,m32+1]=0;(*117*)$
 $k[m33+1*2,m33+1]=0;(*118*)$
 $k[m34+1*2,m34+1]=0;(*119*)$
 $k[m35+1*2,m35+1]=0;(*120*)$
 $k[m36+1*2,m36+1]=0;(*121*)$
 $k[m37+1*2,m37+1]=0;(*122*)$
 $k[m38+1*2,m38+1]=0;(*123*)$
 $k[m39+1*2,m39+1]=0;(*124*)$
 $k[m40+1*2,m40+1]=0;(*125*)$
 $k[m41+1*2,m41+1]=0;(*126*)$
 $k[m42+1*2,m42+1]=0;(*127*)$
 $k[m43+1*2,m43+1]=0;(*128*)$
 $k[m44+1*2,m44+1]=0;(*129*)$
 $k[m45+1*2,m45+1]=0;(*130*)$
 $k[m46+1*2,m46+1]=0;(*131*)$
 $k[m47+1*2,m47+1]=0;(*132*)$
 $k[m48+1*2,m48+1]=0;(*133*)$
 $k[m49+1*2,m49+1]=kd*kon;(*134*)$
 $k[m50+1*2,m50+1]=kd*kon;(*135*)$
 $k[m51+1*2,m51+1]=kd*kon;(*136*)$
 $k[m52+1*2,m52+1]=kd*kon;(*137*)$
 $k[m53+1*2,m53+1]=kd*kon;(*138*)$
 $k[m54+1*2,m54+1]=kd*kon;(*139*)$
 $k[m55+1*2,m55+1]=kd*kon;(*140*)$
 $k[m56+1*2,m56+1]=kd*kon;(*141*)$
 $k[m57+1*2,m57+1]=kd*kon;(*142*)$
 $k[m58+1*2,m58+1]=kd*kon;(*143*)$
 $k[m59+1*2,m59+1]=kd*kon;(*144*)$
 $k[m60+1*2,m60+1]=kd*kon;(*145*)$
 $k[m61+1*2,m61+1]=7*10^{-6}*kon;(*-1*)(*146*)$
 $k[m62+1*2,m62+1]=7*10^{-6}*kon;(*-2*)(*147*)$
 $k[m63+1*2,m63+1]=0.43052661;(*-3*)(*148*)$
 $k[m64+1*2,m64+1]=0.175509246;(*-4*)(*149*)$
 $k[m65+1*2,m65+1]=0.071548412;(*-5*)(*150*)$
 $k[m66+1*2,m66+1]=0.029167553;(*-6*)(*151*)$
 $k[m67+1*2,m67+1]=0.011890497;(*-7*)(*152*)$
 $k[m68+1*2,m68+1]=0.004847301;(*-8*)(*153*)$
 $k[m29+1*2,m69+1]=0.001976059;(*-9*)(*154*)$
 $k[m70+1*2,m70+1]=0.000805564;(*-10*)(*155*)$
 $k[m71+1*2,m71+1]=0.000805564;(*-10*)(*156*)$

k[m72+1*2,m72+1]=0.000805564;(*-10*)(*157*)

k[m73+1*2,m73+1]=0.000805564;(*-10*)(*158*)

k[m74+1*2,m74+1]=0.000805564;(*-10*)(*159*)

k[m75+1*2,m75+1]=0.000805564;(*-10*)(*160*)

KM//MatrixForm ;

```
K=Transpose[KM];
For[i=1,i<=n,i++,K[[i,i]]=-Sum[KM[[i,j]],{j,1,n}];K//MatrixForm ;(*hier kann man sich die transponierte matrix anschauen*)
Clear[p];
p0=Table[0,n];
Part[p0,1]=1;
p0
(*Length[p0]*)
p[t_,p0_]:=MatrixExp[t K],p0
```

```
SessionTime[]
TimeObject[]
plotend=180
synth=20
conc= 100*10^-9
kon=16259
kd=420*10^-9 (*590+250)/2*)
baseclosing=400 (*4000 macht schon 10 min rechnen zeit bitte keine 4000000 eintragen*)
```

y1=100*10^-6(**)
y2=100*10^-9(**)

```
p206=ContourPlot[{{p[t, p0[[m2]]}+{p[t, p0[[m3]]}+{p[t, p0[[m4]]}+{p[t, p0[[m5]]}+{p[t, p0[[m6]]}+{p[t, p0[[m7]]}+{p[t, p0[[m8]]}+{p[t, p0[[m9]]}+{p[t, p0[[m10]]}+{p[t, p0[[m11]]}+{p[t, p0[[m12]]}+{p[t, p0[[m13]]}+{p[t, p0[[m14]]}+{p[t, p0[[m15]]}+{p[t, p0[[m16]]}+{p[t, p0[[m17]]}+{p[t, p0[[m18]]}+{p[t, p0[[m19]]}+{p[t, p0[[m20]]}+{p[t, p0[[m21]]}+{p[t, p0[[m22]]}+{p[t, p0[[m23]]}+{p[t, p0[[m24]]}+{p[t, p0[[m25]]}+{p[t, p0[[m26]]}+{p[t, p0[[m27]]}+{p[t, p0[[m28]]}+{p[t, p0[[m29]]}+{p[t, p0[[m30]]}+{p[t, p0[[m31]]}+{p[t, p0[[m32]]}+{p[t, p0[[m33]]}+{p[t, p0[[m34]]}+{p[t, p0[[m35]]}+{p[t, p0[[m36]]}+{p[t, p0[[m37]]}+{p[t, p0[[m38]]}+{p[t, p0[[m39]]}+{p[t, p0[[m40]]}+{p[t, p0[[m41]]}+{p[t, p0[[m42]]}+{p[t, p0[[m43]]}+{p[t, p0[[m44]]}+{p[t, p0[[m45]]}+{p[t, p0[[m46]]}+{p[t, p0[[m47]]}+{p[t, p0[[m48]]}+{p[t, p0[[m49]]}+{p[t, p0[[m50]]}+{p[t, p0[[m51]]}+{p[t, p0[[m52]]}+{p[t, p0[[m53]]}+{p[t, p0[[m54]]}+{p[t, p0[[m55]]}+{p[t, p0[[m56]]}+{p[t, p0[[m57]]}+{p[t, p0[[m58]]}+{p[t, p0[[m59]]}+{p[t, p0[[m60]]}+{p[t, p0[[m61]]}+{p[t, p0[[m62]]}+{p[t, p0[[m63]]}+{p[t, p0[[m64]]}+{p[t, p0[[m65]]}+{p[t, p0[[m66]]}+{p[t, p0[[m67]]}+{p[t, p0[[m68]]}+{p[t, p0[[m69]]}+{p[t, p0[[m70]]}+{p[t, p0[[m71]]}+{p[t, p0[[m72]]}+{p[t, p0[[m73]]}+{p[t, p0[[m74]]}+{p[t, p0[[m75]]}}],1, {t, 0, plotend}, {conc,y1,y2}, ContourStyle->None,ContourShading->Automatic,ColorFunction->"Rainbow",PlotLegends->BarLegend[{"Rainbow"},{0,1}],PlotRange->{0,1},Contours->20,ColorFunctionScaling->False]
```

```
p207=ContourPlot[{{p[t, p0[[m2+1]]}+{p[t, p0[[m3+1]]}+{p[t, p0[[m4+1]]}+{p[t, p0[[m5+1]]}+{p[t, p0[[m6+1]]}+{p[t, p0[[m7+1]]}+{p[t, p0[[m8+1]]}+{p[t, p0[[m9+1]]}+{p[t, p0[[m10+1]]}+{p[t, p0[[m11+1]]}+{p[t, p0[[m12+1]]}+{p[t, p0[[m13+1]]}+{p[t, p0[[m14+1]]}+{p[t, p0[[m15+1]]}+{p[t, p0[[m16+1]]}+{p[t, p0[[m17+1]]}+{p[t, p0[[m18+1]]}+{p[t, p0[[m19+1]]}+{p[t, p0[[m20+1]]}+{p[t, p0[[m21+1]]}+{p[t, p0[[m22+1]]}+{p[t, p0[[m23+1]]}+{p[t, p0[[m24+1]]}+{p[t, p0[[m25+1]]}+{p[t, p0[[m26+1]]}+{p[t, p0[[m27+1]]}+{p[t, p0[[m28+1]]}+{p[t, p0[[m29+1]]}+{p[t, p0[[m30+1]]}+{p[t, p0[[m31+1]]}+{p[t, p0[[m32+1]]}+{p[t, p0[[m33+1]]}+{p[t, p0[[m34+1]]}+{p[t, p0[[m35+1]]}+{p[t, p0[[m36+1]]}+{p[t, p0[[m37+1]]}+{p[t, p0[[m38+1]]}+{p[t, p0[[m39+1]]}+{p[t, p0[[m40+1]]}+{p[t, p0[[m41+1]]}+{p[t, p0[[m42+1]]}+{p[t, p0[[m43+1]]}+{p[t, p0[[m44+1]]}+{p[t, p0[[m45+1]]}+{p[t, p0[[m46+1]]}+{p[t, p0[[m47+1]]}+{p[t, p0[[m48+1]]}+{p[t, p0[[m49+1]]}+{p[t, p0[[m50+1]]}+{p[t, p0[[m51+1]]}+{p[t, p0[[m52+1]]}+{p[t, p0[[m53+1]]}+{p[t, p0[[m54+1]]}+{p[t, p0[[m55+1]]}+{p[t, p0[[m56+1]]}+{p[t, p0[[m57+1]]}+{p[t, p0[[m58+1]]}+{p[t, p0[[m59+1]]}+{p[t, p0[[m60+1]]}+{p[t, p0[[m61+1]]}+{p[t, p0[[m62+1]]}+{p[t, p0[[m63+1]]}+{p[t, p0[[m64+1]]}+{p[t, p0[[m65+1]]}+{p[t, p0[[m66+1]]}+{p[t, p0[[m67+1]]}+{p[t, p0[[m68+1]]}+{p[t, p0[[m69+1]]}+{p[t, p0[[m70+1]]}+{p[t, p0[[m71+1]]}+{p[t, p0[[m72+1]]}+{p[t, p0[[m73+1]]}+{p[t, p0[[m74+1]]}+{p[t, p0[[m75+1]]}]/1.0, {t, 0, plotend}, {conc,y1,y2}, ContourStyle->None,ContourShading->Automatic,ColorFunction->"Rainbow",PlotLegends->BarLegend[{"Rainbow"},{0,1}],PlotRange->{0,1},Contours->20,ColorFunctionScaling->False]
```

```
p208=ContourPlot[{{p[t, p0[[m2+2*]]}+{p[t, p0[[m3+2*]]}+{p[t, p0[[m4+2*]]}+{p[t, p0[[m5+2*]]}+{p[t, p0[[m6+2*]]}+{p[t, p0[[m7+2*]]}+{p[t, p0[[m8+2*]]}+{p[t, p0[[m9+2*]]}+{p[t, p0[[m10+2*]]}+{p[t, p0[[m11+2*]]}+{p[t, p0[[m12+2*]]}+{p[t, p0[[m13+2*]]}+{p[t, p0[[m14+2*]]}+{p[t, p0[[m15+2*]]}+{p[t, p0[[m16+2*]]}+{p[t, p0[[m17+2*]]}+{p[t, p0[[m18+2*]]}+{p[t, p0[[m19+2*]]}+{p[t, p0[[m20+2*]]}+{p[t, p0[[m21+2*]]}+{p[t, p0[[m22+2*]]}+{p[t, p0[[m23+2*]]}+{p[t, p0[[m24+2*]]}+{p[t, p0[[m25+2*]]}+{p[t, p0[[m26+2*]]}+{p[t, p0[[m27+2*]]}+{p[t, p0[[m28+2*]]}+{p[t, p0[[m29+2*]]}+{p[t, p0[[m30+2*]]}+{p[t, p0[[m31+2*]]}+{p[t, p0[[m32+2*]]}+{p[t, p0[[m33+2*]]}+{p[t, p0[[m34+2*]]}+{p[t, p0[[m35+2*]]}+{p[t, p0[[m36+2*]]}+{p[t, p0[[m37+2*]]}+{p[t, p0[[m38+2*]]}+{p[t, p0[[m39+2*]]}+{p[t, p0[[m40+2*]]}+{p[t, p0[[m41+2*]]}+{p[t, p0[[m42+2*]]}+{p[t, p0[[m43+2*]]}+{p[t, p0[[m44+2*]]}+{p[t, p0[[m45+2*]]}+{p[t, p0[[m46+2*]]}+{p[t, p0[[m47+2*]]}+{p[t, p0[[m48+2*]]}+{p[t, p0[[m49+2*]]}+{p[t, p0[[m50+2*]]}+{p[t, p0[[m51+2*]]}+{p[t, p0[[m52+2*]]}+{p[t, p0[[m53+2*]]}+{p[t, p0[[m54+2*]]}+{p[t, p0[[m55+2*]]}+{p[t, p0[[m56+2*]]}+{p[t, p0[[m57+2*]]}+{p[t, p0[[m58+2*]]}+{p[t, p0[[m59+2*]]}+{p[t, p0[[m60+2*]]}+{p[t, p0[[m61+2*]]}+{p[t, p0[[m62+2*]]}+{p[t, p0[[m63+2*]]}+{p[t, p0[[m64+2*]]}+{p[t, p0[[m65+2*]]}+{p[t, p0[[m66+2*]]}+{p[t, p0[[m67+2*]]}+{p[t, p0[[m68+2*]]}+{p[t, p0[[m69+2*]]}+{p[t, p0[[m70+2*]]}+{p[t, p0[[m71+2*]]}+{p[t, p0[[m72+2*]]}+{p[t, p0[[m73+2*]]}+{p[t, p0[[m74+2*]]}+{p[t, p0[[m75+2*]]}]/1, {t, 0, plotend}, {conc ,y1,y2}, ContourStyle->None,ContourShading->Automatic,ColorFunction->"Rainbow",PlotLegends->BarLegend[{"Rainbow"},{0,1}],PlotRange->{0,1},Contours->20,ColorFunctionScaling->False]
EmitSound[Sound[{"C"},SoundNote["G"],SoundNote["C5"]]
SessionTime[]
```

A3: Tabellen der verwendete Raten im Markov Modeling

		Hohe	c-di-GMP	Konzentration		
	conc = $100 \cdot 10^{-6}$	baseclosing = 400				
	kon= 16259	kd = $420 \cdot 10^{-9}$				
Nukleotid	apo-> holo/T	holo/T-> apo	apo-> AT	AT-> apo	AT-> holo/T	holo/T-> AT
87-133	kon*conc	kd*kon	0	0	0	0
134	kon*conc	kd*kon	baseclosing	2,590597845	kon*conc	kd*kon
135	kon*conc	kd*kon	baseclosing	1,056087738	1,056087738	kd*kon
136	kon*conc	kd*kon	baseclosing	0,430526610	0,430526610	kd*kon
137	kon*conc	kd*kon	baseclosing	0,175509246	0,175509246	kd*kon
138	kon*conc	kd*kon	baseclosing	0,175509246	0,175509246	kd*kon
139	kon*conc	kd*kon	baseclosing	0,175509246	0,175509246	kd*kon
140	kon*conc	kd*kon	baseclosing	0,071548412	0,071548412	kd*kon
141	kon*conc	kd*kon	baseclosing	0,029167553	0,029167553	kd*kon
142	kon*conc	kd*kon	baseclosing	0,011890497	0,011890497	kd*kon
143	kon*conc	kd*kon	baseclosing	0,004847301	0,004847301	kd*kon
144	kon*conc	kd*kon	baseclosing	0,001976059	0,001976059	kd*kon
145	kon*conc	kd*kon	baseclosing	0,000805564	0,000805564	kd*kon
146	kon*conc	kd*kon	2,590597845	0,000328398	0,000328398	$7 \cdot 10^{-6} \cdot \text{kon}$
147	kon*conc	kd*kon	1,056087738	0,000133875	0,000133875	$7 \cdot 10^{-6} \cdot \text{kon}$
148	kon*conc	kd*kon	0,430526610	0,000054576	0,000054576	0,43052661
149	kon*conc	kd*kon	0,175509246	0,000054576	0,000054576	0,175509246
150	kon*conc	kd*kon	0,071548412	0,000054576	0,000054576	0,071548412
151	kon*conc	kd*kon	0,029167553	0,000054576	0,000054576	0,029167553
152	kon*conc	kd*kon	0,011890497	0,000054576	0,000054576	0,011890497
153	kon*conc	kd*kon	0,004847301	0,000054576	0,000054576	0,004847301
154	kon*conc	kd*kon	0,001976059	0,000054576	0,000054576	0,001976059
155	kon*conc	kd*kon	0,000805564	0,000054576	0,000054576	0,000805564
156	kon*conc	kd*kon	0,000805564	0,000054576	0,000054576	0,000805564
157	kon*conc	kd*kon	0,000805564	0,000054576	0,000054576	0,000805564
158	kon*conc	kd*kon	0,000805564	0,000054576	0,000054576	0,000805564
159	kon*conc	kd*kon	0,000805564	0,000054576	0,000054576	0,000805564
160	kon*conc	kd*kon	0,000805564	0,000054576	0,000054576	0,000805564

Tabelle S1: Verwendete Übergangsraten bei hoher (100 μM) c-di-GMP Konzentration

		Niedrige	c-di-GMP	Konzentration		
conc =		100*10 ⁻⁹	baseclosing =	400		
kon=		16259	kd =	420*10 ⁻⁹		
nucleotide	apo-> holo/T	holo/T-> apo	apo-> AT	AT-> apo	AT-> holo/T	holo/T-> AT
87-133	kon*conc	kd*kon	0	0	0	0
134	kon*conc	kd*kon	baseclosing	2,590597845	kon*conc	kd*kon
135	kon*conc	kd*kon	baseclosing	1,056087738	kon*conc	kd*kon
136	kon*conc	kd*kon	baseclosing	0,430526610	kon*conc	kd*kon
137	kon*conc	kd*kon	baseclosing	0,175509246	kon*conc	kd*kon
138	kon*conc	kd*kon	baseclosing	0,175509246	kon*conc	kd*kon
139	kon*conc	kd*kon	baseclosing	0,175509246	kon*conc	kd*kon
140	kon*conc	kd*kon	baseclosing	0,071548412	kon*conc	kd*kon
141	kon*conc	kd*kon	baseclosing	0,029167553	kon*conc	kd*kon
142	kon*conc	kd*kon	baseclosing	0,011890497	0,011890497	kd*kon
143	kon*conc	kd*kon	baseclosing	0,004847301	0,004847301	kd*kon
144	kon*conc	kd*kon	baseclosing	0,001976059	0,001976059	kd*kon
145	kon*conc	kd*kon	baseclosing	0,000805564	0,000805564	kd*kon
146	kon*conc	kd*kon	2,590597845	0,000328398	0,000328398	7*10 ⁻⁶ *kon
147	kon*conc	kd*kon	1,056087738	0,000133875	0,000133875	7*10 ⁻⁶ *kon
148	kon*conc	kd*kon	0,430526610	0,000054576	0,000054576	0,43052661
149	kon*conc	kd*kon	0,175509246	0,000054576	0,000054576	0,175509246
150	kon*conc	kd*kon	0,071548412	0,000054576	0,000054576	0,071548412
151	kon*conc	kd*kon	0,029167553	0,000054576	0,000054576	0,029167553
152	kon*conc	kd*kon	0,011890497	0,000054576	0,000054576	0,011890497
153	kon*conc	kd*kon	0,004847301	0,000054576	0,000054576	0,004847301
154	kon*conc	kd*kon	0,001976059	0,000054576	0,000054576	0,001976059
155	kon*conc	kd*kon	0,000805564	0,000054576	0,000054576	0,000805564
156	kon*conc	kd*kon	0,000805564	0,000054576	0,000054576	0,000805564
157	kon*conc	kd*kon	0,000805564	0,000054576	0,000054576	0,000805564
158	kon*conc	kd*kon	0,000805564	0,000054576	0,000054576	0,000805564
159	kon*conc	kd*kon	0,000805564	0,000054576	0,000054576	0,000805564
160	kon*conc	kd*kon	0,000805564	0,000054576	0,000054576	0,000805564

Tabelle S2: Verwendete Übergangsraten bei niedriger (100 nM) c-di-GMP Konzentration

This thesis contains collaborative work

“Except where stated otherwise by reference or acknowledgment, the work presented was generated by myself under the supervision of my advisors during my doctoral studies. All contributions from colleagues are explicitly referenced in the thesis. The material listed below was obtained in the context of collaborative research:

Kapitel 5 Licht geschalteter RNA Doppelstrang. Die Proben und das Konzept des RNA Doppelstrang mit denen die NMR Spectren gemessen wurden wurden von Josefine Peterka aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Alexander Heckel bereitgestellt.

Kapitel 6 SARS-CoV-2 RNA Sekundärstruktur Aufklärung RNA 5_SL1 und 5_SL7. Die RNA Proben wurden von zahlreichen Kollegen im Labor hergestellt und von Dr. Christian Richter gemessen. Die Auswertung erfolgte zum Zweck der Schnelligkeit und Überprüfung doppelt zusammen mit Dr. Oliver Binas.

Whenever a figure, table or text is identical to a previous publication, it is stated explicitly in the thesis that copyright permission and/or co-author agreement has been obtained.

The following parts of the thesis have been previously published:

- Chapter 3,4 and 6 are in large parts published in peer reviewed journals
- Figures 3,5,6,7,9,23,24,25,26,27,35,36,38,48,50,51,52,53
- Tables 1 and A1

Veröffentlichungen

19F-NMR-based fragment screening for 14 different biologically active RNAs and 10 DNA and protein counter-screens.

Oliver Binas⁺, Vanesa de Jesus⁺, **Tom Landgraf**⁺, Albrecht Eduard Völklein⁺, Jason Martins, Daniel Hyman, Jasleen Kaur Bains, Hannes Berg, Thomas Biedenbänder, Boris Fürtig, Santosh Lakshmi Gande, Anna Niesteruk, Andreas, Oxenfarth, Nusrat Shahin Qureshi, Tatjana Schamber, Robbin Schnieders, Alix Tröster, Anna Wacker, Julia WirmerBartoschek, Maria Alexandra Wirtz Martin, Elke Stirnal, Kamal Azzaoui, Marcel Jules José Blommers, Christian Richter, Sridhar Sreeramulu, and Harald Schwalbe 2020

***Chembiochem* 2021, 22, 2, 423-433.**

Secondary structure determination of conserved SARS-CoV-2 RNA elements by NMR spectroscopy

Anna Wacker, Julia E Weigand, Sabine R Akabayov, Nadide Altincekic, Jasleen Kaur Bains, Elnaz Banijamali, Oliver Binas, Jesus Castillo-Martinez, Erhan Cetiner, Betül Ceylan, Liang-Yuan Chiu, Jesse Davila-Calderon, Karthikeyan Dhamotharan, Elke Duchardt-Ferner, Jan Ferner, Lucio Frydman, Boris Fürtig, José Gallego, J Tassilo Grün, Carolin Hacker, Christina Haddad, Martin Hähnke, Martin Hengesbach, Fabian Hiller, Katharina F Hohmann, Daniel Hyman, Vanessa de Jesus, Henry Jonker, Heiko Keller, Bozana Knezic, **Tom Landgraf**, Frank Löhr, Le Luo, Klara R Mertinkus, Christina Muhs, Mihajlo Novakovic, Andreas Oxenfarth, Martina Palomino-Schätzlein, Katja Petzold, Stephen A Peter, Dennis J Pyper, Nusrat S Qureshi, Magdalena Riad, Christian Richter, Krishna Saxena, Tatjana Schamber, Tali Scherf, Judith Schlagnitweit, Andreas Schlundt, Robbin Schnieders, Harald Schwalbe, Alvaro Simba-Lahuasi, Sridhar Sreeramulu, Elke Stirnal, Alexey Sudakov, Jan-Niklas Tants, Blanton S Tolbert, Jennifer Vögele, Lena Weiß, Julia Wirmer-Bartoschek, Maria A Wirtz Martin, Jens Wöhnert, Heidi Zetzsche

***Nucleic Acids Research*, 48, 22, 2020, 12415–12435**

¹H, ¹³C and ¹⁵N assignment of stem-loop SL1 from the 5'-UTR of SARS-CoV-2

Christian Richter, Katharina F. Hohmann, Sabrina Toews, Daniel Mathieu, Nadide Altincekic, Jasleen Kaur Bains, Oliver Binas, Betül, Elke Duchardt-Ferner, Jan Ferner, Boris Fürtig, J. Tassilo Grün, Martin Hengesbach, Daniel Hyman, Hendrik R. A. Jonker, Bozana Knezic, Sophie M. Korn, **Tom Landgraf**, Frank Löhr, Stephen A. Peter, Dennis J. Pyper, Nusrat S. Qureshi, Andreas Schlundt, Robbin Schnieders, Elke Stirnal, Alexey Sudakov, Jennifer Vögele, Julia E. Weigand, Julia Wirmer-Bartoschek, Kerstin Witt, Jens Wöhnert, Harald Schwalbe, Anna Wacke

***Biomol NMR Assign* (2021). <https://doi.org/10.1007/s12104-021-10047-2>**

The cotranscriptional folding landscape for two cyclic di-nucleotide-sensing riboswitches with highly homologous aptamer domains acting either as ON- or OFF-switches

Tom Landgraf, Albrecht Eduard Völklein, Boris Fürtig, Harald Schwalbe

***Nucleic Acids Research* (2022), gkac514, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac514>**

Konferenzbeiträge

Vorträge

- **SPP 1879 International Symposium 2018:** Exploring the *Clostridium difficile* Cd1 c-di-GMP- binding riboswitch with NMR-methods

Poster

-SPP 1879 Kick-off Meeting: **NMR screening of RNA secondary structure and binding of bacterial secondary messenger**

-**SPP 1879 Progress Meeting 2017:** NMR screening of RNA secondary structure and binding of c-di-GMP (3',5') to the Cd1-Riboswitch

-**SPP 1879 International Symposium 2018:** NMR screening of RNA secondary structure and binding of c-di-GMP (3',5') to the Cd1-Riboswitch

- **Structural biology approaches for drug development 2018 Budapest, Hungary:** NMR screening of RNA secondary structure and binding of c-di-GMP (3',5') to the Cd1-Riboswitch

-**ISMAR EUROMAR Joint Conference 2019 :** NMR screening of RNA secondary structure and binding of c-di-GMP (3',5') to the Cd1-Riboswitch

-**ENC virtual Conference 2021:** NMR screening of RNA secondary structure and binding of c-di-GMP (3',5') to the Cd1-Riboswitch