

# NMR-spektroskopische Untersuchungen an katalytischer RNA

Ein Spleißosom basiertes lariatformendes  
Ribozym

Die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe in RNA  
und deren Rolle in der Strukturstabilität

DISSERTATIONSSCHRIFT zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften

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

von **Jörg Fohrer** aus Frankfurt am Main

2007





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

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Christian Griesinger und Prof. Dr. Joachim Engels

Datum der Disputation:.....

*Meiner Familie*



*Dem Wahren Schönen Guten*

*Johann Wolfgang von Goethe*

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit vom 01.03.2004 bis zum 01.12.2007 am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen unter der Leitung von PD Dr. Carlomagno, Prof. Dr. Griesinger und Prof. Dr. Engels.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit hilfreich zur Seite gestanden haben, meinen herzlichen Dank aussprechen.

Prof. Dr. C. Griesinger danke ich für sein reges Interesse, die fruchtbaren Diskussionen, die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten und die Begutachtung der vorliegenden Arbeit. Prof. Dr. J. Engels möchte ich meinen Dank für sein reges Interesse, die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen und die Begutachtung meiner Arbeit aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Teresa Carlomagno für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die hilfreiche Unterstützung, die erheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Melanie Falb möchte ich für die Zusammenarbeit auf dem Projekt des lariatförmigen Ribozyms danken. Claudia Schwiek danke ich sehr für die Bereitstellung der RNA-Proben und Dr. Mirko Hennig für die deuteriummarkierten Proben der TAR-RNA sowie die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen.

Dr. Jochen Junker und Dr. Dirk Bockelmann danke ich für die Unterstützung bei computertechnischen Problemen.

Ich möchte Dr. Edward d’Auvergne, Dr. Christoph Fares, Dr. Peter Haberz, Dr. Ping Li, Marco Mukrasch, Dr. Devanathan Ragunathan und Marcel Reese, die mir oft hilfreich zur Seite standen für die produktive, freundschaftliche und unvergessliche Atmosphäre danken.

Melanie Falb, Kerstin Overkamp, Fabian Peters und Dr. Claudia Volk möchte ich für die Durchsicht meiner Arbeit und die Verbesserungsvorschläge danken.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die gute Atmosphäre während meiner Dissertation.

Ich möchte der Max-Planck-Gesellschaft und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung durch den Sonderforschungsbereich 416 "Chemische und biologische Synthese und Transformation von Naturstoffen und Naturstoff-Analoga" danken.

Meinen Freunden für ihr Interesse und den seelischen Beistand. Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich im Verlauf meines bisherigen Lebens in jeder Hinsicht unterstützt hat. Besonderer Dank gebührt dabei meinem Vater Horst Fohrer und meinen Geschwistern Claudia, Marion und Matthias.

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| Abkürzungen und Akronyme  | xxi       |
| <b>1 Einleitung: mRNA-Prozessierung im Spleißosom</b>                   | <b>1</b>  |
| 1.1 Prozessierung der prä-mRNA  | 1         |
| 1.2 Das Spleißosom  | 2         |
| 1.2.1 Die Spleißreaktion  | 3         |
| 1.2.2 Der aktivierte Komplex B* des Spleißosoms                         | 5         |
| 1.2.3 Die Tertiärstruktur des aktivierten Komplex B*<br>und Komplex C   | 10        |
| 1.3 Ein lariatbildendes Ribozym   | 13        |
| <b>2 Zielsetzung</b>  | <b>17</b> |
| <b>3 Ergebnisse: Das lariatbildende Ribozym</b>                         | <b>19</b> |
| 3.1 Mutationsstudien: Die lineare Form des<br>lariatbildenden Ribozyms  | 19        |
| 3.2 NMR-Spektroskopie: die lineare Form des<br>lariatbildenden Ribozyms | 24        |
| 3.2.1 Die Zuordnung der Resonanzen des linearen<br>Ribozyms             | 24        |
| 3.2.2 Die Resonanzen der einzelnen Nukleotide                           | 26        |
| 3.2.2.1 Der konformationelle Austausch des linearen Ribo-<br>zyms       | 27        |
| 3.2.2.2 Die Zuordnung der Ribose  | 28        |
| 3.2.2.3 Die Zuordnung der Base  | 30        |
| 3.2.2.4 Die Zuordnung der Base zur Ribose                               | 32        |
| 3.2.2.5 Die sequentielle Zuordnung des linearen Ribozyms                | 33        |
| 3.2.3 NMR-Spektren des H3', H4', H5'H5''- <sup>2</sup> H-Ribozyms       | 36        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.2.4    | Das <i>branchpoint</i> Adenosin a48 . . . . .  | 38        |
| 3.2.5    | Die Wasserstoffbrücken im Ribozym . . . . .  | 41        |
| 3.2.6    | Die Zuordnung des linearen Ribozyms . . . . .  | 44        |
| 3.3      | Das Lariat des Ribozyms . . . . .  | 45        |
| 3.4      | Kristallisation des linearen lariatformenden<br>Ribozyms . . . . .   | 47        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion: Das lariatbildende Ribozym</b>  | <b>49</b> |
| 4.1      | Die Sekundärstruktur des lariatbildenden<br>Ribozyms . . . . .   | 50        |
| 4.2      | Die Tertiärstruktur des lariatbildenden<br>Ribozyms . . . . .  | 53        |
| 4.3      | Das <i>branchpoint</i> Adenosin a48 des lariatbildenden Ribozyms . . . . .   | 54        |
| 4.4      | Das Lariat des lariatbildenden Ribozyms . . . . .  | 56        |
| <b>5</b> | <b>Einleitung: Die 2'-Hydroxylgruppe in der RNA</b>  | <b>57</b> |
| 5.1      | Die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe in der RNA . . . . .  | 59        |
| 5.2      | Die skalaren Kopplungen der<br>2'-Hydroxylgruppe . . . . .   | 61        |
| 5.3      | Theorie der skalaren Kopplung . . . . .  | 64        |
| 5.4      | TAR-RNA . . . . .  | 66        |
| <b>6</b> | <b>Zielsetzung</b>   | <b>69</b> |
| <b>7</b> | <b>Ergebnisse: Die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe in der RNA</b>   | <b>71</b> |
| 7.1      | Messungen der $^2J$ - und $^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe . . . . .  | 71        |
| 7.2      | Ab-initio Kalkulationen der $^2J$ - und $^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxyl-<br>gruppe . . . . .                     | 74        |
| 7.3      | NOEs der 2'-Hydroxylgruppe . . . . .   | 82        |
| 7.3.1    | Messung der NOEs der 2'-Hydroxylgruppe . . . . .   | 82        |
| 7.3.2    | Theoretische Ermittlung der Abstände der 2'-Hydroxylprotonen<br>zu Wasserstoffatomen der Ribose und Base . . . . . | 85        |
| 7.3.3    | Simulation der NOEs der 2'-Hydroxylprotonen zu den anderen<br>Wasserstoffatomen in der Ribose und Base . . . . .   | 89        |
| 7.4      | Die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe . . . . .   | 91        |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| <b>8</b>  | <b>Diskussion: Auswirkungen der 2'-Hydroxylgruppe auf die Hydrathülle der RNA</b>  | <b>95</b>  |
| 8.1       | Der Austausch der 2'-Hydroxylgruppe<br>mit Wasser . . . . .  | 96         |
| 8.2       | Die $^3J$ -Kopplungen und die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe . . .   | 97         |
| 8.3       | Die $^2J$ -Kopplung und die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe . . . . .   | 102        |
| 8.4       | Die NOEs der 2'-Hydroxylgruppe . . . . .   | 102        |
| 8.5       | Die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe . . . . .   | 104        |
| <b>9</b>  | <b>Material und Methoden</b>   | <b>109</b> |
| 9.1       | Material . . . . .   | 109        |
| 9.2       | Methoden . . . . .   | 113        |
| 9.2.1     | RNA-Synthese . . . . .   | 113        |
| 9.2.1.1   | Biochemische Synthese der TAR-RNA . . . . .  | 114        |
| 9.2.1.2   | Biochemische Synthese des <i>Hammerhead</i> -Ribozyms<br>für das lariatformenden Ribozym . . . . .                           | 116        |
| 9.2.1.3   | Biochemische Synthese des lariatformenden Ribozyms   | 117        |
| 9.2.1.4   | Verwendete RNA-Proben . . . . .  | 118        |
| 9.2.2     | NMR-Experimente . . . . .  | 119        |
| 9.2.2.1   | <i>Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy</i> . . . . .  | 119        |
| 9.2.2.2   | Das 3D $^{13}C$ -editierte $^{13}C$ -gefilterte NOESY und<br>das 3D $^{13}C$ -editierte $^{12}C$ -gefilterte NOESY . . . . . | 122        |
| 9.2.2.3   | Das 3D HCCH-COSY TOCSY . . . . .   | 124        |
| 9.2.2.4   | Experimente zur Bestimmung des <i>sugar pucker</i> :<br>das HCCH-E.COSY . . . . .  | 126        |
| 9.2.2.5   | Das PH-ct-COSY . . . . .   | 130        |
| 9.2.2.6   | Die HCNs und das H(C)N(C)H . . . . .   | 131        |
| 9.2.3     | Kristallisation . . . . .  | 135        |
| <b>10</b> | <b>Zusammenfassung</b>   | <b>137</b> |
| <b>11</b> | <b>Publikationen</b>   | <b>141</b> |
| <b>A</b>  | <b>Pulsprogramme</b>   | <b>177</b> |
| <b>B</b>  | <b>Kristallisationsbedingungen</b>   | <b>241</b> |

|                            |            |
|----------------------------|------------|
| <b>C DFT-Kalkulationen</b> | <b>249</b> |
| <b>Lebenslauf</b>          | <b>261</b> |

# Abbildungsverzeichnis

|      |   |    |
|------|---|----|
| 1.1  | Die Reorganisation des Spleißosoms . . . . .  | 3  |
| 1.2  | Die Umesterungsreaktion im Spleißosom . . . . .   | 4  |
| 1.3  | Die U5-snRNA und die Exons der prä-mRNA . . . . .   | 5  |
| 1.4  | Der Komplex B* des Spleißosoms . . . . .  | 6  |
| 1.5  | Der Komplex der U2- und U6-snRNA . . . . .  | 9  |
| 1.6  | Modell der Tertiärstruktur des aktivierten Komplex B* . . . . .                               | 10 |
| 1.7  | Modell der Tertiärstruktur des Komplex C des Spleißosoms . . . . .                            | 12 |
| 1.8  | Ein lariatformendes Ribozym . . . . .   | 14 |
| 1.9  | Der Komplex B* vs. das lariatformende Ribozym . . . . .                                       | 15 |
| 3.1  | Das lariatbildende Ribozym . . . . .  | 20 |
| 3.2  | Gelelektrophorese der Mutationen: c23 bis u28 . . . . .                                       | 20 |
| 3.3  | Gelelektrophorese der Mutationen: g1 bis c27 . . . . .  | 21 |
| 3.4  | Die Wasserstoffbrückenbindungen des Ribozyms . . . . .  | 22 |
| 3.5  | Die Mutationen: u28 bis a35 und u42 bis a52 . . . . .   | 23 |
| 3.6  | Gelelektrophorese der Mutationen: u28 und g49 . . . . .                                       | 24 |
| 3.7  | Die $^{13}\text{C}$ -editierten HSQCs: die C1'H1' und C6H6/C8H8 . . . . .                     | 25 |
| 3.8  | Das $^{13}\text{C}$ -editierte NOESY . . . . .  | 26 |
| 3.9  | Das $^{13}\text{C}$ -editierte $^{13}\text{C}$ -gefilterte NOESY: a48 . . . . .               | 28 |
| 3.10 | Das HCCH-COSY-TOCSY: a3 und a48 . . . . .   | 29 |
| 3.11 | Das $^{13}\text{C}$ -editierte $^{13}\text{C}$ -gefilterte NOESY: a48 . . . . .               | 30 |
| 3.12 | Das $^{13}\text{C}$ -editierte HSQC der C5H5-Korrelationen . . . . .                          | 31 |
| 3.13 | Die HCN-Spektren der Ribose und Base: a48 . . . . .   | 33 |
| 3.14 | Das $^{13}\text{C}$ -editierte $^{13}\text{C}$ -gefilterte NOESY der Uracile . . . . .        | 34 |
| 3.15 | Das $^{13}\text{C}$ -editierte $^{12}\text{C}$ -gefilterte NOESY: sequentielle NOEs . . . . . | 34 |
| 3.16 | Das $^{13}\text{C}$ -editierte $^{13}\text{C}$ -gefilterte NOESY: sequentielle NOEs . . . . . | 35 |
| 3.17 | Das Asymmetrische N7 Adenosin-Adenosin-Basenpaar . . . . .                                    | 35 |
| 3.18 | Das $^{13}\text{C}$ -editierte $^{13}\text{C}$ -gefilterte NOESY: H2-Resonanzen . . . . .     | 36 |

|      |  |    |
|------|--|----|
| 3.19 | 2D-NOESY 3D NOESY-TOCSY des $^2H$ -(H3', H4', H5') Ribozyms . . . . .                              | 37 |
| 3.20 | Das HCCH-E.COSY: a48 . . . . .   | 39 |
| 3.21 | Das PH-ct-COSY . . . . .   | 40 |
| 3.22 | Die Karplus-Beziehungen der $^3J_{P,H3'/H5'}$ -Kopplungen . . . . .                                | 41 |
| 3.23 | Das $^{15}N$ -editierte HSQC und HNN-COSY . . . . .  | 42 |
| 3.24 | Die Basenpaarungen im Ribozym . . . . .  | 43 |
| 3.25 | Schematische Darstellung des Lariats . . . . .   | 45 |
| 3.26 | Die $^{13}C$ -editierten HSQCs des Lariats . . . . .   | 46 |
| 4.1  | Strukturmodell des lariatbildenden Ribozyms . . . . .  | 51 |
| 4.2  | Der <i>sugar pucker</i> des <i>branchpoint</i> Adenosins . . . . .                                 | 55 |
| 5.1  | Die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe, Ribose in C2'-endo . . . . .                               | 59 |
| 5.2  | Die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe, Ribose in C3'-endo . . . . .                               | 60 |
| 5.3  | Das Wassernetzwerk in der kleinen Furche der RNA . . . . .   | 61 |
| 5.4  | Das TOCSY und NOESY: Resonanzen der 2'-Hydroxylgruppen . . . . .                                   | 62 |
| 5.5  | Die unterschiedlichen 2'-OH-Konformationen . . . . .   | 63 |
| 5.6  | Das Transkriptions-Schema eines HIV-Gens . . . . .   | 66 |
| 5.7  | Die Sekundärstruktur der TAR-RNA aus HIV-II . . . . .  | 67 |
| 7.1  | Die $^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppen der TAR-RNA . . . . .                                 | 72 |
| 7.2  | Das ct-HSQC Referenzspektrum . . . . .   | 73 |
| 7.3  | Die $^2J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppen mit den C2'-Atomen . . . . .                          | 74 |
| 7.4  | Modellsystem für die Kalkulation der $J_{2'OH}$ -Kopplungen . . . . .                              | 75 |
| 7.5  | Der <i>sugar pucker</i> der Ribose . . . . .   | 76 |
| 7.6  | Die Karplus-Beziehung der $^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplung: unterschiedliche Ba-<br>sissätze . . . . .   | 77 |
| 7.7  | Die Karplus-Beziehungen der $^3J_{2'OH}$ - und $^2J_{2'OH}$ -Kopplungen . . . . .                  | 79 |
| 7.8  | Die Karplus-Beziehung der $^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplung, Ribose in C2'-endo<br>und C3'-endo . . . . . | 81 |
| 7.9  | Das $^{13}C$ -editierte NOESY der 2'-Hydroxylgruppen . . . . .                                     | 83 |
| 7.10 | Kreuzrelaxation im Zweispinsystem mit den Spins I und S . . . . .                                  | 84 |
| 7.11 | NOE-Verhältnisse der 2'-OH- mit H2'-, H3'-, H4'-Atomen . . . . .                                   | 86 |
| 7.12 | NOE-Verhältnisse der 2'-OH- mit H6-, H8-Atomen . . . . .   | 88 |
| 7.13 | Die Spin-Diffusion in der Ribose . . . . .   | 89 |
| 7.14 | Simulation der NOEs der 2'-Hydroxylgruppe . . . . .  | 90 |
| 7.15 | Konformation der 2'-Hydroxylgruppe basierend auf $^3J$ -Kopplungen . . . . .                       | 92 |

|      |   |     |
|------|---|-----|
| 8.1  | Konformation der 2'-Hydroxylgruppe mit approximierten Karplus-<br>Beziehungen . . . . . | 98  |
| 8.2  | Karplus-Beziehungen der ${}^3J_{2'OH,H2'/C1'/C3'}$ : Ribose vs. Glukose . . . .         | 100 |
| 8.3  | Die 2'-Hydroxylgruppe in der Helix-1 der TAR-RNA I . . . . .                            | 101 |
| 8.4  | Die 2'-Hydroxylgruppe in der Helix-1 der TAR-RNA II . . . . .                           | 105 |
| 8.5  | Wassernetzwerk in der kleinen Furche der RNA als Schema . . . . .                       | 106 |
| 8.6  | Wassernetzwerk in der kleinen Furche der RNA als Modell . . . . .                       | 107 |
| 9.1  | <i>Hammerhead</i> -Ribozyme . . . . .   | 114 |
| 9.2  | Sequenz des DNA-Templats für die TAR-RNA aus HIV-II . . . . .                           | 114 |
| 9.3  | Sequenz des DNA-Plasmids für das HH-Ribozym . . . . .                                   | 116 |
| 9.4  | Sequenz des DNA-Plasmids für das lariatbildende Ribozym . . . . .                       | 117 |
| 9.5  | Pulssequenz des NOESY-Experiments . . . . .   | 119 |
| 9.6  | Energieschema eines Zweispinsystems I und S mit $I=1/2$ . . . . .                       | 120 |
| 9.7  | Pulssequenz des ${}^{13}C$ -editierten ${}^{13}C/{}^{12}C$ -gefilterten NOESY . . . . . | 122 |
| 9.8  | Pulssequenz des HCCH-COSY TOCSY . . . . .   | 124 |
| 9.9  | Nomenklatur der Winkel in der RNA . . . . .   | 127 |
| 9.10 | Pulssequenz des HCCH-E. COSY . . . . .  | 128 |
| 9.11 | Aufspaltung der Resonanzen eines HCCH-E. COSY . . . . .                                 | 129 |
| 9.12 | Pulssequenz des PH-ct-COSY . . . . .  | 131 |
| 9.13 | Pulssequenz des HCN der Ribose . . . . .  | 132 |



# Tabellenverzeichnis

|     |   |     |
|-----|---|-----|
| 3.1 | $^3J_{H1',H2'}$ -Kopplungen des <i>branchpoint</i> Adenosin a48 . . . . . | 40  |
| 3.2 | Chemische Verschiebungen von g10 bis c15 . . . . .                        | 44  |
| 5.1 | Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe in $d_6$ -DMSO . . . . .                 | 63  |
| 7.1 | Die $^3J_{2'OH}$ -Kopplungen von Modellmolekülen . . . . .                | 80  |
| 7.2 | Verhältnis der NOE-Integrale $r^6(2'OH, H1')/r^6(2'OH, H2'/H4')$ . . .    | 85  |
| 9.1 | Ansatz für die Transkription der TAR-RNA . . . . .                        | 115 |
| 9.2 | Ansatz für die Transkription des <i>Hammerhead</i> -Ribozyms . . . . .    | 116 |
| 9.3 | Ansatz für die Transkription des lariatformenden Ribozyms . . . . .       | 117 |



# Abkürzungen und Akronyme

|          |  |
|----------|--|
| A        | Adenosin                                 |
| Å        | Ångström                                 |
| ATP      | Adenosin-5'-triphosphat                  |
| C        | Cytosin                                  |
| °C       | Grad Celsius                             |
| CNS      | <i>Crystallography and NMR System</i>    |
| COSY     | <i>Correlation Spectroscopy</i>          |
| ct       | <i>constant time</i>                     |
| CTP      | Cytosin-5'-triphosphat                   |
| $\delta$ | chemische Verschiebung                   |
| D        | Dalton                                   |
| DFT      | Dichtefunktional Theorie                 |
| DMSO     | Dimethylsulfoxid                         |
| DNA      | <i>Desoxyribonucleic Acid</i>            |
| DNS      | Desoxyribonukleinsäure                   |
| DSO      | diamagnetische Spin-Orbit Wechselwirkung |
| DTT      | Dithiotreitol                            |
| E. coli  | <i>Escherichia coli</i>                  |
| EDTA     | Ethylendiamintetraacetat                 |
| FC       | Fermi-Kontakt-Wechselwirkung             |
| FE-BABE  | Eisen(III)-Bromoacetamidobenzyl-EDTA     |
| FPT      | <i>Finite-Perturbation Theory</i>        |
| FRET     | <i>Förster Resonance Energy Transfer</i> |
| g        | Gramm                                    |
| $g$      | Gravitationskonstante                    |
| G        | Guanosin                                 |
| GTP      | Guanosin-5'-triphosphat                  |
| h        | Stunde                                   |

|               |  |
|---------------|--|
| HEPES         | 2-(4-(2- <b>H</b> ydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure                                   |
| HH            | <b>H</b> ammer <b>h</b> ead- <b>R</b> ibozym   |
| HIV           | <b>H</b> uman <b>I</b> mmune <b>D</b> eficiency <b>V</b> irus                                    |
| HSQC          | <b>H</b> eteronuclear <b>S</b> ingle <b>Q</b> uantum <b>C</b> oherence                           |
| Hz            | <b>H</b> ertz  |
| INEPT         | <b>I</b> nsensitive <b>N</b> ucleus <b>E</b> nhanced by <b>P</b> olarization <b>T</b> ransfer    |
| IPP           | Inorganische <b>P</b> hosphatase   |
| ${}^n J_{ab}$ | skalare Kopplung über n Bindungen zwischen den Kernen a und b                                    |
| K             | <b>K</b> elvin   |
| kD            | kilo <b>D</b> alton  |
| LSm           | <i>Like Sm</i>   |
| MD            | <b>M</b> oleküldynamik   |
| MES           | 2-(N-Morpholino)ethansulfonäure  |
| min           | Minute   |
| miRNA         | <b>micro</b> RNA   |
| mL            | Milliliter   |
| MPD           | 2- <b>M</b> ethyl-2,4 <b>p</b> entandiol   |
| mRNA          | <b>m</b> essenger <b>R</b> ibonucleic <b>a</b> cid   |
| mRNS          | <b>m</b> essenger <b>R</b> ibonukleinsäure   |
| ms            | Millisekunden  |
| NMR           | <b>N</b> uclear <b>M</b> agnetic <b>R</b> esonance (nuklearmagnetische Resonanzspektroskopie)    |
| NOE           | <b>N</b> uclear <b>O</b> verhauser <b>E</b> nhancement   |
| NOESY         | <b>N</b> uclear <b>O</b> verhauser <b>E</b> nhancement and <b>E</b> xchange <b>S</b> pectroscopy |
| ns            | Nanosekunden   |
| NS            | <b>N</b> umber of <b>S</b> cans; Anzahl der Aufnahmen pro Inkrement                              |
| NTP           | <b>N</b> ukleosidtriphosphat   |
| PCR           | <b>P</b> olymerase <b>C</b> hain <b>R</b> eaction; Polymerasekettenreaktion                      |
| PEG           | <b>P</b> olyethylenglykol  |
| ppm           | <b>p</b> arts <b>p</b> er <b>m</b> illion  |
| pre-mRNA      | <i>pre-messenger Ribonucleic acid</i>  |
| PSO           | paramagnetische <b>S</b> pin- <b>O</b> rbital Wechselwirkung                                     |
| QSINE         | <b>Q</b> uadratic <b>c</b> osine <b>f</b> unction; quadratische Kosinusfunktion                  |
| RDC           | <b>R</b> esidual <b>D</b> ipolar <b>C</b> ouplings   |
| RNAi          | RNA- <b>I</b> nterferenz   |
| rpm           | <b>r</b> ounds <b>p</b> er <b>m</b> inute  |

|                    |  |
|--------------------|--|
| rRNA               | <i>ribosomal Ribonucleic acid</i>  |
| rRNS               | ribosomale <b>Ribonukleinsäure</b>   |
| s                  | Sekunde  |
| SA                 | <i>Simulated Annealing</i>   |
| SAP                | Spliceosome <b>A</b> ssociated <b>P</b> roteins                                  |
| SCF                | <i>Self consistent Field</i> Theorie   |
| SD                 | Spin-Dipol-Wechselwirkung  |
| SI                 | <b>S</b> ize; prozessierte Punkte  |
| siRNA              | <i>small interfering</i> RNA   |
| Sm                 | Stephanie Smith, Spenderin des Serums,<br>in dem die Sm-Proteine gefunden wurden |
| $S_n2$             | nukleophile Substitutionsreaktion 2. Ordnung                                     |
| snRNA              | <i>small nuclear Ribonucleic acid</i>  |
| snRNP              | <i>small nuclear Ribonucleic Protein</i>   |
| $\tau_m$           | Mischzeit  |
| T7-RNAP            | <b>RNA-P</b> olymerase des <b>T7</b> -Bakteriophagen                             |
| TBE                | <b>T</b> risborat-EDTA   |
| TD                 | <i>Time Domain</i>   |
| TOCSY              | <i>Total Correlation Spectroscopy</i>  |
| TPPI               | <i>Time Proportional Phase Incrementation</i>                                    |
| TRIO               | <i>Transfer Interligand Overhauser Effect</i>                                    |
| TRIS               | <b>Tris</b> (hydroxymethyl)-aminomethan  |
| TROSY              | <i>Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy</i>                              |
| tRNA               | <i>transfer Ribonucleic acid</i>   |
| tRNS               | transfer <b>Ribonukleinsäure</b>   |
| $\mu\text{L}$      | Mikroliter   |
| U                  | <b>U</b> racil   |
| U1, U2, U4, U5, U6 | Uridinreiche spleißomale RNAs  |
| UTP                | <b>U</b> racil-5'-triphosphat  |
| UV                 | Ultraviolette <b>S</b> trahlung  |
| V                  | <b>V</b> olt   |



# Kapitel 1

## Einleitung: mRNA-Prozessierung im Spleißosom

### 1.1 Prozessierung der prä-mRNA

Die prä-*messenger* Ribonukleinsäuren (prä-mRNS, englisch pre-mRNA) werden während und nach der Transkription auf unterschiedliche Weise prozessiert, bevor ihre Information in der Translation in Proteine umgesetzt wird. Es werden Poly-Adenosinketten in einer Größenordnung von fünfzehn bis zweihundertfünfzig Nucleotiden an das 3'-Ende der prä-mRNA gehängt [2]. Das 5'-Ende der prä-mRNA wird am Anfang der Transkription durch einen 7-Methylguanosinrest markiert, das so genannte *Capping* [3]. Ein weiterer essentieller Vorgang ist das Spleißen der prä-mRNA, die daraufhin als reife mRNA vorliegt und zur Translation aus dem Zellkern in das Cytoplasma transportiert werden kann. Beim Spleißen werden kodierende RNA-Sequenzen in der prä-mRNA, die Exons, von nicht kodierenden Sequenzen, den Introns, getrennt und aneinander gefügt [4]. Diese Prozessierung kann auf unterschiedlichem Wege erfolgen:

- von selbstspleißenden Gruppe-I Introns [5]
- von selbstspleißenden Gruppe-II Introns [6]
- im Spleißosom in Eukaryonten [7]
- von Proteinen wie die RNase P und ATP-abhängige Endonukleasen [8]

Selbstspleißende Gruppe-II Introns treten in Prokaryonten auf. Hier werden die Exons intern ligiert und das Intron entfernt. Gruppe-I selbstspleißende Introns befinden sich in *ribosomaler* RNA (rRNA), Chloroplasten und Mitochondrien. Bei die-

ser Gruppe wird für das Spleißen ein externer Kofaktor benötigt. Das Spleißen im Spleißosom findet nur in Eukaryonten statt [9]. Der Mechanismus der Gruppe-II selbstspleißenden Introns und des Spleißosoms sind, so weit bekannt, identisch.

ATP-abhängige Endonukleasen als Proteine spleißen die *transfer* RNA (tRNA) [10]. Rnase P ist ein Enzym, das aus einer Proteinuntereinheit mit 14 kilo Dalton (kD) und einer RNA-Einheit mit circa 370 Nukleotiden (125 kD) besteht. Es wurde lange angenommen, dass die Proteinuntereinheit die enzymatische Aktivität beinhaltet. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass auch hier wie im Spleißosom und bei den Gruppe-I und -II selbstspleißenden Introns die RNA die eigentliche katalytische Einheit des Enzyms darstellt [11].

## 1.2 Das Spleißosom

In Eukaryonten findet der Spleißvorgang in einer molekularen Maschine statt, dem Spleißosom, das aus unterschiedlichen Proteinen und RNAs besteht [12]. Während des Spleißens ist das System einer andauernden Reorganisation dieser Bausteine unterworfen, so dass der Prozess sehr dynamisch, aber dennoch hierarchisch abläuft. Folgende uridinreiche *small nuclear*-RNAs (snRNAs) sind am Spleißosom beteiligt [9, 13, 14]:

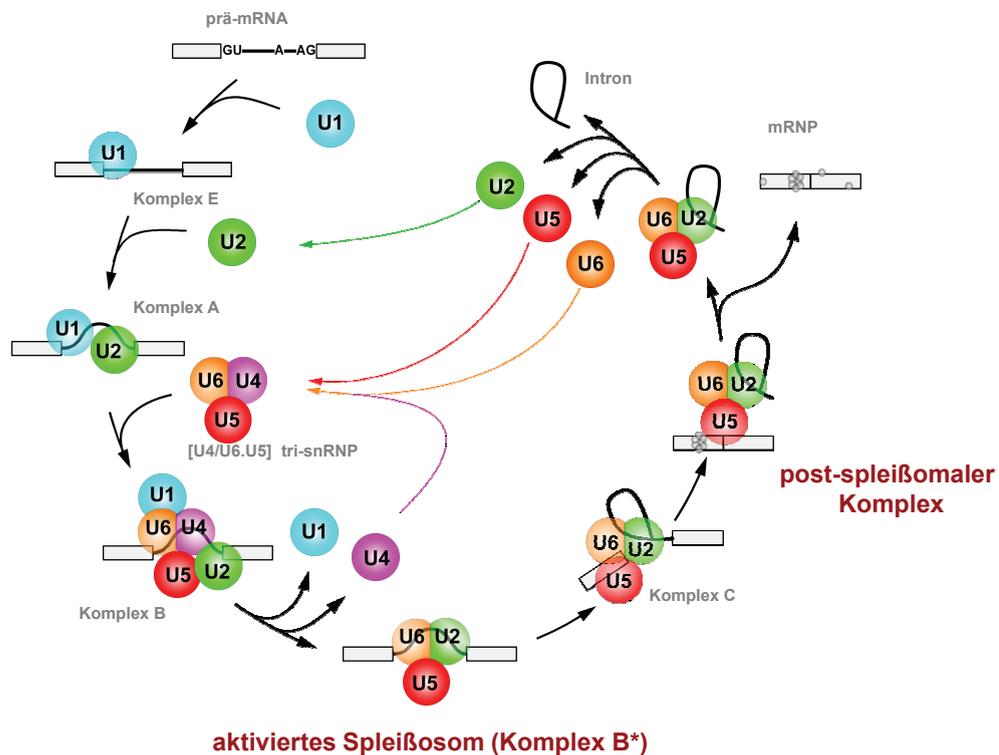
U1-RNA, U2-RNA, U4-RNA, U5-RNA, U6-RNA und die prä-mRNA.

Mehr als dreißig Proteine, die sogenannten *Spliceosome Associated Proteins* (SAPs) sind am Aufbau des Spleißosoms beteiligt, unter anderem das LSm, Sm, 15.5K, 20K, 60K, 61K und 90K [15–17].

Die Proteine nehmen allerdings nicht direkt an der katalytischen Reaktion teil, sondern interagieren in den snRNPs (*small nuclear Ribonucleic Protein*) mit den snRNAs, so dass diese die richtige konformationelle Anordnung einnehmen können, um die Reaktion zu vollführen.

In Abbildung 1.1 ist der voraussichtliche Ablauf der Spleißreaktion durch die snRNAs im Spleißosom dargestellt. Zunächst binden U1- und U2-snRNA an die prä-mRNA und formen den Komplex A [18]. Anschließend tritt der Triplex, bestehend aus den snRNAs U4, U5 und U6 dem spleißomalen Zyklus bei [19] und interagiert ebenfalls mit der prä-mRNA, wobei die U1-snRNA verdrängt wird. Nach weiteren noch nicht bekannten Umlagerungsprozessen verlässt die U4-snRNA wieder den spleißomalen Komplex, so dass die snRNAs U2, U5 und U6 mit der prä-mRNA im aktivierten Komplex, auch Komplex B\* genannt, vorliegen [20]. In der nun fol-

genden Spleißreaktion nimmt die U6-snRNA den Platz der U1-snRNA ein [21]. Nach der Vereinigung der beiden Exons und der Abtrennung des Introns, welches in Form eines Lariats vorliegt, dissoziiert der Komplex C in die einzelnen snRNAs und die prozessierte mRNA [13].

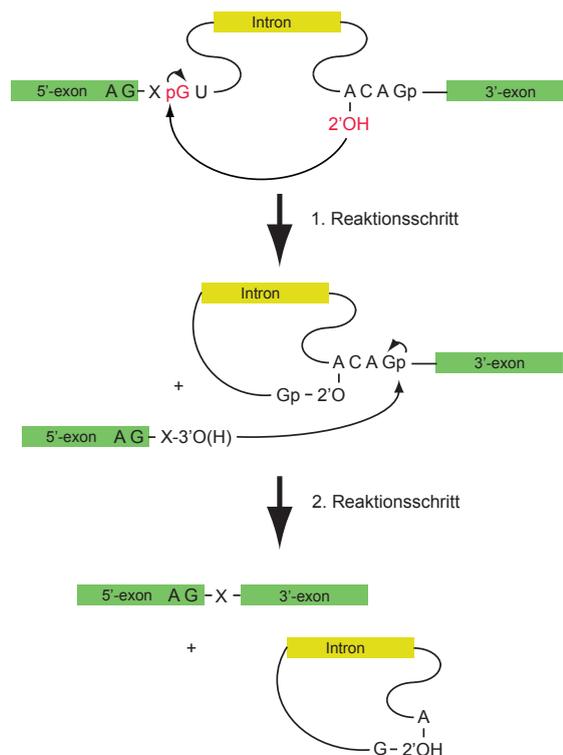


**Abbildung 1.1:** Am Aufbau des Spleißosoms sind mehrere snRNAs und Proteine beteiligt, die sehr dynamisch, aber hierarchisch miteinander interagieren. In dieser Abbildung sind die Wechselwirkungen der snRNAs dargestellt. Am aktivierten Komplex B\*, in dem das Spleißen stattfindet, sind die U2-, U5-, U6- und prä-mRNAs beteiligt (Abbildung von Dr. Berthold Kastner).

### 1.2.1 Die Spleißreaktion

Der Spleißvorgang im Spleißosom findet, wie in Abbildung 1.2 dargestellt, in zwei Schritten statt. Bei beiden Reaktionen handelt es sich um Umesterungen in Form von nukleophilen Substitutionsreaktionen ( $S_N$ ). Im ersten Schritt attackiert die 2'-Hydroxylgruppe des *branchpoint* Adenosins des Introns das Phosphatrückgrat eines Guanosins am 3'-Exon [22]. Dabei bildet sich ein Lariat und das 5'-Exon mit einer freien 3'-Hydroxylgruppe. Diese freie 3'-Hydroxylgruppe attackiert im zweiten

Schritt der Reaktion das Phosphatrückgrat des Guanosins am 3'-Exon, wodurch die beiden Exons miteinander verbunden werden und das Intron als Lariat zurückbleibt [23–26]. Die Exons und Introns stammen bei diesem Vorgang, dem so genannten cis-Spleißen, aus einer prä-mRNA. Die mRNA liegt nun in ihrer reifen Form vor und wird nach dem Transport aus dem Zellkern in das Cytoplasma in der Translation verwendet.

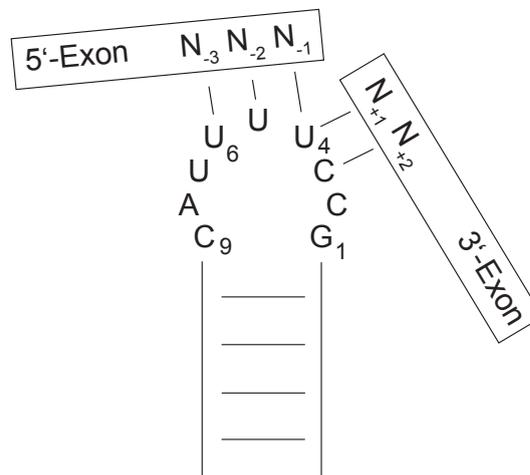


**Abbildung 1.2:** Die Spleißreaktion läuft in zwei Schritten ab. Im ersten Schritt attackiert die 2'-Hydroxylgruppe eines Adenosins das Phosphatrückgrat eines Guanosins am 5'-Exon und bildet in dieser Umesterung ein Lariat. Das 5'-Exon liegt nun mit einer freien 3'-Hydroxylgruppe vor. Im zweiten Schritt attackiert die 3'-Hydroxylgruppe des 5'-Exons das Phosphatrückgrat des 3'-Exons. In dieser Umesterungsreaktion ligieren nun die beiden Exons. Das Intron wird in Form eines Lariats abgespalten.

Die Reaktion findet in derselben Form auch in Gruppe-II selbstspleißenden Introns statt, während bei Gruppe-I selbstspleißenden Introns in Chloroplasten, Mitochondrien und rRNA ein externer Kofaktor die Umesterung einleitet [27–29].

### 1.2.2 Der aktivierte Komplex B\* des Spleißosoms

Am aktivierten Komplex des Spleißosoms sind vier snRNAs beteiligt, U2, U5 und U6 sowie die zu spleißende prä-mRNA [30, 31]. Die U5-snRNA ist essentiell für die Stabilisierung des Spleißosoms, in dem sie mit den beiden Exons der prä-mRNA interagiert. Eine konservierte GCCUUUAC-Schleife der U5-RNA geht dabei sowohl Basenpaarungen mit dem 3'-Exon als auch mit dem 5'-Exon ein. Die Basen c3 und u4 der U5-snRNA interagieren mit dem 3'-Exon und die Basen u4, u5 und u6 der Schleife mit dem 5'-Exon, wie in Abbildung 1.3 dargestellt. Dies wurde durch Basenaustausch-Experimente und UV-*Crosslinking*-Studien gezeigt [32–36].

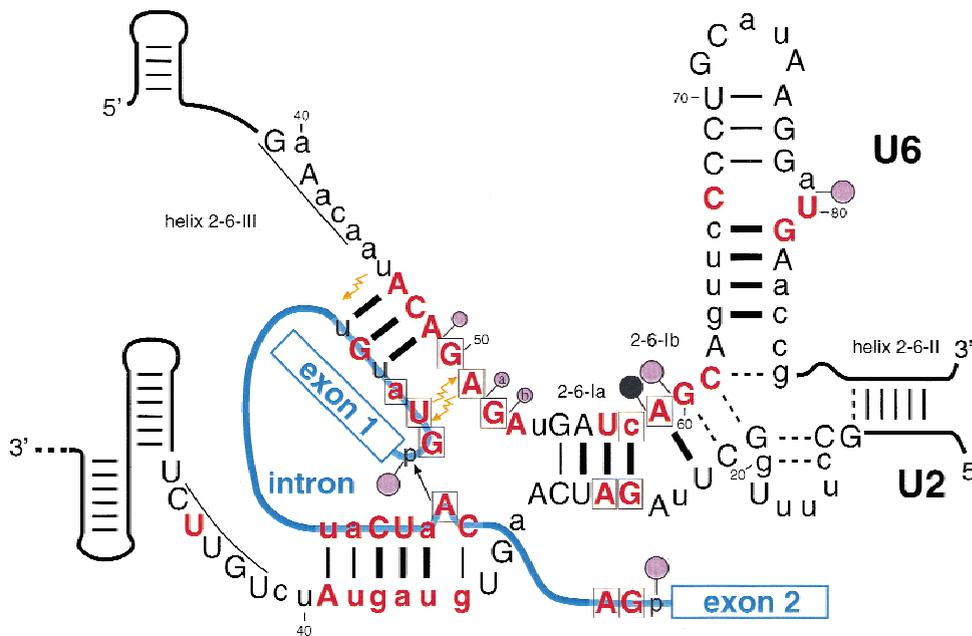


**Abbildung 1.3:** Darstellung der Basenpaarungen der GCCUUUAC-Schleife der U5-snRNA mit den beiden Exons der prä-mRNA.

Durch die Interaktion der U5-Schleife mit den beiden Exons bleiben diese während der Spleißreaktion in räumlicher Nähe und die 3'-Hydroxylgruppe des 5'-Exons wird in die Lage versetzt, im zweiten Schritt der Spleißreaktion das Phosphatrückgrat eines Guanosins des 3'-Exons zu attackieren [36]. Die Wechselwirkungen zwischen den beiden Exons und der U5-Schleife basieren wahrscheinlich nicht ausschließlich auf Watson-Crick-Basenpaaren [37], da die U5-Schleife stark konserviert ist, während die damit interagierenden Basen der Exons relativ variabel sind [34, 36]. Dies würde auch die Häufigkeit von Uridinen in der Schleife der U5-snRNA erklären, sind diese Basen doch in der Lage, sehr vielseitig mit anderen RNA-Basen über Wasserstoffbrücken zu interagieren. Allerdings hätte dies zur Folge, dass die anderen snRNAs im Spleißosom dafür Sorge tragen müssten, dass die U5-Schleife mit den Exons inter-

agiert, indem sie spezifische Wechselwirkungen zum Intron der prä-mRNA eingehen [33].

Während, wie in Abbildung 1.3 dargelegt, die U5-snRNA für die Stabilisierung der Exons wichtig ist, interagieren die U2- und U6-snRNAs mit dem Intron der prä-mRNA im aktivierten Komplex. In Abbildung 1.4 ist ein Modell des aktivierten Komplexes, das aus der prä-mRNA, der U2- und U6-snRNA das katalytische Zentrum bildet, dargestellt. Es existieren Basenpaare zwischen der U2- und der U6-snRNA sowie zwischen dem Intron der prä-mRNA und der U2- als auch der U6-snRNA.



**Abbildung 1.4:** Modell des aktiven Zentrums des Spleißosoms im Komplex B\* bestehend aus der U2-, U6-snRNA und der prä-mRNA [1]. Die Sequenz der U2- und U6-snRNA entspricht den snRNAs aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Phylogenetisch konservierte Nucleotide sind in großen Buchstaben dargestellt, Mutationen an rot dargestellten Nucleotiden beeinträchtigen das Spleißen oder das Wachstum der Zellen, wobei die Nucleotide in einem Quadrat nur den zweiten Schritt der Spleißreaktion verhindern. Die gelben Pfeile weisen auf die räumliche Nähe von Nucleotide, gezeigt durch UV-Crosslinking-Studien, hin. Die violetten beziehungsweise schwarzen Kreise zeigen Stellen, an denen der Austausch des Phosphodiesterückgrates durch Phosphorthioate den ersten beziehungsweise zweiten Schritt der Spleißreaktion verhindern.

Die U2- und die U6-snRNA sind über Basenpaarungen in Helix-1 und Helix-2 miteinander verbunden. Die U2-snRNA bildet noch eine interne Helix, die U2

Helix-1. Die U6-snRNA besitzt ebenfalls einen internen *Intramolecular Stem-Loop*, den U6-ISL. Die U2-snRNA geht mit der prä-mRNA Wechselwirkungen im Bereich des attackierenden *branchpoint* Adenosins ein [38]. Wie in UV-*Crosslinking*-Studien gezeigt, interagiert der konservierte Bereich der U6-snRNA, die ACAGAGA-Box, mit dem 5'-Ende des Introns der prä-mRNA [39–41]. Durch die Basenpaarungen der ACAGAGA-Box wird das attackierte Phosphatrückgrat des Guanidins in räumliche Nähe zur 2'-Hydroxylgruppe des *branchpoint* Adenosins gebracht. Die angreifende 2'-Hydroxylgruppe gehört zu einem Adenosin, das ausgewölbt in der Helix zwischen U2-snRNA und prä-mRNA vorliegt.

Mutationsstudien haben die Basenpaarungen zwischen der U6-snRNA und dem 5'-Ende des Introns bestätigt. Wird das c48 der ACAGAGA-BOX der U6-snRNA gegen ein Adenosin oder Uracil ausgetauscht, so wird das Intron an einer anderen Stelle prozessiert. Wird nun das g5 des Introns gegen ein Uracil oder Adenosin ausgetauscht, findet das Spleißen wieder an der bekannten Spleißstelle statt [42, 43]. Die Interaktionen zwischen der ACAGAGA-Box und dem 5'-Ende des Introns sind also essentiell für die Spleißreaktion. Weiterhin ist bekannt, dass die ACAGAGA-Box eine Bindungsstelle für Magnesiumionen besitzt, welche für die Spleißreaktion benötigt wird. Wird am Phosphatrückgrat des a49 der Diester durch einen Thioester ersetzt und somit durch das Säure-Base-Konzept nach Pearson die Bindung von „harten“ Ionen wie Magnesium beeinträchtigt [44], tritt der erste Schritt der Spleißreaktion nicht mehr auf [45]. Dies gilt unter anderem auch für das Phosphatrückgrat des attackierten Guanosins des Introns.

Neben der ACAGAGA-Box der U6-snRNA ist ein weiterer konservierter Bereich essentiell, die AGC-Triade in der verlängerten Helix-1b zwischen U2- und U6-snRNA. Die AGC-Triade spielt vor allem für den zweiten Teil der Spleißreaktion eine wichtige Rolle. Gruppe-II selbstspleißende Introns weisen nur die AGC-Triade auf, aber keine ACAGAGA-Box.

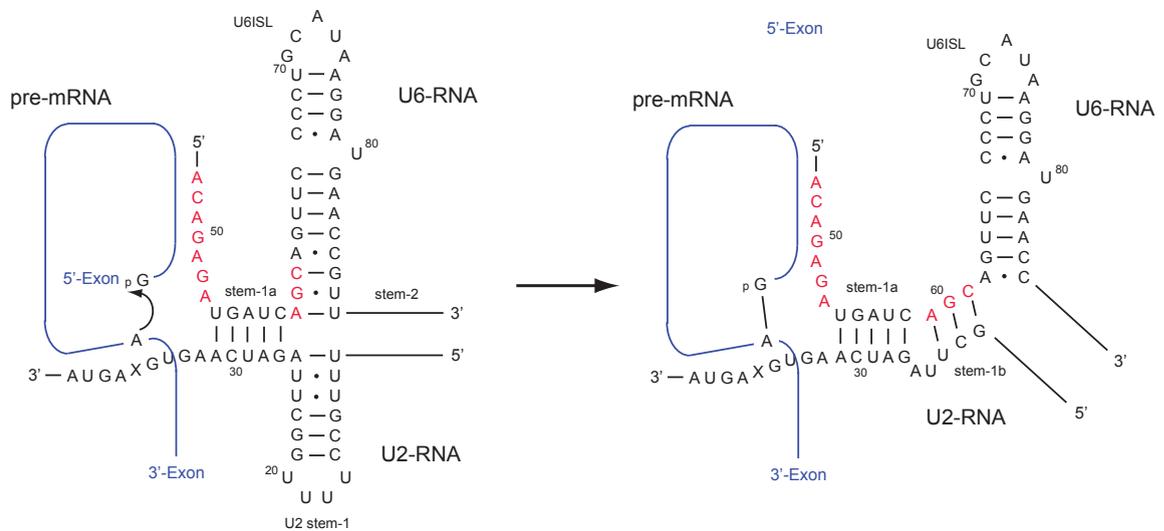
Die U2-RNA geht in der Nähe des attackierenden Adenosins Wechselwirkungen mit dem Intron der prä-mRNA ein. Sie bildet hier eine kurze Helix, aus der das bei der Spleißreaktion attackierende Adenosin herausragt. Query et al. haben 1994 in Experimenten mit chemisch modifizierten Ribosen gezeigt, dass das Herausragen des *branchpoint* Adenosins für den ersten Schritt der Spleißreaktion essentiell ist [46]. Der Komplex zwischen der U2-snRNA und der prä-mRNA wird durch Interaktionen der U2-snRNA mit Proteinen stabilisiert. Studien in Hefezellen zeigten, dass die Wechselwirkungen mit den Proteinen Prp5, Prp9, Prp11 und Prp21 die Struktur

der U2-snRNA in Hefezellen beeinflussen [47]. Diese Proteine binden vor allem an die Helix-1 der U2-snRNA [16, 48].

Um das katalytische Zentrum des Spleißosoms zu definieren, sind einige Interaktionen zwischen der U2- und U6-snRNA nötig. Bei der Formation des aktivierten Komplexes übernimmt die U2-snRNA U6-snRNA Bindungsstellen, an die zuvor die U4-snRNA gebunden war. Die U4-snRNA verlässt den Komplex. Die dabei gebildete Helix-1a besitzt ähnliche Basenpaarungen zwischen der U2- und U6-snRNA, wie zuvor die U4- mit der U6-snRNA [49]. Die Sequenzen der beiden RNAs in der Helix-1a sind deshalb auch phylogenetisch konserviert [50]. Die U2- und U6-snRNA gehen auch in einem weiteren Bereich, der als Helix-1b bezeichnet wird, Basenpaarungen ein. In dieser Helix findet sich in der U6-snRNA die AGC-Triade, eine konservierte Region, die für den zweiten Schritt der Spleißreaktion wichtig ist. Die Basenpaarung des Adenosins a59 der AGC-Triade mit dem Uracil u23 des UCG-Abschnitts der U2-snRNA wurde durch Basenaustausch-Experimente bestätigt [49, 50]. Sashital et al. haben 2004 allerdings einen anderen strukturellen Vorschlag publiziert, in dem die Helix-1b erst nach dem ersten Schritt der Spleißreaktion geformt wird und zuvor in einer anderen Konformation vorliegt [51]. Dies ist in Abbildung 1.5 dargestellt.

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie wurden RNA-Konstrukte mit einer Länge von 73 bis 110 Nukleotiden untersucht [51], die aus Teilen des aktiven Zentrums der U2- und U6-snRNA bestanden. Die untersuchten RNAs beinhalten damit sowohl die ACAGAGA-Box als auch die AGC-Triade. Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen basierten dabei vor allem auf 2D-NOESY (**N**uclear **O**verhauser **E**nhancement and **E**xchange **S**pectroscopy) und HNN-COSY (**C**orrelation **S**pectroscopy) Spektren, um eine Vorstellung über die Basenpaarungen und die Sekundärstruktur zu erhalten [52, 53].

In dieser proteinfreien Umgebung bilden die unterschiedlichen U2- und U6-snRNAs aus Hefezellen eine *four-way helical junction*. Zunächst liegt eine verlängerte Helix U6-ISL vor, die die Ausbildung der Helix-1b zwischen U2- und U6-RNA verhindert. Die AGC-Triade ist nun Teil der Helix U6-ISL und geht dabei mit dem g60 eine GU-Basenpaarung ein. Die sonst an der Helix-1b beteiligte Sequenz der U2-snRNA geht Basenpaarungen in der verlängerten Helix-1 der U2-snRNA ein. Die beiden dabei auftretenden UU-Basenpaarungen sind über ihre Kreuzsignale im 2D NOESY sichtbar. Ohne Proteine liegt der Komplex demnach aus der U2- und U6-snRNA mit einer verlängerten Helix U6-ISL und Helix-1 der U2-snRNA vor. Die Helix-1b zwischen der U2- und U6-snRNA, die wichtig für den zweiten Schritt der Spleißreaktion ist,



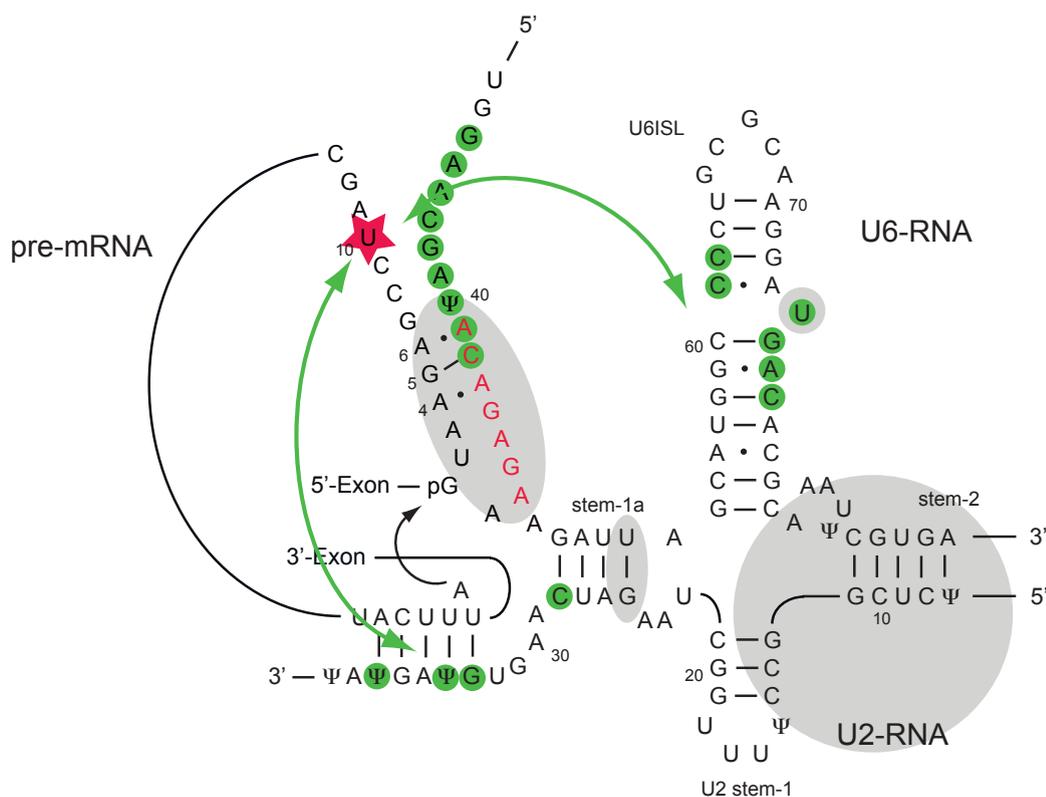
**Abbildung 1.5:** Aufgrund von NMR-spektroskopischen Untersuchungen an einem Komplex von U2- und U6-snRNA aus Hefezellen schlagen Sashital et al. 2004 ein Modell des aktiven Komplexes des Spleißosoms vor, in dem es nach der ersten Umesterung zu einer konformationellen Änderung kommt. Dabei wird die Helix-1b gebildet, die für die zweite Umesterungsreaktion essentiell ist [51].

ist nicht sichtbar. Gruppe-II selbstspleißende Introns besitzen in der Domäne 5 eine Helix, die eine sehr ähnliche Länge zur U6-ISL-Helix nach Sashital et al. hat [51]. Beide Helices weisen eine Auswölbung auf, die in beiden Konstrukten als Magnesiumbindungsstelle fungiert und den ersten Schritt der Spleißreaktion unterstützt. In den selbstspleißenden Introns ist diese Helix essentiell für den Spleißvorgang.

Wird die *four-way helical junction* der U2- und U6-snRNA mit der *four-way helical junction* des *Hairpin* (HH)-Ribozyms überlagert [54], fällt auf, dass sich die Auswölbung des u80, die Magnesiumbindungsstelle, in räumlicher Nähe zur ACAGAGA-Box der U6-snRNA und damit dem 3'-Ende des Introns der prä-mRNA befindet. Somit kann die Auswölbung des U6-ISL den ersten Schritt der Spleißreaktion im Spleißosom beeinflussen. Sashital et al. schlagen deshalb einen Mechanismus vor, nach dem im ersten Schritt der Spleißreaktion die AGC-Triade Teil der U6-ISL Helix ist, diese verlängert und mit ihrer Magnesiumbindungsstelle den ersten Schritt der Reaktion unterstützt. Anschließend kommt es zu einer konformationellen Änderung im aktivierten Komplex und zwischen der U2- und U6-snRNA bildet sich die Helix-1b mit der AGC-Triade. Daraufhin kann der zweite Teil der Spleißreaktion stattfinden. Dieses Modell wird auch durch Mutationsstudien unterstützt [55–57].

### 1.2.3 Die Tertiärstruktur des aktivierten Komplex B\* und Komplex C

Während über Mutations- und UV-*Crosslinking*-Studien Sekundärstrukturen untersucht werden können, werden für Untersuchungen der Tertiärstruktur andere Methoden benötigt. Neben der Strukturaufklärung durch **nuklearmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)** und Röntgenkristallographie können auch Fluoreszenzmethoden und ortsspezifische Hydroxylradikaluntersuchungen verwendet werden.



**Abbildung 1.6:** Im aktivierten Komplex B\* des Spleißosoms ist das u10 der prä-mRNA (rot) den Nucleotiden c62, c63 und u74 bis c77 des U6-ISL (grün) und den Nucleotiden  $\Psi$ 34, a35 und  $\Psi$ 37 (grün) der U2-snRNA zugewandt, wie anhand von Hydroxylradikalstudien mit *Fe-BABE* gezeigt werden konnte [58]. In den grau hinterlegten Bereichen der snRNAs beziehungsweise prä-mRNA befinden sich Magnesiumbindungsstellen, wie mit Hilfe von FRET-Analysen gezeigt werden konnte [63].

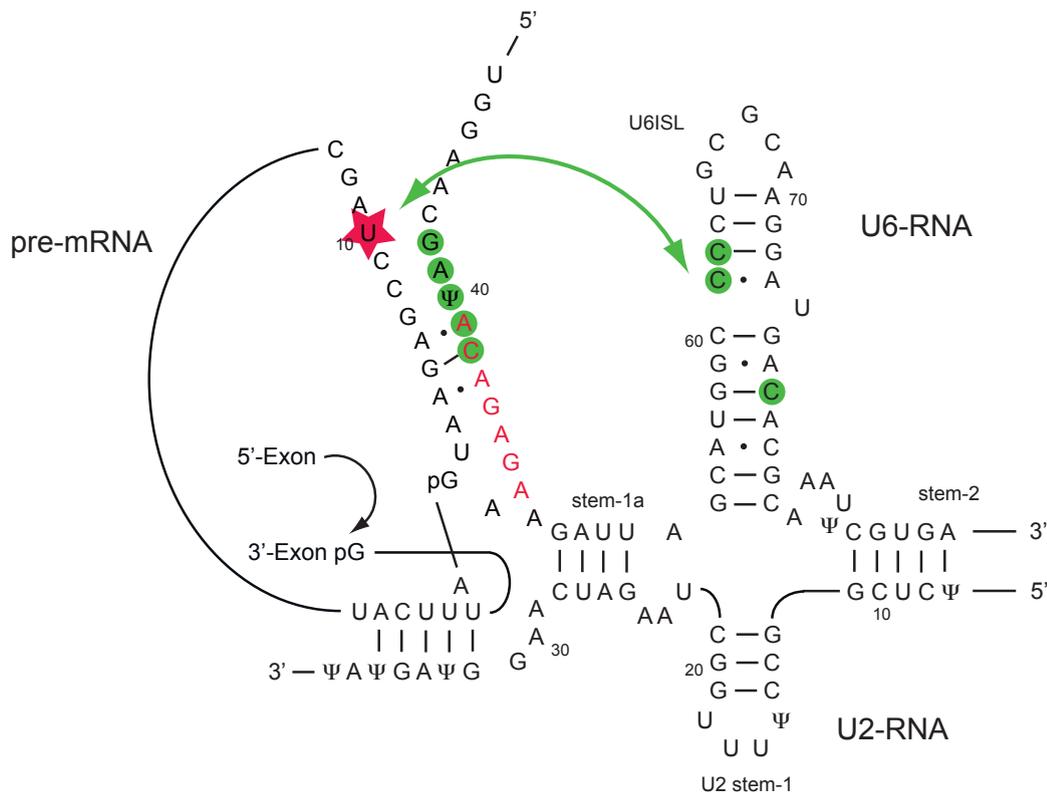
Mit Hilfe des *site-directed hydroxyl-radical probing* untersuchten Rhode et al. 2006 einen isolierten Komplex B\* und Komplex C des menschlichen Spleißosoms, das aus den U2-, U5-, U6-snRNAs und prä-mRNA sowie den snRNPs besteht. Dabei

konnte die Interaktion zwischen der U6- und der prä-mRNA, sowie der U2- und der U6-snRNA nachgewiesen werden [58].

Das Uracil u10 der prä-mRNA in Abbildung 1.6 wurde durch ein *Fe-BABE* (Eisen(III)-**B**romoacetamidobenzyl-**E**DTA) modifiziert [59]. Die Position in der prä-mRNA bietet sich an, da sie in der Nähe der Nukleotide 4-6 der prä-mRNA liegt, die Basenpaarungen mit der ACAGAGA-Box der U6-RNA eingehen [42]. Weiterhin zeigten UV-*Crosslinking*-Studien, dass auch die benachbarten Nukleotide 7-9 der prä-mRNA an Basenpaarungen mit der U6-snRNA beteiligt sein könnten [41, 42, 60]. Wie in Abbildung 1.6 gezeigt, sind die entstehenden Radikale des *Fe-BABE* in der Lage, vor dem ersten Schritt der Spleißreaktion die Nukleotide c62, c63 und u74 bis c77 des U6-ISL anzugreifen und die RNA hier zu spalten. Dies bedeutet, dass diese Nukleotide des U6-ISL in räumlicher Nähe in Richtung des u10 der prä-mRNA zeigen und nicht durch Proteine geschützt sind. Dieses Ergebnis ist deshalb interessant, weil u74 beim menschlichen Spleißosom dem u80 des U6-ISL im Hefespleißosom entspricht, dessen Magnesiumbindungsstelle essentiell für den ersten Schritt der Spleißreaktion ist [45]. Jedoch ist bisher nicht bekannt, ob das Magnesium, das u80 bindet, eine strukturelle oder katalytische Funktion besitzt. Es ist fragwürdig, ob das u74 des U6-ISL, das nahe dem u10 der prä-mRNA liegt, auch gleichzeitig in katalytischer Reichweite der ersten Spleißstelle, dem g1 der prä-mRNA, liegen kann [61, 62].

Die Radikale greifen neben Stellen in der U6-ISL auch die Nukleotide  $\Psi$ 34, a35 und  $\Psi$ 37 der U2-snRNA an. Auch sie zeigen demnach in die Richtung des u10 der prä-mRNA. Das *Fe-BABE* des u10 der prä-mRNA kann nur gleichzeitig mit den Nukleotiden c62, c63 und u74 bis c77 des U6-ISL und  $\Psi$ 34, a35 und  $\Psi$ 37 der U2-snRNA interagieren, wenn das *branchpoint* Adenosin zwischen ihnen liegt. Damit muss das *branchpoint* Adenosin auf der entgegengesetzten Seite liegen. Dies schließt auch aus, dass das von u74 gebundene Magnesium katalytisch aktiv ist, weil es nicht gleichzeitig nahe dem g1 und dem *branchpoint* Adenosin der prä-mRNA liegen kann [58].

Yuan et al. haben 2007 in einem spleißomalen Modellsystem der Hefe mit FRET (**F**örster **R**esonance **E**nergy **T**ransfer) gezeigt, dass neben dem u74 (u80 im menschlichen Spleißosom) eine weitere Magnesiumbindungsstelle im Bereich der ACAGAGA-Box, dem UG-Basenpaar in der Helix-1a und in der Helix-2 des Komplex B\* existiert. Dies ist ebenfalls in Abbildung 1.6 wiedergegeben. Diese Magnesiumionen könnten für die Spleißreaktion katalytisch wichtig sein [63].



**Abbildung 1.7:** Modell des spleißomalen Komplex C bestehend aus U2-, U6-snRNA und prä-mRNA. Das *Fe-BABE* modifizierte u10 der prä-mRNA ist mit einem roten Stern markiert. Innerhalb des U6-ISL kommt es bei den Nukleotiden c61, c62 und c77 durch die Radikale des *Fe-BABE* zur Spaltung der RNA, was auf die räumliche Nähe zu dem u10 der prä-mRNA hinweist [58].

Weiterhin konnte mit dem *Fe-BABE* am u10 der prä-mRNA gezeigt werden, dass nach dem ersten Schritt der Spleißreaktion im Komplex C die Nukleotide c62, c63 und c77 des U6-ISL immer noch für die Hydroxylierung zugänglich sind, wie in Abbildung 1.7 dargestellt. Dies trifft für die Nukleotide u74 bis a76 des U6-ISL allerdings nicht zu. Demnach hat eine konformationelle Änderung nach der ersten Umesterungsreaktion stattgefunden [64] oder die Nukleotide u74 bis a76 sind nun durch snRNPs abgeschirmt, die mit dem U6-ISL interagieren [65, 66].

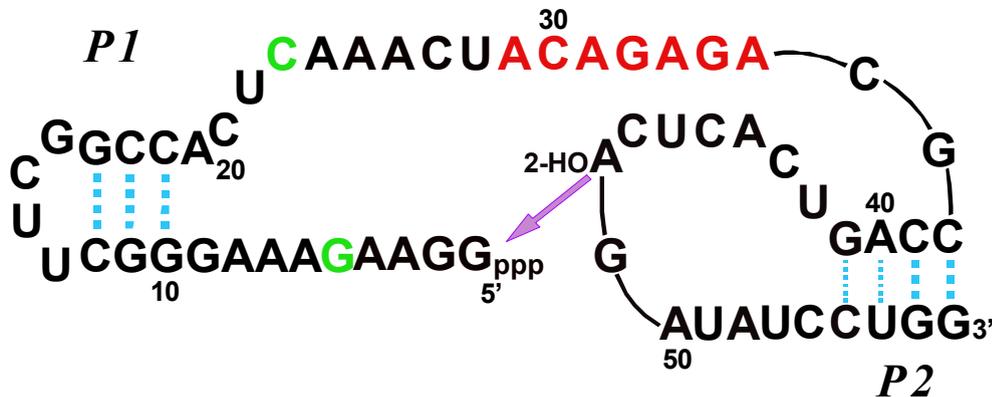
Die U2-RNA wird nach dem ersten Schritt der Spleißreaktion, wie in Abbildung 1.7 ersichtlich, nicht mehr durch das *Fe-BABE* des u10 der prä-mRNA beeinflusst [58].

### 1.3 Ein lariatbildendes Ribozym

Tuschl et al. haben 2001 ein Ribozym mit Hilfe der *in vitro* Selektion aus  $2 * 10^{14}$  Sequenzen gefunden [1, 67], dessen Muttersequenz auf den Nukleotiden 30-47 der U6-RNA beim Menschen basiert und damit auch die konservierte ACAGAGA-Box beinhaltet. Die Ribozyme hatten zunächst eine Länge von ca. 120 Nukleotiden. Es konnten dabei zwei Klassen von lariatbildenden Ribozymen gefunden werden. Die eine Klasse beinhaltete die für das Spleißen wichtige ACAGAGA-Box und wurde genauer untersucht. Dabei konnte ein aus 58 Nukleotiden bestehendes Ribozym selektiert werden, welches analog zum ersten Schritt der Spleißreaktion ein Lariat bildet. Damit ist es wesentlich kleiner als alle selbstspleißenden Introns der Gruppe II mit ca. 500 Nukleotiden [68]. Das Ribozym wandelt sich mit einer Reaktionsrate von  $0,12 \text{ min}^{-1}$  in das Lariat um und ist in Abbildung 1.8 dargestellt.

Es beinhaltet die bereits erwähnte ACAGAGA-Box. Mutationen in der ACAGAGA-Box führen zu einer geringeren Reaktionsrate. Besonders Mutationen an den Positionen a29, g32 und a33 verringern die Reaktion um das 400-fache. Im Spleißosom geht der ACA-Bereich dieser Sequenz Basenpaarungen mit den Nukleotiden 4, 5 und 6 des Introns ein und bringt damit das 5'-Phosphat des g1 in räumliche Nähe zur attackierenden 2'-Hydroxylgruppe des *branchpoint* Adenosins [42, 43]. Das hier untersuchte Ribozym scheint keine kanonischen Basenpaarungen mit den Nukleotiden in der Nähe des g1 einzugehen. Nicht kanonische Basenpaarungen können allerdings nicht ausgeschlossen werden. Der AGAGA-Bereich der ACAGAGA-Box geht im Spleißosom keine Basenpaarungen mit dem Intron der prä-mRNA ein. Inwiefern in diesem Bereich des lariatformenden Ribozyms Basenpaarungen vorliegen, ist unbekannt. Daher ist es für diesen Bereich nicht möglich, Sekundärstrukturelemente vorauszusagen.

Mutationen in anderen Bereichen des Ribozyms führen laut Tuschl und Mitarbeitern nur bei dem Austausch der Nukleotide g34 und a35 zu Cytosinen zu einer vergleichbar verringerten Aktivität. Die attackierende 2'-Hydroxylgruppe gehört wie in der prä-mRNA zu einem Adenosin und attackiert auch in einer Umesterungsreaktion das 5'-Phosphat eines Guanosins. Mutationen am *branchpoint* Adenosin a48 sowie am angreifenden g1 verhindern die Lariatbildung. Dies zeigt, dass das Ribozym spezifisch für das Adenosin am *branchpoint* sowie für ein Guanosin am 5'-Terminus ist. In Introns von prä-mRNAs werden hingegen Mutationen des attackierten Guanosins durch Adenosin toleriert [69]. Die Abgangsgruppe bei der Lariatbildung ist bei diesem Ribozym kein 5'-Exon mit einer freien 3'-Hydroxylgruppe, sondern ein

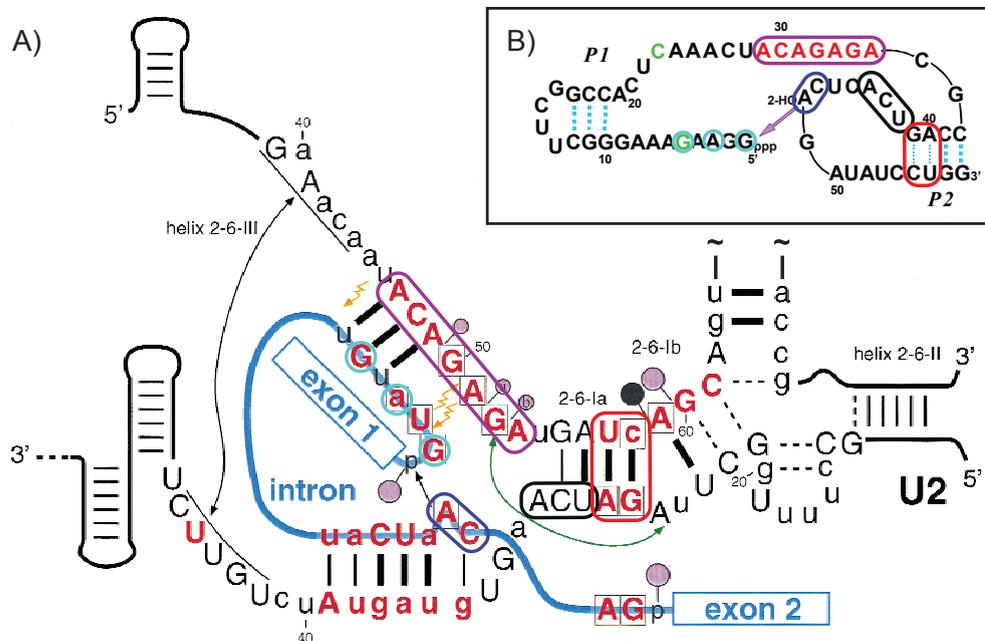


**Abbildung 1.8:** Darstellung des lariatbildenden Ribozyms. Es besteht aus 58 Nukleotiden und besitzt wie die U6-snRNA ebenfalls die ACAGAGA-Box, dargestellt in rot. Die beiden in grün abgebildeten Nukleotide g5 und c23 sind kovariant [1].

Diphosphat. Auch Gruppe-II Introns können eine Umesterungsreaktion mit einem Diphosphat als Abgangsgruppe katalysieren [70].

Austauschexperimente von Diestern gegen Thioester haben beim Spleißosom gezeigt, dass sich in der ACAGAGA-Box Magnesiumbindungsstellen befinden, die für den ersten Schritt der Spleißreaktion wichtig sind [63]. Die ACAGAGA-Box bei dem hier untersuchten Ribozym weist keine wichtigen Bindungsstellen für Magnesiumionen im Bereich dieser konservierten Sequenz auf. Der Austausch von Sauerstoff gegen Schwefel führt zu keiner Beeinträchtigung der Lariatbildung. Allerdings gibt es außerhalb dieser Sequenz einige Positionen, in denen Thioester die Lariatbildung beeinträchtigen, unter anderem bei g1 bis a3, a7 bis g9, c21, u22, a24, a25 und c47 bis g49. Wird das terminale Triphosphat gegen ein Thiotriphosphat ausgetauscht, reduziert dies die Lariatbildung um das 600-fache. Der Austausch der Sauerstoffatome gegen Schwefel sollte nach dem Säure-Base-Konzept nach Pearson nur eine 60-fach niedrigere Aktivität bewirken [71, 72]. Die Helix-1 des Ribozyms wird durch einen UUCG-Tetraloop geschlossen [73, 74].

In Abbildung 1.9 sind die strukturellen Analogien und Unterschiede zwischen dem lariatbildenden Ribozym und dem spleißomalen Komplex B\* noch einmal wiedergegeben. Sowohl im Ribozym als auch im Komplex B\* wird die Umesterungsreaktion durch eine 2'-Hydroxylgruppe eines Adenosins eingeleitet und in beiden Fällen liegt dieses Adenosin in direkter Nachbarschaft eines Cytosins. Auch das attackierte Phosphatrückgrat gehört in beiden Fällen zu einem Guanotin, das in Richtung des 5'-Endes in Position i+2 vom attackierten Guanotin ein Adenosin und in Position



**Abbildung 1.9:** Das lariatbildende Ribozym (B) weist einige Gemeinsamkeiten mit dem aktivierten Komplex B\* (A) des Spleißosoms auf. In beiden katalytischen Systemen wird die Umesterungsreaktion durch eine 2'-Hydroxylgruppe eines Adenosins eingeleitet, die das Phosphatrückgrat eines Guanosins attackiert. Sowohl das Ribozym als auch die U6-snrRNA des Komplexes B\* besitzen eine Sequenz, die ACAGAGA-Box, die im Komplex B\* mit Teilen des Introns interagiert und räumlich dazu auch im Ribozym in der Lage wäre [1].

i+4 ein Guanosin aufweist. Das Ribozym besitzt ebenfalls wie die U6-snrRNA des aktivierten Komplexes B\* die ACAGAGA-Box und wird im Bereich der Helix P2 von kanonischen Basenpaarungen, ähnlich den Interaktionen zwischen der U2- und U6-snrRNA geschlossen. Im Anschluss an diese Basenpaare besitzt die U2-snrRNA eine ACU-Sequenz, die auch im Ribozym wieder zu finden ist.

Auf Grund dieser strukturellen Analogien ist es möglich, dass ein strukturelles Verständnis des Ribozyms vor und nach der Lariatbildung den Spleißprozess im Komplex B\* des Spleißosoms besser verstehen lässt. Erstmals kann mit dem Ribozym die strukturelle Bedeutung der ACAGAGA-Box für die Spleißreaktion untersucht werden. Für strukturelle Untersuchungen ist das lariatformende Ribozym in seinen zwei vorliegenden Formen deswegen wegweisend:

- 1) in seiner linearen Form vor dem Angriff der 2'-Hydroxylgruppe des a48,
- 2) in der Lariatform nach dem Angriff der 2'-Hydroxylgruppe des a48.

Das lariatbildende Ribozym kann strukturell mit Hilfe der NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallographie charakterisiert werden.

# Kapitel 2

## Zielsetzung

Das lariatbildende Ribozym, das 2001 von Tuschl entwickelt wurde [1], kann durch seine strukturellen Gemeinsamkeiten zum Spleißosom in Eukaryoten als ein Modellsystem dienen, um den Komplex B\* und Komplex C dieser molekularen Maschine besser zu verstehen. Genau wie die prä-mRNA im Spleißosom geht es eine Reaktion in Form einer Umesterung ein und liegt dann als Lariat vor. Die lineare Form des Ribozyms kann mit dem Komplex B\* verglichen werden, während das Lariat analog dem Komplex C des Spleißosoms verstanden werden kann. In dieser Arbeit sollen die folgenden Schritte zur Untersuchung des Ribozyms vorgenommen werden.

1) Die Sekundärstruktur des Ribozyms ist bislang unbekannt. Über Mutationsexperimente am linearen Ribozym und NMR-spektroskopische Untersuchungen soll diese zunächst ermittelt werden.

2) In der NMR-Spektroskopie müssen zur Strukturaufklärung zunächst die einzelnen Resonanzen der Atomkerne zugeordnet werden. Zu diesem Zweck ist es nötig, unterschiedliche NMR-Experimente auszuwerten, über die die Zuordnung der linearen Form des lariatbildenden Ribozyms erfolgen kann. Dies stellt für diese RNA mit 59 Nukleotiden (20 kD) und unbekanntem Strukturmotiv eine Herausforderung dar.

3) Mit Hilfe von strukturellen Parametern, die in NMR-Experimenten ermittelt werden sollen, wie Atomabständen aus NOEs, Winkelinformationen aus  $J$ -Kopplungen, Wasserstoffbrückenbindungen und globuläre Informationen aus RDCs (**R**esidual **D**ipolar **C**ouplings) kann die Struktur des linearen Ribozyms ermittelt

werden.

4) Neben der NMR-Spektroskopie spielt die Röntgenkristallographie eine wichtige Rolle in der Strukturaufklärung. Da die Kombination dieser Methoden bereits für viele Strukturen erfolgreich war und aufgrund der unbekanntem Struktur motive des Ribozym s jede Strukturinformation von Bedeutung ist, werden Kristallisationsversuche unternommen, um die Struktur der linearen Form über die Röntgenbeugung zu lösen.

5) Um die strukturellen Unterschiede zwischen der linearen Form und dem Lariat des Ribozym s zu erhellen, soll ebenfalls das Lariat mit Hilfe der NMR-Spektroskopie betrachtet werden.

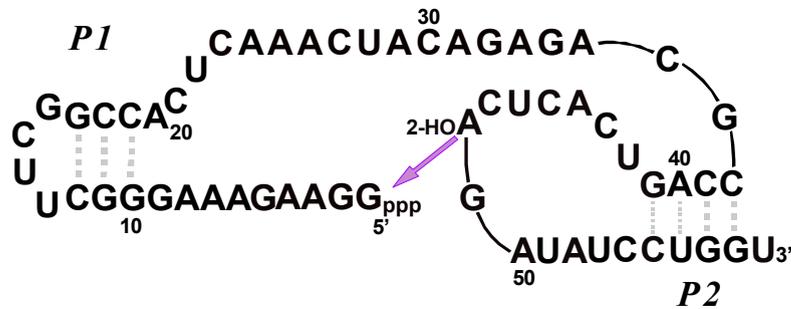
# Kapitel 3

## Ergebnisse: Das lariatbildende Ribozym

### 3.1 Mutationsstudien: Die lineare Form des lariatbildenden Ribozyms

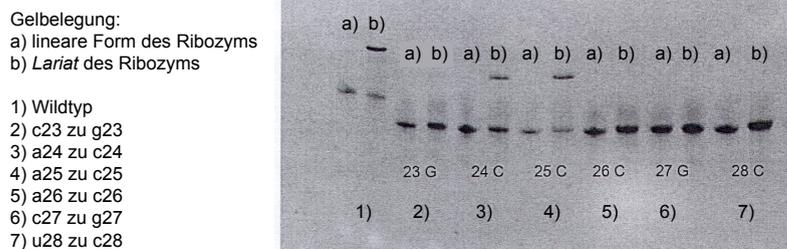
Die Sekundärstrukturen von RNAs werden maßgeblich durch Basenpaarungen beeinflusst, die zur Ausbildung von Helices oder aber zu Einzelstrangbereichen, Auswölbungen, Schleifen und Haarnadelschlaufen führen [75]. Die Basenpaarung kann mit Hilfe NMR-spektroskopischer Untersuchungen wie HNN-COSY (**C**orrelation **S**pectroscopy) [53] oder Imino- und Amino-NOESY Experimenten [76, 77] verifiziert werden. Auch Basenaustauschexperimente können die Basenpaarung bestätigen. Eine Kovarianz von mehreren Nukleotiden, die voneinander entfernt in der Primärstruktur der RNA liegen, impliziert schließlich eine Wechselwirkung dieser Nukleotide über eine Basenpaarung. Um die Basenpaarungen der einzelnen Nukleotide in der linearen Form des lariatbildenden Ribozyms, dargestellt in Abbildung 3.1, zu untersuchen, wurden deshalb eine Reihe von Mutationsstudien vorgenommen. Diese basieren auf Ergebnissen der NMR-Spektren, die in Kapitel 3.2 präsentiert sind. Die Mutationsexperimente wurden von Claudia Schwiegk durchgeführt.

Wird die Lariatbildung des Ribozyms durch einen Basenaustausch verhindert, kann davon ausgegangen werden, dass der Austausch eine wichtige Basenpaarung zerstört oder aber zu neuen Basenpaarungen führt, die die Lariatbildung erschweren. Dafür wird, wie in Kapitel 9 eingehender besprochen wird, die RNA durch *in vitro* Transkription hergestellt und dann auf einem 15% SDS-PAGE-Gel gereinigt. Nach der Elution der RNA aus dem Gel wird die lineare Form des Ribozyms mit 30 mM



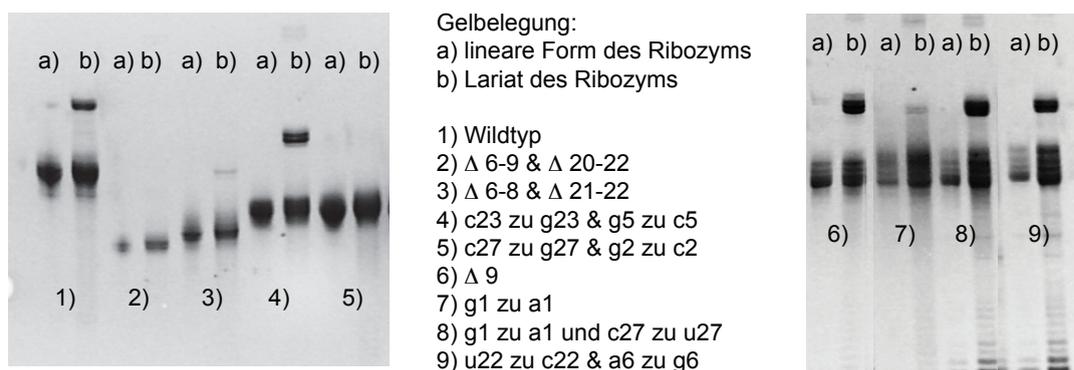
**Abbildung 3.1:** Darstellung der linearen Form des lariatbildenden Ribozyms bestehend aus 59 Nukleotiden. Die eingezeichneten Basenpaarungen wurden von Thomas Tuschl et al. 2001 vorgeschlagen [1].

Tris (pH=7,6), 100 mM Kaliumchlorid und 25 mM Magnesiumchlorid in das Lariat überführt. Die Lariatbildung wird dabei durch das Magnesiumchlorid eingeleitet. Mit dem Wildtyp des Ribozyms als Positivkontrolle und den jeweiligen linearen Edukten wird die Lariatbildung mit der Gelelektrophorese, wie in Abbildung 3.2 dargestellt, überprüft. Es ist ersichtlich, dass der Austausch des Cytosins c23 gegen Guanosin g23, des Adenosins a26 gegen Cytosin c26, des Cytosins c27 gegen Guanosin g27 sowie des Uracils u28 gegen Cytosin c28 die Lariatbildung verhindert. Daraus folgt, dass diese drei Nukleotide wichtige strukturelle Interaktionen eingehen, die durch den Basenaustausch beeinflusst werden und damit die Umesterungsreaktion zum Lariat beeinträchtigen.



**Abbildung 3.2:** Die Nukleotide c23 bis u28 wurden jeweils gegen ein anderes Nukleotid ausgetauscht und die Lariatbildung überprüft. In a) ist jeweils die lineare Form und in b) das Lariat des Ribozyms aus a) dargestellt. Der Basenaustausch des c23 (2), a26 (5), c27 (6) und u28 (7) verhindert, wie im Gel ersichtlich, die Lariatbildung. Diese Nukleotide gehen also Interaktionen mit anderen Basen ein, die strukturell für die Umesterung essentiell sind.

Um zu überprüfen, mit welchen Nukleotiden diese Wechselwirkungen stattfinden, wurden im nachfolgenden Experiment die Nukleotide im Bereich von g1 bis g10 so ausgetauscht, dass eine Basenpaarung wieder ermöglicht wird. Existiert eine Watson-Crick-Basenpaarung zwischen g9 und c23, müsste der Austausch von g9 gegen c9 die Basenpaarung verhindern, während ein simultaner Austausch von g9 gegen c9 und c23 gegen g23 eine Basenpaarung wieder ermöglicht. Die Ergebnisse dieser Mutationen sind in Abbildung 3.3 dargestellt.



**Abbildung 3.3:** Die Nukleotidbereiche  $\Delta$ 6-9 und  $\Delta$ 20-22 (2) beziehungsweise  $\Delta$ 6-8 und  $\Delta$ 20-21 (3) wurden aus der RNA-Sequenz entfernt. Ohne diese Nukleotide ist keine Lariatbildung mehr zu beobachten. Die genannten Nukleotide sind also strukturell wichtig für die Umesterungsreaktion. Das Guanosin g9 (6) hingegen ist nicht wichtig für die Lariatbildung, da es aus der Sequenz entfernt werden kann, ohne die Umesterungsreaktion zu beeinflussen. Es befindet sich wahrscheinlich in einer Auswölbung.

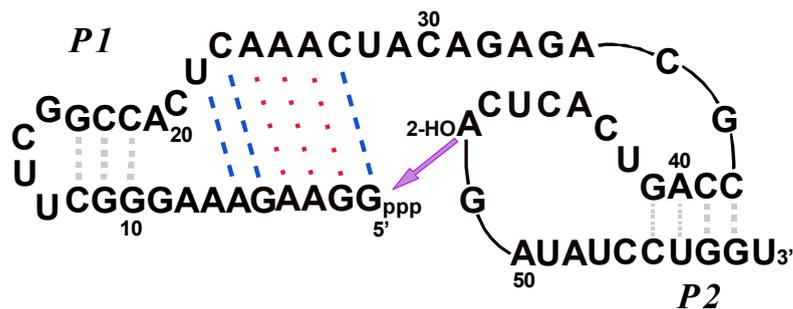
Werden gleichzeitig die Nukleotide c23 und g5 gegen g23 und c5 (4) ausgetauscht, ist eine Lariatbildung zu beobachten, während ein alleiniger Austausch von c23 diese verhindert, wie in Abbildung 3.2 dargestellt. Die beiden Nukleotide c27 und g2 gehen hingegen keine Interaktion miteinander ein, führt der Austausch von c27 zu g27 und g2 zu c2 (5) nicht zur Lariatbildung. Auch die Nukleotide g1 und c27 gehen Watson-Crick-Basenpaarungen miteinander ein, denn eine RNA mit einem a1 anstatt einem g1 und simultan u27 anstatt des c27 (8) bildet das Lariat. Dies gilt auch für die Nukleotide a6 und u22 (9), die eine Basenpaarung verbindet.

Werden die Basen c23 und g5 gleichzeitig gegen g23 und c5 ausgetauscht, kann die Lariatbildung beobachtet werden. Die beiden Nukleotide c27 und g2 hingegen gehen keine Basenpaarung miteinander ein, da diese durch den simultanen Austausch von c27 zu g27 und g2 zu c2 nicht wiederhergestellt wird. Generell scheinen die Nukleotide  $\Delta$ 6-9 und  $\Delta$ 20-22 für die Lariatbildung wichtig zu sein, da diese durch Deletion dieser Nukleotide verhindert wird. Das Guanosin g9 ist für die Lariatbildung je-

doch nicht essentiell. Wird es aus der Sequenz entfernt, wird die Reaktion davon nicht beeinflusst. Es liegt wahrscheinlich in einer Auswölbung. Auch die Nukleotide g1 und c27 sowie a6 und u22 interagieren miteinander, wie anhand der Basenaustauschexperimente in Abbildung 3.3 zu sehen ist. Es ist möglich, dass zwischen den Adenosinen a3 und a25 sowie a4 und a24 nicht kanonische Basenpaarungen über das N7 der Purinbasen existieren. Dies gilt auch für g2 und a26, die nicht kanonische Basenpaarungen eingehen können.

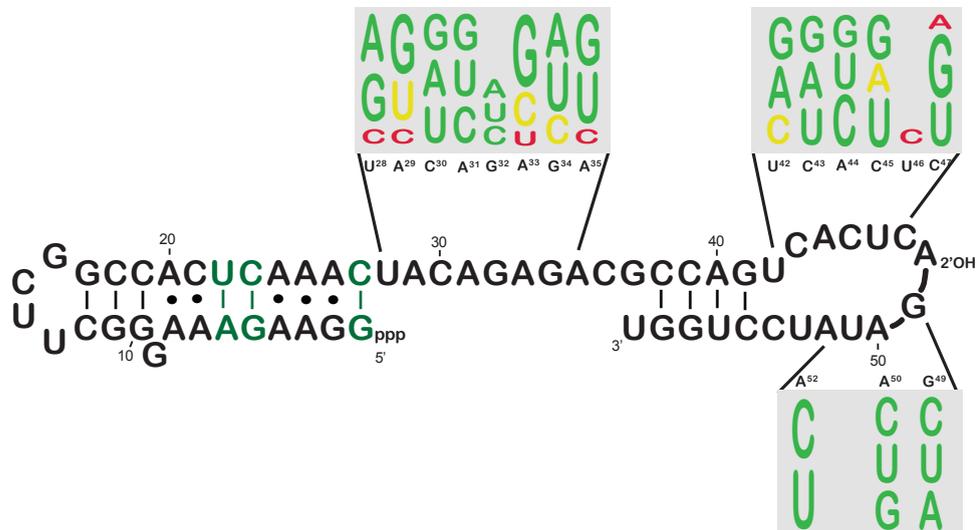
Die Basenpaarungen, die durch die Mutationen bestimmt werden konnten, sind in Abbildung 3.4 dargestellt. Es existieren kanonische Basenpaarungen zwischen g1 und c27, g5 und c23, a6 und u22, g10 und c19, g11 und c18, sowie c12 und g17. Nicht kanonische Basenpaarungen treten wahrscheinlich zwischen g2 und a26, a3 und a25, sowie a4 und a24 auf. Das Guanosin g9 befindet sich in einer Auswölbung.

Es ist möglich, dass auch im Bereich der Schleife P2 weitere Basenpaarungen existieren, die ebenfalls durch Mutationsexperimente verifiziert werden können.



**Abbildung 3.4:** Darstellung der linearen Form des lariatbildenden Ribozyms, bestehend aus 59 Nukleotiden. Die in grau eingezeichneten Basenpaarungen wurden von Thomas Tuschl et al. 2001 vorgeschlagen [1]. Mit Hilfe der oben beschriebenen Basenaustauschexperimenten sind weitere Basenpaarungen gefunden worden (blau). Potentielle nicht kanonische Basenpaarungen zwischen a3 und a25, a4 und a24 sowie g2 und a26 sind in rot wiedergegeben.

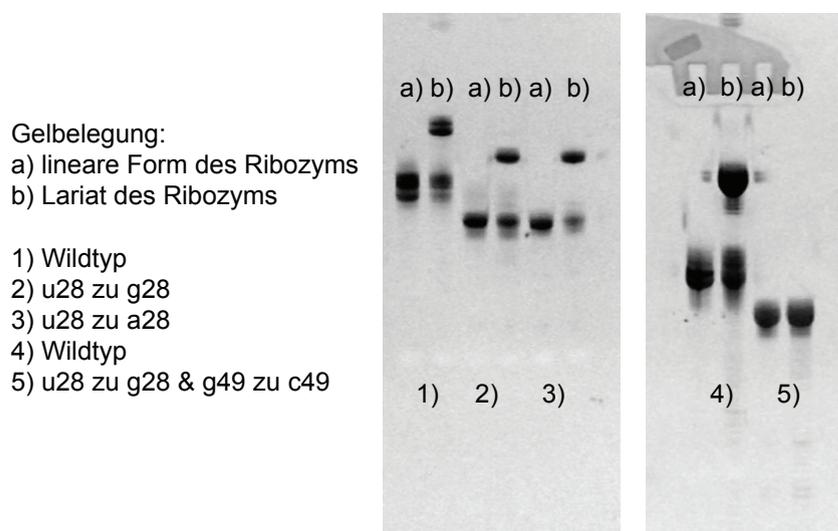
Der Bereich um die ACAGAGA-Box von Nukleotid a29 bis g37 kann Basenpaarungen um die Helix P2 mit den Nukleotiden u42 bis c47 oder g49 bis c54 eingehen. Um dort Basenpaarungen wieder zu finden, wurden auch hier Austauschexperimente vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Basenaustauschexperimente sind in Abbildung 3.5 dargestellt. Ein Austausch gegen Nukleotide (rot) an der entsprechenden Stelle verhindert die Lariatbildung, während eine Mutation gegen Nukleotide (gelb) zu einer stark reduzierten Lariatbildung führt. Der Austausch gegen Nukleotide (grün), beeinflusst die Lariatbildung nicht.



**Abbildung 3.5:** Sequenz des lariatbildenden Ribozyms: Ein Austausch der Nukleotide in rot an der entsprechenden Stelle verhindert die Lariatbildung, während eine Mutation der Nukleotide in gelb zu einer stark reduzierten Lariatbildung führt. Der Austausch der Nukleotide in grün beeinflusst die Lariatbildung nicht.

Wie in Abbildung 3.5 und 3.6 ersichtlich, beeinflusst ein Austausch der Base von u28 mit Adenosin und Guanosin die Lariatbildung nicht, während ein Austausch des u28 mit c28 die Umesterungsreaktion verhindert. Dieser Austausch führt also zu einer Änderung der Sekundärstruktur, die die Reaktion beeinflusst. Um zu untersuchen, mit welchem Nukleotid u28 Wechselwirkungen eingeht, wurden weitere Mutationen vorgenommen. Wird das u28 mit einem g28 und das g49 mit einem c49 ausgetauscht, findet, wie in Abbildung 3.6 dargestellt, die Umesterungsreaktion zum Lariat nicht mehr statt. Die Nukleotide g28 und c49 bilden eine stabile Wasserstoffbrücke, die die Struktur des Ribozyms verändert und einen Angriff der 2'-Hydroxylgruppe des a48 auf das Phosphatrückgrat des g1 verhindert. Eine AU-Wasserstoffbrückenbindung zwischen zwei Nukleotiden ist nicht stabil genug, um die Umesterungsreaktion zu verhindern, wirkt sich doch eine Mutation des g49 zu einem a49 nicht auf die Lariatbildung aus.

Weitere Basenpaarungen im Wildtyp des Ribozyms sind durch diese Experimente allerdings nicht verifizierbar. Es ist natürlich auch möglich, dass hier keine Watson-Crick-Basenpaarungen existieren.



**Abbildung 3.6:** Der Austausch der Base des u28 gegen ein Guanosin (2) oder Adenosin (3) beeinflusst die Lariatbildung nicht. Wird aber u28 gegen g28 und g49 gegen c49 (5) ausgetauscht, wird die Umesterungsreaktion verhindert.

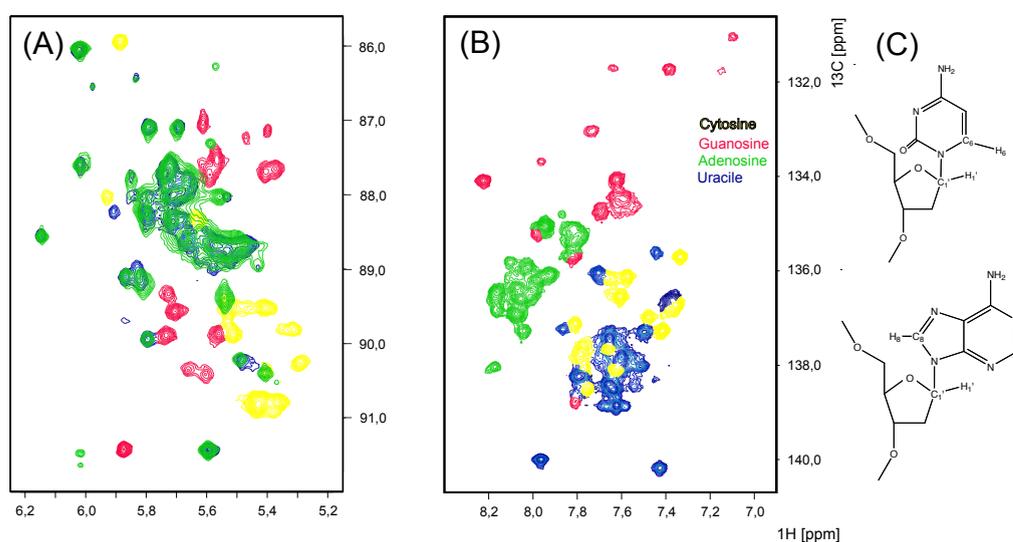
## 3.2 NMR-Spektroskopie: die lineare Form des lariatbildenden Ribozyms

Das lariatbildende Ribozym mit seinen 59 Nukleotiden und ungewöhnlichen Strukturelementen stellt für die NMR-Spektroskopie eine Herausforderung dar. Um mit Hilfe der NMR die Struktur eines Moleküls in Lösung zu bestimmen, müssen zunächst die Resonanzen der einzelnen Atome zugeordnet werden, um die gemessenen, unterschiedlichen Parameter wie NOEs (**N**uclear **O**verhauser **E**nhancement) [52], residuale dipolare Kopplungen (*residual dipolar couplings*, RDCs) [78, 79], *J*-Kopplungen und Dihedralwinkel [80] in eine Strukturrechnung einzubringen.

### 3.2.1 Die Zuordnung der Resonanzen des linearen Ribozyms

Charakteristisch in der RNA sind die Resonanzen der C1'H1'- und C6H6- beziehungsweise C8H8-Atome, die in der Abbildung 3.7 für die lineare Form des Ribozyms dargestellt sind. Sie stellen einen Fingerabdruck der RNA dar. Wie man anhand der <sup>13</sup>C-editierten HSQCs (**H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**oherence) [81] der <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-markierten linearen Form des lariatbildenden Ribozyms sehen kann, sind die Re-

sonanzen stark überlagert, was deren Zuordnung erschwert. Auch dreidimensionale Spektren für die Zuordnung der Resonanzen, wie  $^{13}\text{C}$ -editierte NOESY-Spektren (**N**uclear **O**verhauser **E**nhancement and **E**xchange **S**pectroscop**Y**) [82], weisen eine starke Überlagerung auf. Das  $^{13}\text{C}$ -editierte NOESY ist in Abbildung 3.8 für das  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierte lineare Ribozym dargestellt. Die  $^{13}\text{C}$ -Ebene um 87,9 ppm zeigt Kreuzsignale der C1'H1'-Diagonalresonanzen zu den H6- beziehungsweise H8-Atomen und zu weiteren Resonanzen in der Ribose. Auf Grund der Überlagerung ist es nicht möglich für alle Nukleotide, die Basen mit der Ribose zu korrelieren beziehungsweise die Nukleotide sequentiell zuzuordnen. Dies ist nur für einige wenige gut aufgelöste Resonanzen möglich.



**Abbildung 3.7:**  $^{13}\text{C}$ -editiertes HSQC der C1'H1'-Resonanzen der Ribose (A) und C6H6-beziehungsweise C8H8-Resonanzen der Base (B). Wie anhand der Spektren ersichtlich, sind die einzelnen Resonanzen der jeweils  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierten Adenosine (grün), Cytosine (gelb), Guanosine (rot) und Uracile (blau) stark überlagert. Die dargestellten Signale sind in den Nukleotiden der Pyrimidin- (oben) und Purinbasen (unten) wiedergegeben (C).

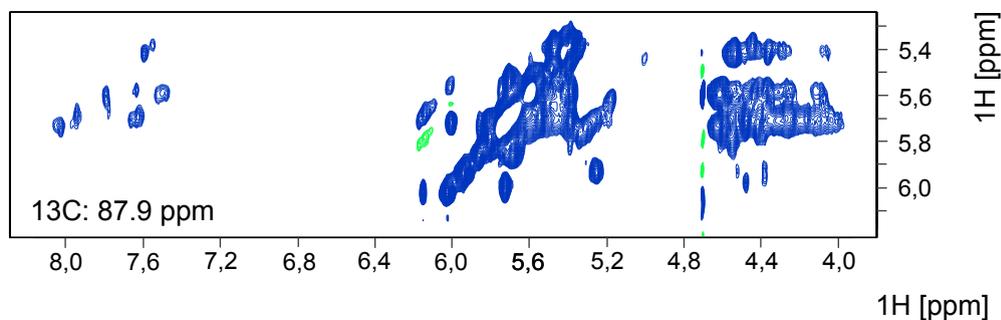
Um die spektrale Überlagerung zu verringern, wurden unterschiedliche Proben für die Zuordnung verwendet. Die RNA-Synthese erfolgte in einer in vitro Transkription aus einer Kombination von  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Isotopen markierten, deuterierten und unmarkierten Nukleotiden. Auf diesem Wege entstanden sieben verschiedene Proben, die für die Zuordnung verwendet wurden:

- 1)  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierte AUCG
- 2)  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierte AU
- 3)  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierte C

- 4)  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierte G
- 5)  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierte U
- 6)  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierte A
- 7)  $^2\text{H}$  - H3',H4', H5'H5''-markierte RNA

Die nicht erwähnten Nukleotide in den oben genannten Proben sind nicht Isotopen markiert.

Durch die unterschiedlich Isotopen markierten Proben ist die spektrale Überlagerung geringer. Dies ist in Abbildung 3.7 (B) für die C6H6-Resonanzen der Cytosine und Uracile ersichtlich, die sich in einem Bereich von 135 ppm bis 140 ppm in der  $^{13}\text{C}$ -Dimension des  $^{13}\text{C}$ -editierten HSQCs befinden. Auch Die C8H8-Resonanzen der Adenosine und Guanosine überlagern sich zwischen 134 ppm und 136 ppm nicht. Im  $^{13}\text{C}$ -editierten HSQC der C1'H1'-Resonanzen kommt es mit den unterschiedlichen, Isotopen markierten Proben zu keiner Überlagerung der Adenosine und Uracile zwischen 86 ppm und 90 ppm in der  $^{13}\text{C}$ -Dimension. Auch die Cytosine, deren C1'H1'-Resonanzen zwischen 86 ppm und 92 ppm liegen, sind in der  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierten Cytosinprobe besser aufgelöst.



**Abbildung 3.8:**  $^{13}\text{C}$ -editiertes NOESY: Die Kreuzsignale der C1'H1'-Signale zu den H6 beziehungsweise H8 der Basen und H2', H3', H4' und H5' der Ribose sind überlagert und machen die Zuordnung für einen großen Teil der Resonanzen in diesem Spektrum unmöglich.

### 3.2.2 Die Resonanzen der einzelnen Nukleotide

Für die Zuordnung der Resonanzen der einzelnen Nukleotide wurden verschiedene Spektren für die jeweils unterschiedlich markierten Proben der linearen Form des Ribozyms aufgenommen und ausgewertet.

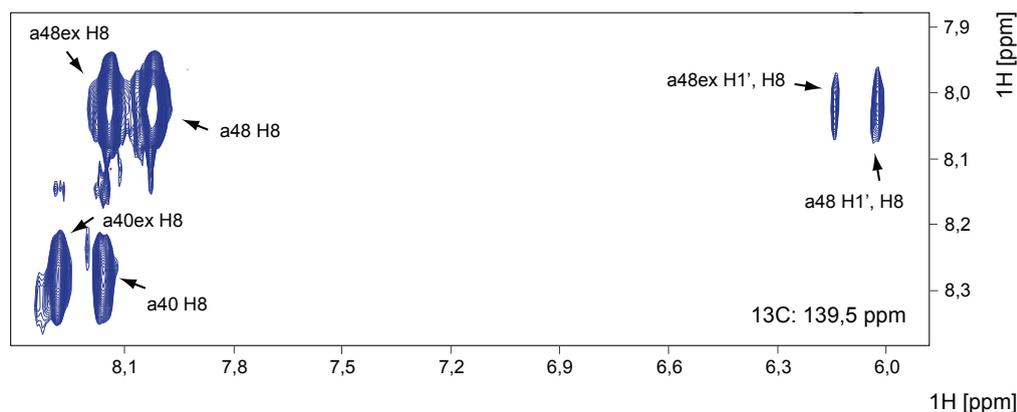
- 1) 2D  $^{13}\text{C}$ -editierte HSQCs [81]
- 2) 3D  $^{13}\text{C}$ -editiertes NOESY [82]
- 3) 3D  $^{13}\text{C}$ -editiertes  $^{13}\text{C}$ -gefiltertes NOESY [83]
- 4) 3D  $^{13}\text{C}$ -editiertes  $^{12}\text{C}$ -gefiltertes NOESY [83]
- 5) 3D  $^{13}\text{C}$ -editiertes  $^{13}\text{C}$ -gefiltertes basenselektives NOESY [83, 84]
- 6) 3D HCCH-COSY-TOCSY [85]
- 7) 2D HCCH-COSY [86]
- 8) 3D HCN der Ribose [87] und der Base [88]
- 9) 3D H(C)N(C)H [87]
- 10) 3D TROSY-*relayed* HCCH-COSY [89]
- 11) 2D HNN-COSY [53]

Mit Hilfe dieser Spektren können die Wasserstoff- und Kohlenstoffatome in der RNA zugeordnet werden. Das 3D HCCH-COSY-TOCSY sowie das 3D  $^{13}\text{C}$ -editierte  $^{13}\text{C}$ -gefilterte NOESY dient der Zuordnung der Resonanzen in der Ribose, das 2D HCCH-COSY sowie das 3D  $^{13}\text{C}$ -editierte  $^{13}\text{C}$ -gefilterte NOESY wird für die Zuordnung der Resonanzen in der Base verwendet. Die Resonanzen in der Base können mit den Resonanzen in der Ribose über die 3D HCN der Ribose, 3D HCN der Base, 3D H(C)N(C)H sowie 3D  $^{13}\text{C}$ -editierte  $^{13}\text{C}$ -gefilterte NOESY zugeordnet werden. Für die sequentielle Zuordnung der Signale wird das 3D  $^{13}\text{C}$ -editierte  $^{12}\text{C}$ -gefilterte NOESY verwendet. Stabile Basenpaarungen in der RNA führen zu Kreuzsignalen im HNN-COSY und können mit diesem Spektrum untersucht werden.

### 3.2.2.1 Der konformationelle Austausch des linearen Ribozyms

Wie anhand des 3D  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY, beschrieben in Kapitel 9.2.2.2, mit einer Mischzeit  $\tau_m$  von 150 ms in Abbildung 3.9 ersichtlich, existiert ein konformationeller Austausch. Dieser ist in der Abbildung für das *branchpoint* Adenosin a48 dargestellt. Neben dem Diagonalsignal des H8-Atoms bei 8,04 ppm ist ein Austauschsignal bei 8,18 ppm sichtbar. In einem Temperaturbereich von 6 °C bis 25 °C wurde mit den  $^{13}\text{C}$ -editierten HSQC Spektren die C1'H1'- und C6H6-beziehungsweise C8H8-Resonanzen verfolgt. Der konformationelle Austausch tritt allerdings bei allen Temperaturen in diesem Bereich auf. Auch unterschiedliche pH-Werte von pH=6,0 bis pH=7,4 beeinflussen diesen nicht. Der Austausch zwischen den Konformationen erschwert die Zuordnung der Resonanzen zusätzlich, weil die Überlagerung in den Spektren zunimmt. Allerdings zeigen nicht alle Resonanzen

einen konformationellen Austausch. Dieser tritt bei 29 Nukleotiden von c30 bis u59 auf; rund die Hälfte der Nukleotide liegt also in zwei Konformationen vor.



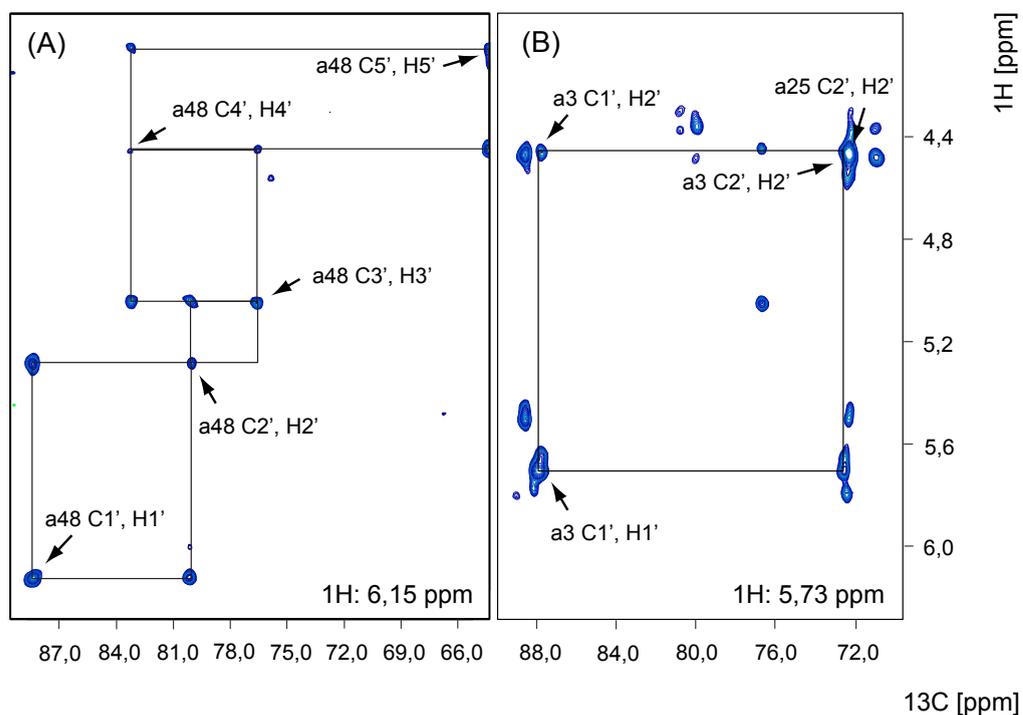
**Abbildung 3.9:** Das  $^{13}\text{C}$ -editierte  $^{13}\text{C}$ -gefilterte NOESY für das a40 und *branchpoint* Adenosin a48: Bei 8,04 ppm ist das Diagonalsignal des H8-Atoms des a48 (a48 H8), bei 8,18 ppm ist das Austauschsignal des a48 (a48 H8) sichtbar. Auch die Resonanz des H8-Atoms des a40 (a40 H8) zeigt das Signal (a40 H8ex) einer austauschenden Konformation.

Die zweite Konformation des linearen Ribozyms von c30 bis u59 zeigt in dem  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY mit einer Mischzeit  $\tau_m$  von 150 ms keine sequentiellen NOEs zwischen den einzelnen Nukleotiden. Welche der beiden auftretenden Konformationen des Ribozyms die Reaktion zum Lariat eingeht, kann durch die hier vorgenommenen Untersuchungen nicht ermittelt werden.

### 3.2.2.2 Die Zuordnung der Ribose

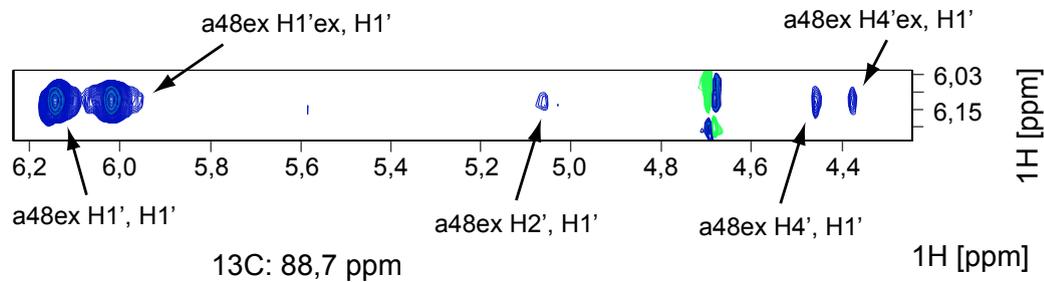
Die einzelnen Resonanzen in der Ribose können mit dem 3D HCCH-COSY-TOCSY, beschrieben in Kapitel 9.2.2.3 [85] und 3D  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY [83] mit einer Mischzeit  $\tau_m$  von 150 ms zugeordnet werden. Im 3D HCCH-COSY-TOCSY sind in der indirekten Protonendimension die COSY-Kreuzsignale sichtbar, während in der direkten Protonendimension die TOCSY-Resonanzen aufgelöst sind. Dies ermöglicht, startend von der C1'H1'-Korrelation der Ribose durch das gesamte Spinsystem des Zuckers zu gehen und die einzelnen Kohlenstoff- und Protonenresonanzen zuzuordnen. Wie in der Abbildung 3.10 (A) ersichtlich, ist die Zuordnung aller Wasserstoff- und Kohlenstoffatome der Ribose möglich, jedoch nur bei gut aufgelösten Spinsystemen wie dem des *branchpoint* Adenosins a48. Bei anderen Spinsystemen wie dem des Adenosins a3 ist auf Grund von Überlagerungen der Resonanzen nur die Zuordnung der C2'H2'-Resonanzen möglich, wie in Abbildung

3.10 (B) dargestellt. Wie anhand der Signale im HCCH-COSY-TOCSY ersichtlich, besitzen die C2'- und H2'-Atome des *branchpoint* Adenosins a48 eine chemische Verschiebung, die für die A-Form Helix der RNA verbreitete C3'-endo-Konformation der Ribose ungewöhnlich ist. In der C2'-endo-Konformation können die chemischen Verschiebungen der C2'-Atome größer sein als in der C3'-endo-Konformation [90]. Die Ribose des *branchpoint* Adenosins liegt in einem *sugar pucker* vor, der in der Regel in Strukturmotiven wie Auswölbungen und Schleifen vorkommt und bei dem Angriff der 2'-Hydroxylgruppe auf das Phosphatrückgrat des g1 relevant sein kann. Kapitel 3.2.4 befasst sich eingehend mit dem *sugar pucker* des a48.



**Abbildung 3.10:** Dargestellt ist die  $^{13}\text{C}$ - und indirekte  $^1\text{H}$ -Ebene des 3D HCCH-COSY-TOCSY für zwei unterschiedliche Bereiche der direkten  $^1\text{H}$ -Ebene: (A) für das *branchpoint* Adenosin a48 und (B) für das a3, dessen H2'- mit dem H2'-Atom des a25 überlagert sind.

Die Zuordnung kann mit dem 3D  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY [83] mit einer Mischzeit  $\tau_m$  von 150 ms überprüft werden. Ein Beispiel ist in Abbildung 3.11 zu sehen, in dem die Kreuzsignale des Adenosins a48 H1' mit den H2' und H4' sowie den Protonen der austauschenden Konformation H1' und H4' der Ribose sichtbar sind.



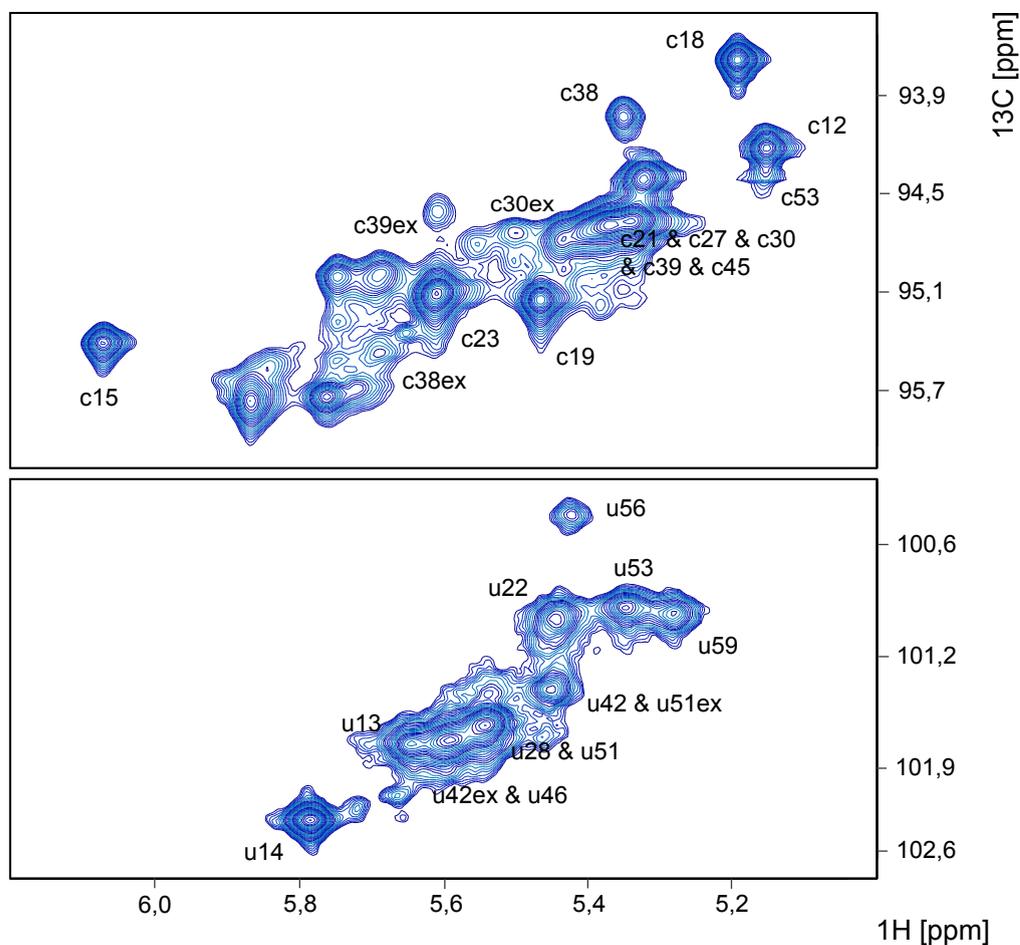
**Abbildung 3.11:**  $^{13}\text{C}$ -Ebene des  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY mit einer Mischzeit  $\tau_m$  von 150 ms bei 88,7 ppm für das *branchpoint* Adenosin a48 mit seinen Kreuzsignalen zu den H1' mit den H2' und H4' sowie den Protonen der austauschenden Konformation H1' und H4'.

Mit Hilfe der Spektren der unterschiedlich Isotopen markierten Proben des linearen Ribozyms können 73 Prozent der Resonanzen in der Ribose zugeordnet werden. Die Zuordnung ist in Kapitel 3.2.6 für einen Abschnitt des Ribozyms wiedergegeben.

### 3.2.2.3 Die Zuordnung der Base

In der Base der Nukleotide existieren nur ein bis zwei nicht austauschende Protonenresonanzen. Bei den Pyrimidinen Cytosin und Uracil handelt es sich neben den H6- um die H5-Atome. In den Adenosinen sind neben den H8-Atomen des Imidazolrings die H2-Atome im Purinsystem zu finden, während die Guanosine nur das H8-Atom aufweisen [91]. Die Zuordnung der H5- zu den H6-Atomen erfolgt mit Hilfe von  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY und dem HCCH-COSY Spektren des  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierten Uracil- beziehungsweise Cytosin-Ribozyms. Durch den kleinen Abstand zwischen den H6- und H5-Atomen von circa 2,5 Å (Ångström) ist das NOE-Signal zwischen diesen Protonen sehr intensiv. Auch die chemischen Verschiebungen der C5-Atome, die sich zudem bei den Cytosinen und Uracilen unterscheiden, erleichtern die Zuordnung. Die C5H5-Korrelationen weisen in diesem Bereich dennoch eine Überlagerung auf, wie anhand der  $^{13}\text{C}$ -editierten HSQC Spektren in Abbildung 3.12 ersichtlich ist.

Mit Hilfe der HCCH-COSY kann die Zuordnung durch die  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY Spektren verifiziert werden. Ein Nachteil dieser Spektren ist allerdings die begrenzte Auflösung in der indirekten Dimension durch die benötigte *constant-time* (ct) Inkrementierung mit einer totalen Evolutionszeit von 3,9 ms. Diese ist auf Grund der Kopplung zwischen den C5- und C6-Atomen von 67 Hz notwendig, die während der ct-Periode refokussiert wird.



**Abbildung 3.12:**  $^{13}\text{C}$ -editiertes HSQC der C5H5-Korrelationen der Cytosine und Uracile. Die Zuordnung erfolgte mit den  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY und HCCH-COSY Spektren.

In den  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY Spektren bei einer Mischzeit  $\tau_m$  von 150 ms treten intramolekulare Kreuzsignale zwischen den H1'(i+1)- und H2-Atomen bei a24, a25 und a26 auf. Die Base nimmt hier eine syn-Konformation zur Ribose ein und ist damit in der Lage nicht kanonische Basenpaarungen einzugehen. So können NOE-Signale zwischen H1'(i+1)- und H2-Atomen bei asymmetrischen N7 Adenosin-Adenosin-Basenpaaren beobachtet werden [92]. Zur Überprüfung dieses Strukturelements können die H2-Atome zu den H8-Atomen zugeordnet werden.

In der Regel können die H2-Atome der Adenosine zu den H8-Atomen über 3D TROSY-*relayed* HCCH-COSY Experimente [89] oder HCCH-TOCSY Experimente [93, 94] zugeordnet werden. Während die HCCH-TOCSY Experimente bei einer RNA mit 30 Nukleotiden wie der TAR-RNA aus HIV-II Kreuzsignale zwischen den H2- und H8-Atomen zeigen, ist dies für die lineare Form des Ribozyms mit 59 Nukleotiden nicht der Fall. Dies liegt an den langen TOCSY-Mischzeiten von 60 ms bis

100 ms, die in diesem Experiment verwendet werden und bei RNAs mit einer Größe über 15 kDa zu einer geringen Sensitivität führen [91].

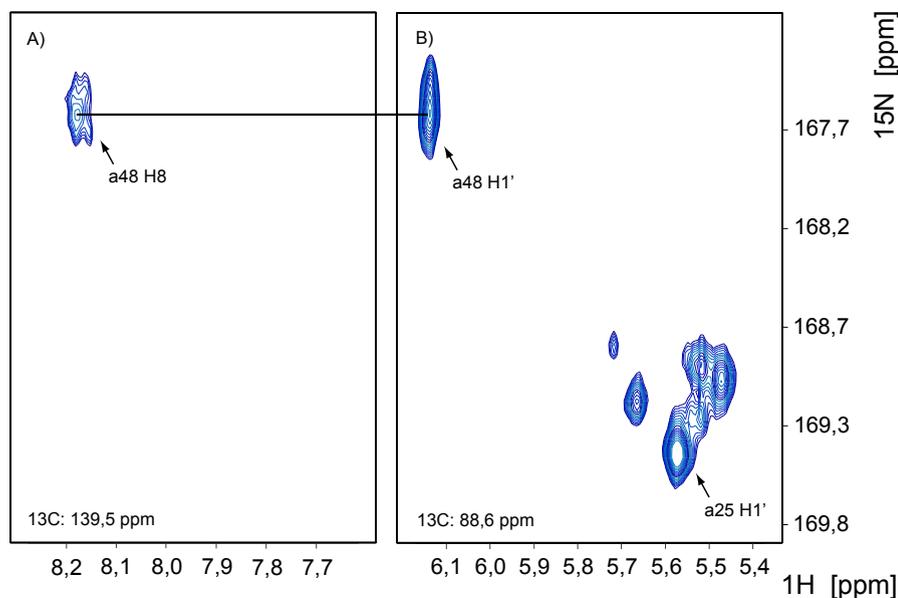
In den 3D TROSY-*relayed* HCCH-COSY Experimenten erfolgt die Zuordnung der H2- zu den H8-Atomen über die C4-, C5- und C6-Atome. Leider sind die Resonanzen der C4-, C5- und C6-Atome des Ribozyms sehr ähnlich, so dass eine Zuordnung über diese Signale unmöglich ist. Die H2-Atome können zu den H8-Atomen auch über die Aminosignale in 2D  $^{15}\text{N}$ -editierten NOESY Spektren zugeordnet werden. Durch die schnelle Rotation der Aminoprotonen um die CN-Bindung und den Austausch der Protonen mit Wasser sind NOE-Signale der Aminoprotonen der Adenosine oft nicht sichtbar [91]. Auch die Aminoprotonen des linearen Ribozyms weisen keine NOE-Signale auf. Aus diesen Gründen ist es nicht möglich, die H2-Atome mit den H8-Atomen im Ribozym zu korrelieren.

#### 3.2.2.4 Die Zuordnung der Base zur Ribose

Die Base ist mit der Ribose über eine CN-glykosidische Bindung verbunden. Die Kopplung zwischen dem Kohlenstoff- und Stickstoffatom von 12 Hz kann also zum Magnetisierungstransfer verwendet werden, um Signale in der Base mit der Ribose zu korrelieren. Auf Grund der kleinen  $J_{\text{CN}}$ -Kopplung von 12 Hz und der daraus folgenden langen Evolutionszeit spielt die dipolare Relaxation der Antiphasenmagnetisierung bei dem Transfer eine große Rolle [95, 96]. Die dipolare Relaxation kann allerdings über Multiquanten-Kohärenzen unterdrückt werden [87]. Auch passive Kopplungen in der Base und Ribose wirken sich auf den Magnetisierungstransfer aus, so dass die HCN-Experimente sensitiver sind als das H(C)N(C)H [97].

Die HCN Spektren für die Ribose und Base [87, 88], in denen die Korrelationen der C1'H1' oder der C6H6 beziehungsweise C8H8 zu den jeweiligen N1 oder N9 der Base sichtbar sind, sind in Abbildung 3.13 für das Adenosin a48 dargestellt. Manche Korrelationen können im H(C)N(C)H überprüft werden, gerade austauschende Resonanzen sind jedoch selten im H(C)N(C)H-Spektrum sichtbar. Die Pulssequenz des HCNs der Ribose wird in Kapitel 9.2.2.6 beschrieben.

Das wichtigste Spektrum für die Zuordnung der C1'H1'- zu den C6H6- beziehungsweise C8H8-Korrelationen ist das  $^{13}\text{C}$ -editierte  $^{13}\text{C}$ -gefilterte NOESY mit einer Mischzeit  $\tau_m$  von 150 ms. In diesen Spektren sind Kreuzsignale zwischen den H1'- und H6- beziehungsweise H8-Atomen sichtbar, so dass darüber die Zuordnung erfolgen kann. Die Spektren werden jeweils mit einer Probe aufgenommen, in der nur ein Nukleotid  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markiert ist. Sequentielle Kreuzsignale zwischen den ein-

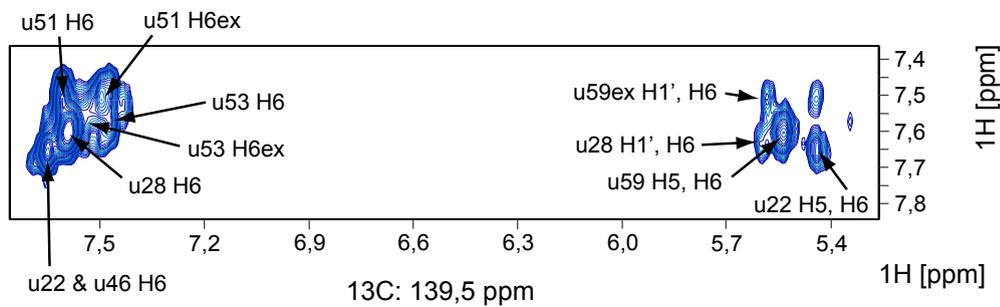


**Abbildung 3.13:** (A) HCN der Base und (B) Ribose mit den Resonanzen der H1'- und H8-Atome des a48, die über das N9-Atom korreliert werden.

zelen Nucleotiden (H1', H2' mit H6/H8(i+1)) treten deshalb nur in Bereichen auf, in denen die gleichen Nucleotide in einer Sequenz aufeinander folgen. Im Übrigen sind nur Kreuzsignale zwischen Resonanzen in den einzelnen Nucleotiden sichtbar und können somit eindeutig zugeordnet werden. In Abbildung 3.14 ist eine Ebene des Spektrums dargestellt. In der Region des Spektrums, in der die Kreuzsignale der H6- mit den H1'-Atomen sichtbar sind, befinden sich auch bei den Pyrimidinasen die Kreuzsignale mit den H5-Atomen und führen hier zu einer Überlagerung der Signale. Auch der konformationelle Austausch des Ribozyms erschwert die Zuordnung, da bei diesen Nucleotiden nicht nur die direkten Kreuzsignale sichtbar sind, sondern auch deren Austauschsignale. Theoretisch können auch die Kreuzsignale zwischen den H2'- und H6/H8-Atomen zur Zuordnung der Base zur Ribose verwendet werden. Allerdings sind die H2'- sowie C2'-Atome bei diesem Ribozym mit 59 Nucleotiden sehr überlagert. Mit Hilfe der oben erwähnten Spektren ist es möglich, für alle Nucleotide die Base mit der Ribose zu korrelieren.

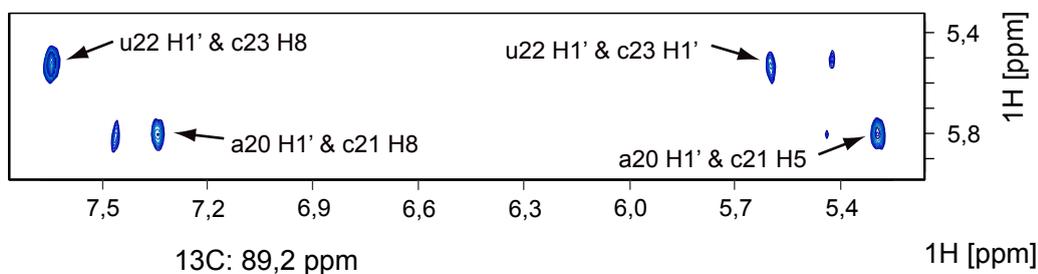
### 3.2.2.5 Die sequentielle Zuordnung des linearen Ribozyms

Die sequentielle Zuordnung des linearen Ribozyms erfolgt mit Hilfe des 3D  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{12}\text{C}$ -gefilterten NOESY und 3D  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY [83]. Im  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{12}\text{C}$ -gefilterten NOESY sind die Kreuzsignale zwischen  $^{13}\text{C}$ -



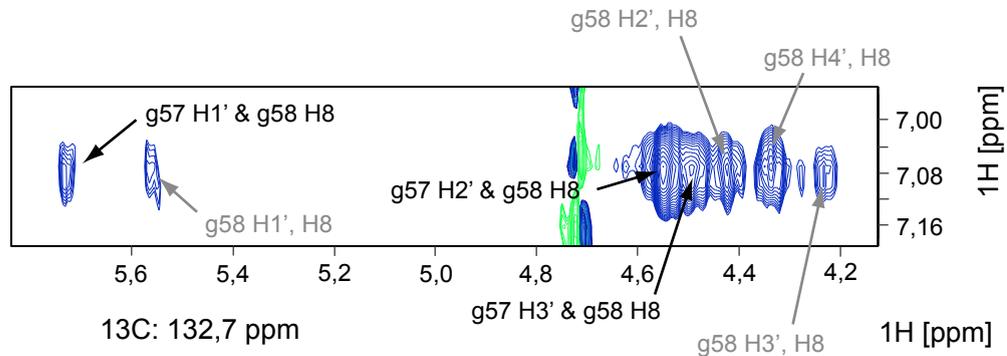
**Abbildung 3.14:**  $^{13}\text{C}$ -editiertes  $^{13}\text{C}$ -gefiltertes NOESY des  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierten Uracil-Ribozyms. Sichtbar sind neben den Diagonal- die Kreuzsignale der H6- mit den H1'-Atomen der Ribose und H5-Atomen der Base.

gebundenen und  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen sichtbar. In den jeweiligen NOESY-Spektren der Proben mit nur einem  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierten Nukleotid sind demnach nur sequentielle NOEs sichtbar. In Abbildung 3.15 ist ein Ausschnitt des  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{12}\text{C}$ -gefilterten NOESY mit einer Mischzeit  $\tau_m$  von 150 ms abgebildet. Es zeigt Kreuzsignale zwischen dem u22 H1' in der indirekten Protonendimension mit den H1' und H8 des Cytosins c23 in der direkten Dimension sowie dem a20 H1' mit den Cytosin c21 H1' und H8.



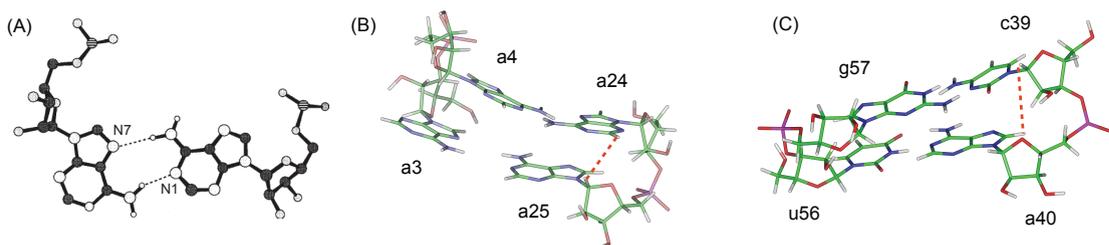
**Abbildung 3.15:** Ebene des  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{12}\text{C}$ -gefilterten NOESY bei 89,2 ppm mit einer Mischzeit  $\tau_m$  von 150 ms. Es zeigt Kreuzsignale der  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierten Cytosine mit den nicht markierten Nukleotiden, so zum Beispiel zwischen dem H1'- des a20 und H8-Atom des c21.

Für die Bereiche des Ribozyms, in denen sich gleiche Nukleotide wiederholen, so zum Beispiel bei a24 bis a26 und g57 sowie g58, sind die internukleotiden NOEs im  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY sichtbar und müssen neben den intranukleotiden Signalen erkannt werden. In Abbildung 3.16 ist ein Ausschnitt des  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY mit einer Mischzeit  $\tau_m$  von 150 ms gezeigt. Die Kreuzsignale des H8-Atoms des g58 mit der Ribose des g57 sind ebenso sichtbar wie die NOEs zwischen dem H8-Atom des g58 und seiner eigenen Ribose.



**Abbildung 3.16:**  $^{13}\text{C}$ -editiertes  $^{13}\text{C}$ -gefiltertes NOESY mit einer Mischzeit  $\tau_m$  von 150 ms: die NOEs zwischen den Nukleotiden des g57 mit dem g58 sind in schwarz, die NOEs des Nukleotids g58 in grau hervorgehoben.

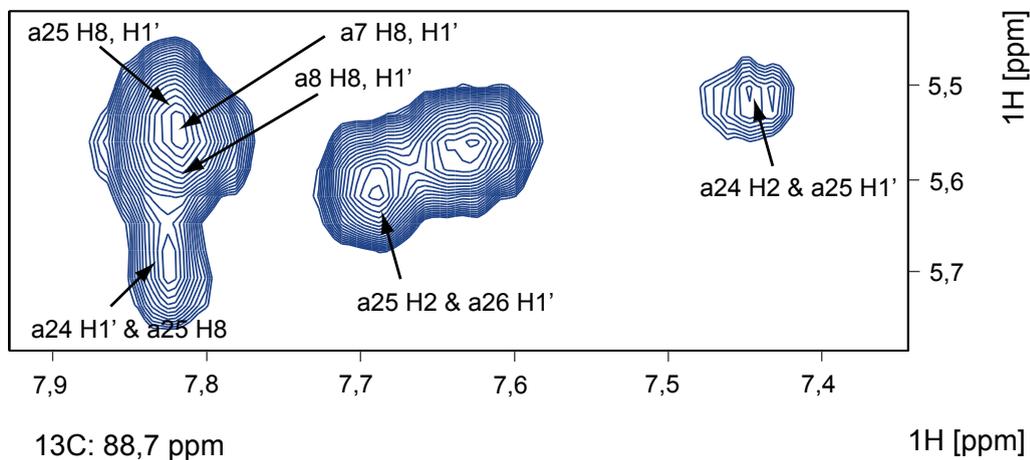
Ist in RNA-Strukturen eine Helix vorhanden, liegt diese in der Regel in der A-Form vor. Diese Anordnung führt zu einer räumlichen Nähe der H1'- zu den H8(i+1)-Atomen und deshalb zu NOEs zwischen diesen Protonen, während die H2-Atome so weit entfernt sind, dass sie keine NOEs zu den Protonen der Ribose aufweisen. Bei einigen Adenosinen sind allerdings im  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY Kreuzsignale zwischen den H1'(i+1)- und H2-Atomen sichtbar. Diese Nukleotide liegen also nicht in kanonischen Basenpaarungen vor, wie bereits in Kapitel 3.2.2.3 beschrieben.



**Abbildung 3.17:** Asymmetrisches N7 Adenosin-Adenosin-Basenpaar: (A) Die beiden Basen gehen in der Wasserstoffbrücke eine Bindung über das N1- und N7-Atom ein. (B) In dieser Basenpaarung sind auf Grund des geringen Abstandes NOEs zwischen dem H2- und H1'(i+1)-Atom (rot gestrichelte Linie) zu beobachten [92]. (C) In kanonischen AU-Basenpaarungen ist der Abstand zwischen den H2- und H1'(i+1)-Atomen zu groß für einen NOE. Hier tritt ein NOE zwischen den H1'- und H8(i+1)-Atomen auf.

In Abbildung 3.17 (A) ist eine asymmetrische N7 Adenosin-Adenosin-Basenpaarung dargestellt. Die Aminprotonen bilden Wasserstoffbrücken mit den N1- und N7-Atomen [92]. Diese nicht kanonische Basenpaarung von Adenosin führt zu NOEs

zwischen den H2- und H1'(i+1)-Atomen. Es treten hierbei also sequentielle NOEs auf. In Abbildung 3.18 ist ein Ausschnitt des  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY des  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierten Adenosin Ribozyms dargestellt. In dem Spektrum sind Kreuzsignale zwischen den a25 H2- und a26 H1'-Atomen und a24 H2- und a25 H1'-Atomen sichtbar. Das H1'-Atom des a24 zeigt ebenfalls ein Kreuzsignal mit dem a25 H8-Atom.

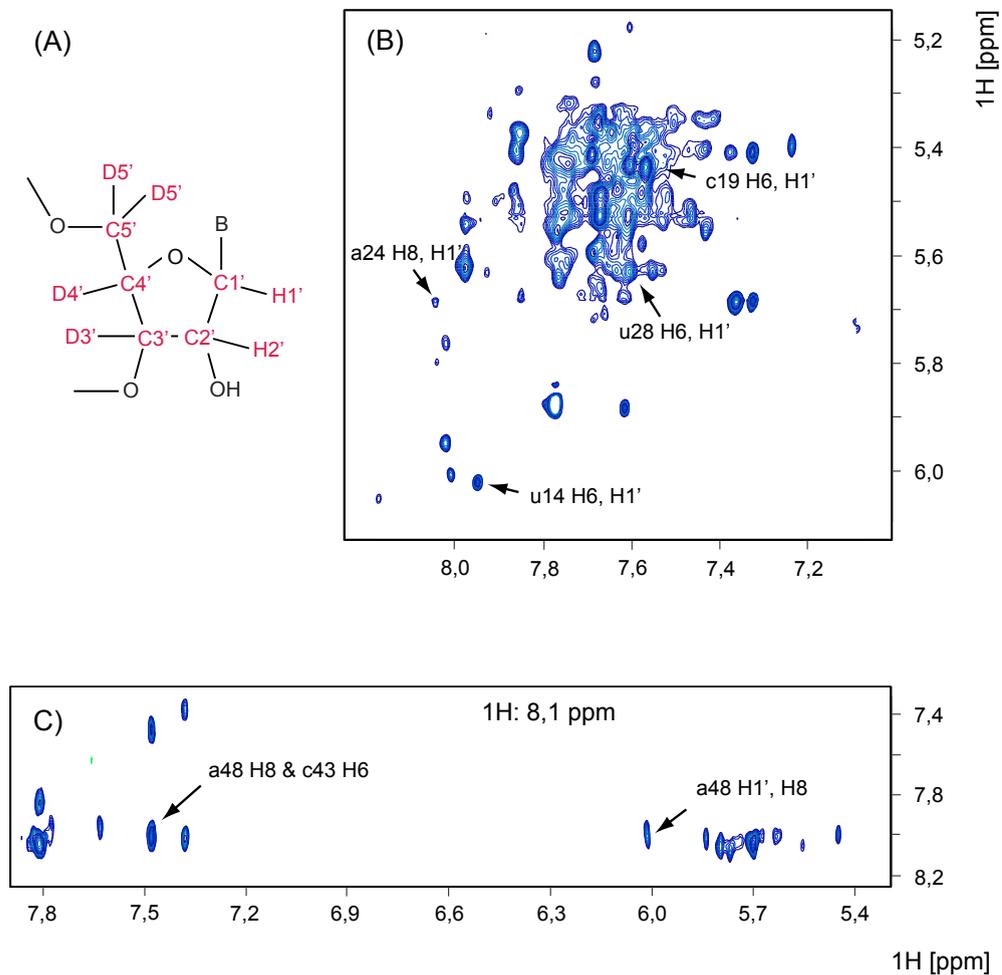


**Abbildung 3.18:** In diesem  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY mit einer Mischzeit  $\tau_m$  von 150 ms der  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierten Adenosinprobe sind NOEs zwischen den H2- und H1'(i+1)-Atomen der Adenosine sichtbar.

### 3.2.3 NMR-Spektren des H3', H4', H5'H5''- $^2\text{H}$ -Ribozyms

Für die Zuordnung der Nukleotide sind oft auch die H2'-Resonanzen sehr hilfreich, denn sie bilden starke NOEs zu den H6(i+1)/H8(i+1)-Atomen und vereinfachen dadurch die sequentielle Zuordnung der Nukleotide. Die H2'-Resonanzen überlagern sich aber auch mit anderen Signalen der H3'-, H4'- und H5'-Atome und erschweren so die Zuordnung. Auch führt die Protonendichte in der Ribose zu einer verstärkten Relaxation, die einen Intensitätsverlust der Signale verursacht. Um die Überlagerung der Resonanzen in der Ribose zu verringern, können RNAs hergestellt werden, die in der Position der H3'-, H4'- und H5'-Atome deuteriert sind [98]. Diese RNAs sind vorteilhaft, da die Magnetisierung durch die geringere Protonendichte langsamer relaxiert und die H2'-Resonanzen nicht mit den H3'-, H4'- und H5'-Resonanzen überlagern.

In Abbildung 3.19 ist ein Ausschnitt aus einem 2D-NOESY des linearen  $^2\text{H}$ -(H3', H4', H5') Ribozyms gezeigt. Es zeigt NOEs zwischen den H1'- und H6- beziehungs-



**Abbildung 3.19:** (A)  $^2H$ -(H3', H4', H5')-Ribose (B) 2D-NOESY des linearen  $^2H$ -(H3', H4', H5') Ribozyms: Kreuzsignale zwischen den H1' und H6 beziehungsweise H8 und H2 (C) 3D NOESY-TOCSY des linearen  $^2H$ -(H3', H4', H5') Ribozyms: NOEs des *branchpoint* Adenosins a48.

weise H8-Atomen. Allerdings sind auch hier die Signale ziemlich überlagert und können nur zur Überprüfung der Zuordnung verwendet werden. In einem dreidimensionalen NOESY-TOCSY ist die Überlagerung verringert. Dies vereinfacht die Zuordnung.

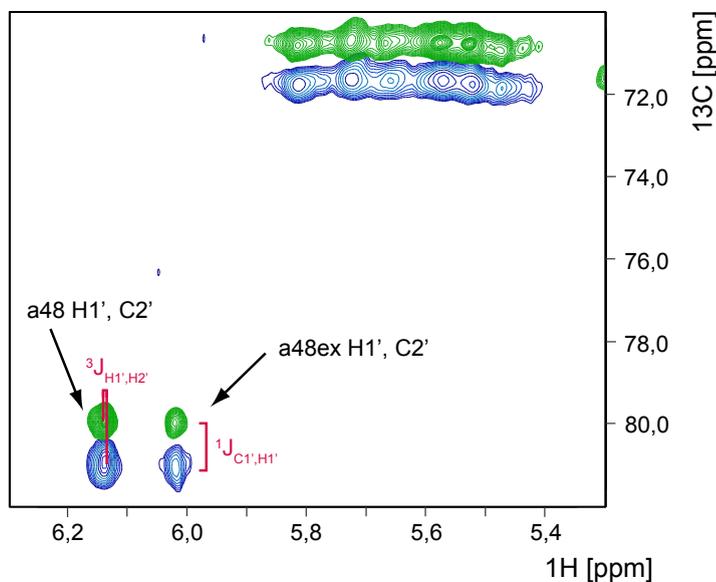
Die deuterierten Nukleotide sind kommerziell nicht  $^{13}C$ - und  $^{15}N$ -markiert zu erwerben, so dass  $^{13}C$ - oder auch  $^{15}N$ -editierte und -gefilterte Experimente nicht möglich sind. Auch sind die deuterierten Nukleotide nur in einer Mischung aller vier Nukleotide erhältlich, so dass es nicht möglich ist, verschiedene Varianten an Proben mit deuterierten und nicht deuterierten Nukleotiden herzustellen.

### 3.2.4 Das *branchpoint* Adenosin a48

Die Ribose des *branchpoint* Adenosins a48 weist gegenüber den anderen Nucleotiden ungewöhnliche chemische Verschiebungen auf. Dies ist im Spektrum des 3D HCCH-COSY TOCSY in Abbildung 3.10 in Kapitel 3.2.2.2 ersichtlich. In der RNA nimmt die Ribose in der Helix der A-Form einen *sugar pucker* in der C3'-endo-Konformation ein, während in nicht helikalen Bereichen wie Ausstülpungen und Schleifen die Ribose in der Regel in der C2'-endo- oder einem konformationellen Gleichgewicht zwischen der C3'- und C2'-endo-Konformation vorliegt [99]. Die H2'- und H3'-Atome weisen in der C3'-endo-Konformation oder einem konformationellen Gleichgewicht chemische Verschiebungen  $\delta$  zwischen 4,4 und 5,2 ppm auf. Die chemischen Verschiebungen der C2'- und C3'-Atome liegen zwischen 70 und 78 ppm. Die chemischen Verschiebungen  $\delta_{C2'}$  liegen in der C2'-endo-Konformation bis zu 4 ppm über den chemischen Verschiebungen in der C3'-endo-Konformation [90, 100]. Das C2'-Atom des *branchpoint* Adenosins a48 besitzt eine chemische Verschiebung von 80,2 ppm, das H2'-Atom von 5,3 ppm. Die austauschende Konformation weist chemische Verschiebungen von  $\delta_{C2'} = 80,2 \text{ ppm}$  und  $\delta_{H2'} = 5,06 \text{ ppm}$  auf. Es ist also möglich, dass die Ribose des a48 einen *sugar pucker* in der C2'-endo-Konformation einnimmt. Diese Konformation ist in der RNA häufig in Auswölbungen und Schleifen anzutreffen. Im Spleißosom ist es wichtig, dass das *branchpoint* Adenosin in einer Auswölbung liegt [46].

Der *sugar pucker* der Ribose kann über  $^3J_{H',H2'}$ -Kopplungen, die von den Dihedralwinkeln in der Ribose abhängen, in einem HCCH-E.COSY bestimmt werden [101, 102]. Die Pulssequenz des Experiments ist in Kapitel 9.2.2.4 illustriert. Dieses ist in Abbildung 3.20 für das  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierte Adenosin Ribozym dargestellt. In der Protonen-Dimension weisen die Signale der C2'H1'-Resonanzen die  $^3J_{H1',H2'}$ -Kopplung und in der Kohlenstoff-Dimension die  $^1J_{C1'H1'}$ -Kopplung auf. Um eine Überlagerung der Resonanzen zu verhindern, werden aus dem Experiment zwei Spektren extrahiert, die in der Abbildung 3.20 jeweils in grün und blau dargestellt sind.

Das *branchpoint* Adenosin a48 unterliegt wie sämtliche Nucleotide ab dem c30 einem konformationellen Austausch. Da dieser Austausch langsam vonstatten geht, wird die Kopplung in dem HCCH-E.COSY durch den Austausch nicht gegen 0 gemittelt. Die aus dem HCCH-E.COSY extrahierten Kopplungen für das *branchpoint* Adenosin a48 sind in Tabelle 3.1 wiedergegeben. Die Kopplungen für die beiden Konformationen betragen 1,4 Hz beziehungsweise 1,6 Hz. Dies weist auf einen *su-*



**Abbildung 3.20:** HCCH-E.COSY des  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierten Adenosin Ribozyms: Die  $\text{C}2'\text{H}1'$ -Resonanzen der zwei Konformationen des *branchpoint* Adenosins a48 weisen in der Protonen-Dimension die  $^3J_{\text{H}1',\text{H}2'}$ -Kopplung und in der Kohlenstoff-Dimension die  $^1J_{\text{C}1'\text{H}1'}$ -Kopplung auf. Die Kopplung wird aus zwei unterschiedlichen Spektren extrahiert (grün und blau).

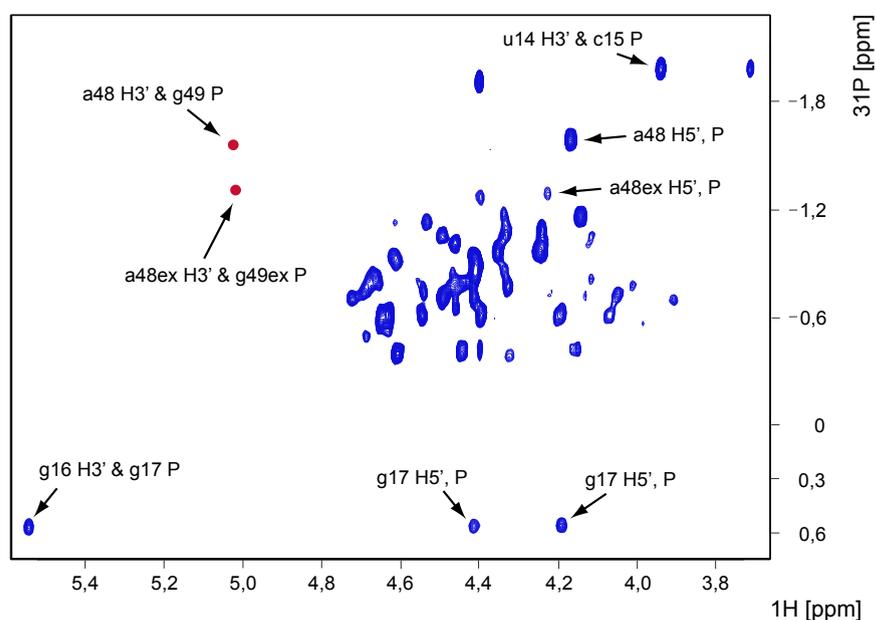
gar *pucker* in der  $\text{C}3'$ -endo-Konformation hin, der allerdings auf Grund der chemischen Verschiebungen der  $\text{C}2'$ -Atome ausgeschlossen werden kann. In der  $\text{C}2'$ -endo-Konformation betragen die Kopplungen zwischen 7,0 Hz und 9,0 Hz. Aufgrund der  $^3J_{\text{H}1',\text{H}2'}$ -Kopplungen kann die  $\text{C}2'$ -endo-Konformation für die Ribose des a48 demnach ausgeschlossen werden, obwohl die chemischen Verschiebungen der  $\text{C}2'$ -Atome darauf hinweisen. In der  $\text{O}1'$ -exo-,  $\text{C}1'$ -endo-,  $\text{C}2'$ -exo- und  $\text{C}3'$ -endo-Konformation liegen die Kopplungen zwischen 1,0 Hz und 2,0 Hz [97, 103]. Der *sugar pucker* der beiden Konformationen des a48 muss also innerhalb der  $\text{O}1'$ -exo- bis  $\text{C}2'$ -exo- Konformation mit einem Pseudorotationswinkel von  $\text{P} = 260^\circ$  bis  $360^\circ$  liegen [104]. Dies könnte eine Voraussetzung für den Angriff der  $2'$ -Hydroxylgruppe und anschließende Umesterungsreaktion zum Lariat sein. Im Spleißosom ist es wichtig, dass das *branchpoint* Adenosin in einer Auswölbung liegt [46]. Die Konformation der Ribose des attackierenden Adenosins im Spleißosom ist nicht bekannt, könnte allerdings Analogien zur Konformation im lariatformenden Ribozym aufweisen.

Auch die Konformation des Phosphatrückgrates beeinflusst die Konformation der Ribose. Das Phosphatrückgrat wird durch die Dihedralwinkel  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  und  $\zeta$  definiert. Durch fehlende Protonen im Rückgrat ist es nur möglich, die Konformati-

**Tabelle 3.1:**  ${}^3J_{H1',H2'}$ -Kopplungen der zwei Konformationen des *branchpoint* Adenosins a48.

|                             | a48    | a48(Austausch) |
|-----------------------------|--------|----------------|
| ${}^3J_{H1',H2'}$ -Kopplung | 1,4 Hz | 1,6 Hz         |

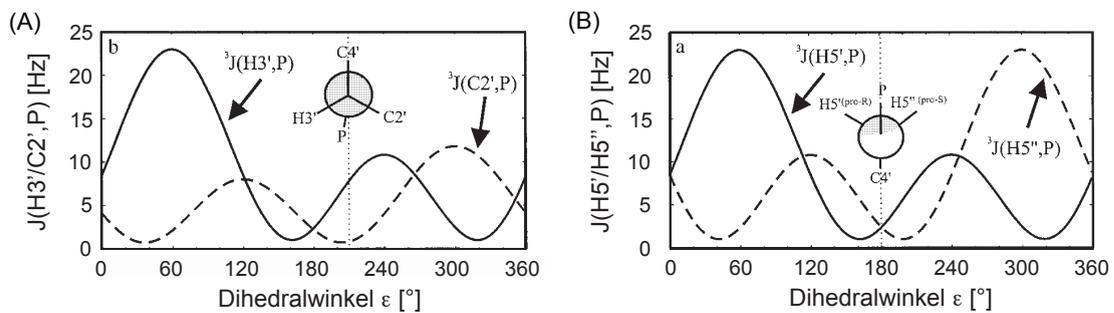
on mit Hilfe von Kopplungen des Phosphors zu bestimmen [105]. Die heteronuklearen  ${}^3J_{P,H3'/H5'}$ -Kopplungen können mit PH-ct-COSY Spektren mit unterschiedlichen Evolutionszeiten für die  ${}^3J$ -Kopplung ermittelt werden [106]. Das PH-ct-COSY mit einer Evolutionszeit von 30 ms für das lineare lariatbildende Ribozym ist in Abbildung 3.21 dargestellt. Die Pulssequenz des Experiments wird in Kapitel 9.2.2.5 besprochen.



**Abbildung 3.21:** PH-ct-COSY des lariatbildenden Ribozyms. Die Korrelationen zwischen dem H3'-Atom des a48 und P-Atom des g49 (roter Punkt), die dem chemischen Austausch unterliegen, haben eine geringe Signalintensität. Die Intensitäten der Korrelationen zwischen dem a48 H5'- und P-Atom sind größer.

Die Korrelationen zwischen dem H3'-Atom des a48 und dem P-Atom des g49, die dem chemischen Austausch unterliegen, sind sehr schwach. Im Spektrum sind die beiden Signale deswegen mit einem roten Punkt hervorgehoben. Die geringe Signalintensität kann auf einer kleinen  ${}^3J_{P,H3'}$ -Kopplung beruhen. In Abbildung 3.22 ist die Karplus-Beziehung der  ${}^3J_{P,H3'}$ -Kopplung wiedergegeben. Bei einem Dihe-

dralwinkel  $\epsilon$  von ca.  $160^\circ$  und  $320^\circ$  weist das Phosphatrückgrat der RNA kleine  $^3J_{P,H3'}$ -Kopplungen auf. Die Korrelation zwischen dem Phosphor und dem H5'-Atom weisen für beide Konformationen des a48 im Spektrum eine wesentlich größere Signalintensität auf. Die  $^3J_{P,H5'}$ -Kopplungen müssen also erheblich größer sein als die  $^3J_{P,H3'}$ -Kopplungen. Bei einem Dihedralwinkel  $\epsilon$  von ca.  $160^\circ$  und  $320^\circ$  weist die  $^3J_{P,H5''}$ -Kopplung Werte von etwa 9 Hz beziehungsweise 15 Hz auf.



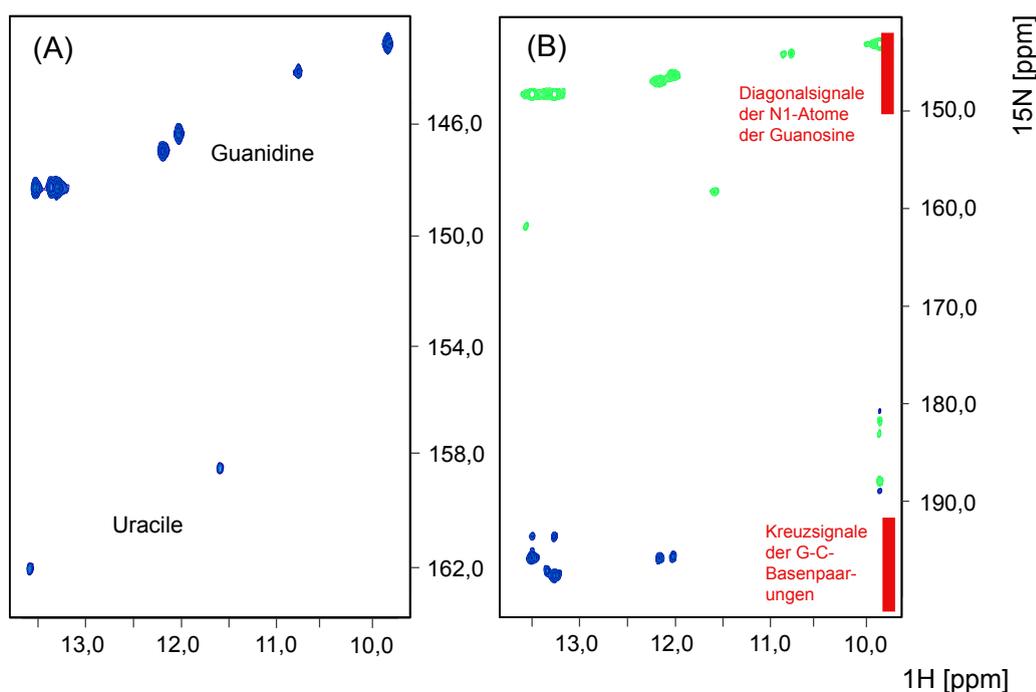
**Abbildung 3.22:** Karplus-Kurven der (A)  $^3J_{P,H3'}$ - und  $^3J_{P,C2'}$ -Kopplungen sowie der (B)  $^3J_{P,H5'}$ / $^3J_{P,H5''}$ -Kopplungen.

Eine exakte Bestimmung der  $^3J_{P,H3'}$ -Kopplungen über verschiedene Evolutionszeiten im PH-ct-COSY ist schon auf Grund der geringen Signalintensität bei einer Evolutionszeit von 30 ms nicht möglich. Carlomagno et al. benutzen für die Extraktion der Kopplung Evolutionszeiten zwischen 18 ms und 82 ms [106]. Die  $^3J_{P,H5'}$ -Kopplung und damit der Dihedralwinkel  $\epsilon$  kann allerdings durch das PH-ct-COSY mit unterschiedlichen Evolutionszeiten ermittelt werden. Die Zuordnung der C5'- und H5'/H5''-Atome des a48 ist Grund der Überlagerung nicht eindeutig und sollte zunächst mit Proben mit anderen Markierungsmustern verifiziert werden. Durch den Einsatz von vollständig deuterierten Nucleotiden neben  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierten Adenosinen werden die Relaxationseigenschaften der RNA in der NMR verbessert. Dies führt zu geringeren Linienbreiten der Signale und vereinfacht die Zuordnung.

### 3.2.5 Die Wasserstoffbrücken im Ribozym

Wasserstoffbrücken sind wie kovalente Bindungen elektronenmedierte Bindungen, die in der NMR-Spektroskopie über ihre  $J$ -Kopplungen aufgelöst werden können. Deshalb existieren eine Reihe von NMR-Experimenten, um die Wasserstoffbrücken von kanonischen [53, 107] und nicht kanonischen Basenpaarungen [108] in der RNA

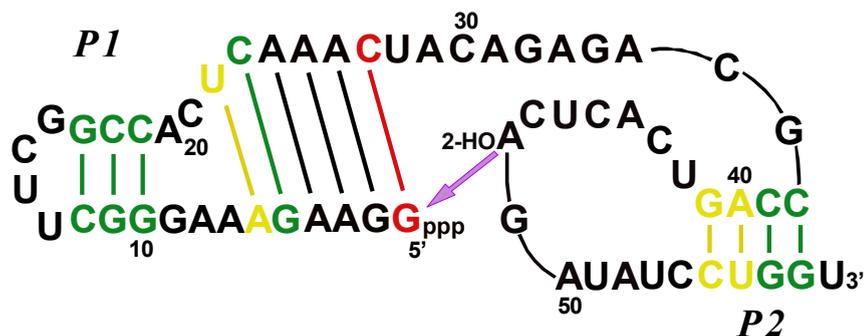
zu untersuchen. Dabei kann zwischen Experimenten unterschieden werden, die direkt von den an den Wasserstoffbrücken beteiligten Amino- oder Iminoprotonen ausgehen und mit Wasser als Lösungsmittel durchgeführt werden [107, 108] und den Experimenten, die nicht mit Wasser austauschende Wasserstoffatome wie H2 oder H8 in den Purinbasen beteiligen und deshalb im Lösungsmittel Deuteriumoxid ausgeführt werden können [53, 109]. Die meisten Experimente benutzen für den Magnetisierungstransfer dabei die  $^2J_{NN}$ -Kopplung der Wasserstoffbrücke in einem HNN-COSY Experiment [53].



**Abbildung 3.23:** (A)  $^{15}\text{N}$ -editierten HSQC. Es sind zwei Iminoprotonen der Uracile und sieben Iminoprotonen der Guanosine sichtbar. (B) HNN-COSY der Iminoprotonen. Die Kreuzsignale der Iminoprotonen im HNN-COSY weisen ein anderes Vorzeichen auf als die Diagonalsignale. Positive Signale sind in blau und negative Signale in grün dargestellt. Zwischen 190 ppm und 200 ppm sind die Kreuzsignale der Iminoprotonen über die Wasserstoffbrückenbindungen der G-C-Basenpaare zu sehen.

Auch  $^{15}\text{N}$ -editierte HSQC Experimente der Iminoprotonen zeigen Basenpaarungen, da nur Iminoprotonen in Wasserstoffbrückenbindungen nicht vom Austausch mit Wasser betroffen sind und deshalb im Spektrum Signale zeigen. In Abbildung 3.23 sind die  $^{15}\text{N}$ -editierten HSQC und HNN-COSY Spektren des linearen Ribozyms dargestellt. Im HSQC sind sieben Imino-Resonanzen von Guanosinen und zwei

Imino-Resonanzen von Uracilen sichtbar. Demnach müssen mindestens sieben GC- und zwei AU-Basenpaare existieren. Dies ist konsistent mit den Ergebnissen aus den Basenaustauschexperimenten in Kapitel 3.1, durch die zwei AU-Basenpaare und acht GC-Basenpaare bestätigt worden sind. So sind ebenfalls die Basenpaarungen zwischen dem g5 und c23 sowie dem a6 und u22 in den NMR-Spektren sichtbar, die ebenfalls durch die Mutationsstudien bestätigt werden konnten (siehe Abbildung 3.4). Das GC-Basenpaar zwischen dem g1 und dem c27 ist durch seine Position am Beginn der RNA nicht stabil, so dass es im  $^{15}\text{N}$ -editierten HSQC nicht sichtbar ist, da dessen Proton mit Wasser austauscht. Die Basenpaarung zwischen dem g1 und c27 ist essentiell für die Lariatbildung, wie die Mutationsexperimente gezeigt haben. Allerdings ist es wesentlich instabiler als die anderen GC-Basenpaare im Ribozym, wie die NMR-Experimente zeigen.



**Abbildung 3.24:** Die stabilen Basenpaarungen (grün) zeigen im HNN-COSY Kreuzsignale, die Imino-Resonanzen der labileren Basenpaarung (gelb) sind im  $^{15}\text{N}$ -editierten HSQC sichtbar, während die instabilen Basenpaarungen (rot) in beiden Spektren keine Signale aufweisen.

Das HNN-COSY nach Dingley et al. [107] ist ebenfalls in Abbildung 3.23 dargestellt. Es zeigt Kreuzsignale der Iminoprotonen von sechs Guanosinen mit den N3-Atomen der Cytosine zwischen 190 ppm und 200 ppm. Möglicherweise ist das siebte GC-Basenpaar nicht ausreichend stabil, so dass in der COSY-Mischzeit  $\tau_m$  von 30 ms das Iminoproton mit Wasser ausgetauscht wird. Die sequentiellen Kreuzsignale der H1'- und H2'- zu den H6- oder H8-Atomen sind in den  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{12}\text{C}$ -gefilterten NOESY Experimenten für die Basenpaarung g41 und c55 im Verhältnis zu den anderen GC-Basenpaarungen schwach. Dies deutet darauf hin, dass die Basenpaarung relativ instabil ist. So kann es sich bei dem fehlenden Kreuzsignal im HNN-COSY um die Korrelation dieser Basenpaarung handeln. Die Iminoprotonen der Uracile zeigen in den Spektren keine Kreuzsignale mit den N1-Atomen der Adenosine. Auch

hier sind wahrscheinlich die Basenpaare nicht stabil, so dass die Iminoprotonen mit Wasser austauschen.

Die Ergebnisse der Mutationsexperimente ergänzen sich mit den NMR-Experimenten. Mit den Mutationsstudien ist es möglich, festzustellen, ob eine Basenpaarung für die Funktionalität des Ribozyms relevant ist. In den NMR-Spektren kann in Abhängigkeit von der Stabilität die Basenpaarung visualisiert werden. Die Basenpaarungen sind in Abhängigkeit von ihrer Stabilität in Abbildung 3.24 dargestellt. Die stabilen Basenpaarungen sind in den  $^{15}\text{N}$ -editierten HSQC und HNN-COSY Spektren sichtbar, unbeständigere Basenpaarungen nur noch im HSQC.

### 3.2.6 Die Zuordnung des linearen Ribozyms

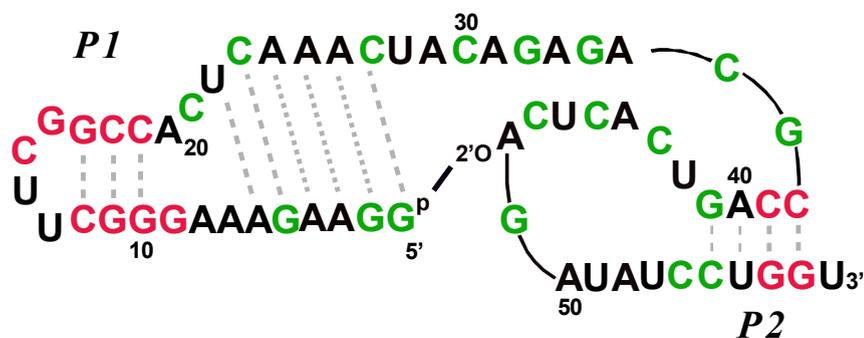
Mit Hilfe der in den Kapiteln 3.2.2.2 bis 3.2.5 beschriebenen NMR-spektroskopischen Experimente ist es möglich, für alle Nukleotide der linearen Form des lariatbildenden Ribozyms die Basen mit den Ribosen zu korrelieren. In der Ribose können 73 Prozent der Wasserstoff- und Kohlenstoffatome zugeordnet werden. Bei den fehlenden Zuordnungen handelt es sich in erster Linie um die C5'- und H5'-Atome, da diese von der spektralen Überlagerung besonders betroffen sind und einige C3'-, H3'-, C4'- und H4'-Resonanzen in dem konformationell austauschenden Bereich des Ribozyms zwischen Nukleotid c30 und u59. Wie bereits in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben, zeigt eine Konformation des linearen Ribozyms keine sequentiellen NOEs. Mit Hilfe der Experimente aus Kapitel 3.2.2.5 können alle Nukleotide des Ribozyms sequentiell zugeordnet werden. In Tabelle 3.2 sind exemplarisch die chemischen Verschiebungen der Nukleotide g10 bis c15 wiedergegeben.

**Tabelle 3.2:** Chemische Verschiebungen in ppm der Nukleotide g10 bis c15 der linearen Form des lariatbildenden Ribozyms.

| Nukleotid | $\delta_{H1'}$ | $\delta_{C1'}$ | $\delta_{H2'}$ | $\delta_{C2'}$ | $\delta_{H3'}$ | $\delta_{C3'}$ | $\delta_{H4'}$ | $\delta_{C4'}$ |
|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| g10       | 5,70           | 89,9           | 4,60           | 72,2           | 4,49           | 70,1           | 4,39           | 79,1           |
| g11       | 5,69           | 89,5           | 4,42           | 72,4           | 4,45           | 69,3           | 4,38           | -              |
| c12       | 5,45           | 90,7           | 4,45           | 72,4           | 4,17           | 68,8           | 4,37           | 78,7           |
| u13       | 5,61           | 91,5           | 3,74           | 72,8           | 4,46           | 70,1           | 4,31           | 79,2           |
| u14       | 6,03           | 86,0           | 4,61           | 71,4           | 3,96           | 74,7           | 4,41           | 83,9           |
| c15       | 5,91           | 85,9           | 4,03           | 74,4           | 4,42           | 77,1           | 3,73           | 81,2           |

| Nukleotid | $\delta_{H5}$ | $\delta_{C5}$ | $\delta_{H6/8}$ | $\delta_{C6/8}$ | $\delta_{N1/9}$ |
|-----------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| g10       | -             | -             | 7,35            | 133,2           | 168,9           |
| g11       | -             | -             | 7,38            | 133,3           | 169,3           |
| c12       | 5,16          | 94,1          | 7,35            | 137,3           | 150,9           |
| u13       | 5,65          | 101,8         | 7,70            | 137,7           | 146,9           |
| u14       | 5,80          | 102,3         | 7,96            | 141,6           | 143,7           |
| c15       | 6,08          | 95,3          | 7,64            | 139,6           | 150,5           |

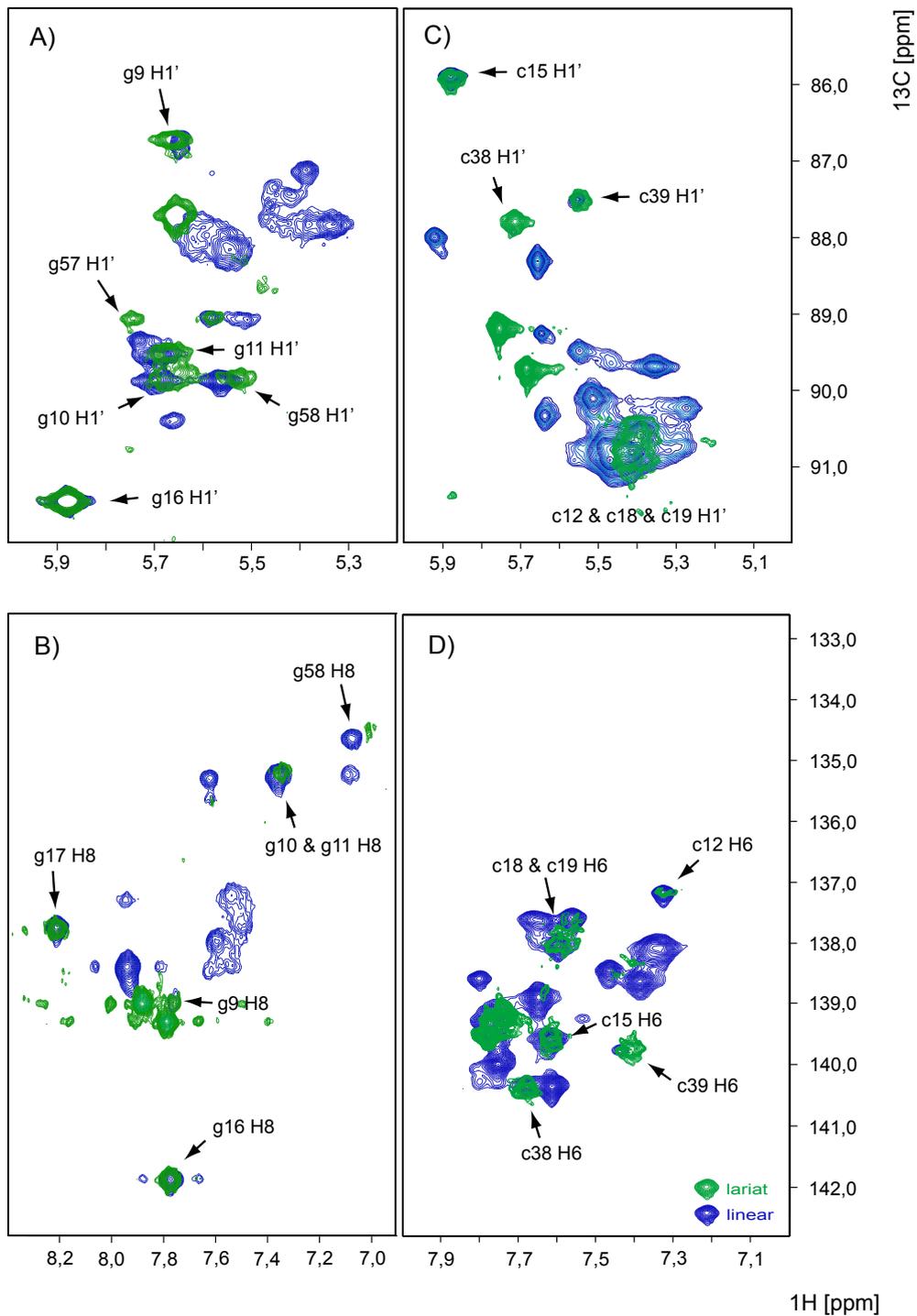
### 3.3 Das Lariat des Ribozyms



**Abbildung 3.25:** Lariat des Ribozyms. In den  $^{13}\text{C}$ -editierten HSQC Spektren der  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierten Cytosin und Guanin Probe sind nur noch die Resonanzen der C1'H1'- und C8H8- beziehungsweise C6H6-Korrelationen der rot markierten Nucleotide sichtbar. Die Resonanzen der grün markierten Nucleotide treten dagegen auch in den  $^{13}\text{C}$ -editierten HSQC Spektren der linearen Form auf.

$^{13}\text{C}$ -editierte HSQCs der C1'H1'- und C6H6- beziehungsweise C8H8-Korrelationen des  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierten Guanosin- und Cytosin-Lariats sind in Abbildung 3.26 dargestellt. Das Lariat wurde aus der linearen Form mittels 30 mM Tris (pH=7,6), 100 mM Kaliumchlorid und 25 mM Magnesiumchlorid gebildet und das Produkt mittels 15% SDS-PAGE-Gel gereinigt. Die Lariatbildung aus dem linearen Ribozym wird dabei durch das Magnesiumchlorid eingeleitet.

In den Spektren des Lariats sind wesentlich weniger Resonanzen sichtbar als in den Spektren des linearen Ribozyms. Die Resonanzen der Nucleotide in den helikalen Bereichen P1 und P2 sowie im *Tetraloop* sind vorhanden, die Signale der Nucleotide in den flexiblen Bereichen allerdings nicht, wie schematisch anhand der Abbildung 3.25 ersichtlich. Die Resonanzen des Lariats unterliegen in diesen Bereichen einem



**Abbildung 3.26:** A)  $^{13}\text{C}$ -editierte HSQCs der Ribose des linearen Ribozyms (blau) und des Lariats (grün) der Guanosine B)  $^{13}\text{C}$ -editierte HSQCs der Base des linearen Ribozyms (blau) und des Lariats (grün) der Guanosine C)  $^{13}\text{C}$ -editierte HSQCs der Ribose des linearen Ribozyms (blau) und des Lariats (grün) der Cytosine D)  $^{13}\text{C}$ -editierte HSQCs der Base des linearen Ribozyms der Cytosine.

Austausch zwischen mehreren Konformationen im mittleren Bereich der kernresonanzspektroskopischen Zeitskala. Deshalb sind die Signale der C1'H1'- und C6H6-beziehungsweise C8H8-Korrelationen nicht sichtbar.

### 3.4 Kristallisation des linearen lariatformenden Ribozyms

Neben der NMR-Spektroskopie ist die Röntgenkristallographie eine zweite leistungsfähige Methode in der Strukturaufklärung. Allerdings ist es gerade bei Biomolekülen nicht immer möglich, Kristalle zu generieren. Dies ist allerdings eine Voraussetzung für dieses Verfahren, da ohne Einkristalle die Röntgenstrahlen mit der Elektronenhülle der Moleküle zu diffus interagieren, um daraus eine hochaufgelöste dreidimensionale Struktur zu erhalten, auch wenn es in den letzten Jahren Fortschritte in der Röntgenstrukturaufklärung an nichtkristallinen Proben gab [113, 114].

Mit einer nicht Isotopen markierten Probe des linearen lariatbildenden Ribozyms wurden Kristallisationsversuche unternommen, um auch über die Röntgenkristallographie einen Einblick in die Struktur dieses RNA-Konstrukts zu erhalten. Die Kristallisationsansätze wurden mit einer Lösung des Ribozyms in einem 10 mM Natriumcacodylat-Puffer pH=6,5 bei Raumtemperatur und 4 °C durchgeführt. Es kam die Verdampfungsdiffusion am sitzenden Tropfen zur Anwendung. Dabei steht ein auf einer Platte sitzender 5  $\mu$ L Tropfen, bestehend aus der Lösung der Probe und einem Reagenz, über den Dampfdruck im Gleichgewicht mit einem 500  $\mu$ L Reservoir, das nur das Reagenz enthält. Durch den Dampfdruck geht das Wasser aus dem Tropfen der Probelösung in das Reservoir über, so dass sich im Tropfen die Konzentration der Probe erhöht und diese auskristallisieren kann [115].

Mit einem Pipettier-Roboter wurden Kristallisationsversuche mit 624 Reagenzien bei Raumtemperatur und 4 °C durchgeführt. Die Reagenzien sind in Anhang B aufgeführt. Unter keiner Bedingung und Temperatur haben sich Kristalle des linearen lariatformenden Ribozyms gebildet. Deshalb ist es schwierig, die Struktur des linearen Ribozyms mit der Röntgenstrukturaufklärung zu bestimmen. So ist die NMR-Spektroskopie in diesem Fall das Mittel der Wahl, um die Struktur des Ribozyms zu ermitteln. Kristallisationsversuche mit dem Lariat des Ribozyms wurden bislang nicht unternommen.



# Kapitel 4

## Diskussion: Das lariatbildende Ribozym

Im aktivierten Komplex B\* des Spleißosoms findet der erste Schritt der Spleißreaktion statt, in der die Exons von den Introns getrennt werden. Dabei bildet sich ein Lariat bestehend aus einem 3'-Exon und Intron sowie ein freies 5'-Exon. Im nun entstandenen Komplex C findet der zweite Schritt der Spleißreaktion statt, in dem die beiden Exons verbunden werden und das Intron als Lariat den Reaktionszyklus verlässt. Die Basenpaarungen und somit die Sekundärstruktur der am Komplex B\* und C beteiligten snRNAs U2, U5 und U6 sowie der prä-mRNA sind bekannt. Die Tertiärstruktur der Komplexe B\* und C konnte jedoch bisher nicht bestimmt werden. Durch permanente Reorganisation des Spleißosoms unterliegt das gesamte System einer enormen Dynamik und daher ist es diffizil, die dreidimensionale Struktur der einzelnen Komplexe des Spleißosoms zu ermitteln.

Tuschl et al. entwickelten 2001 ein Ribozym [1], das vergleichbar dem ersten Schritt der Spleißreaktion ein Lariat bildet. In beiden Systemen wird die Reaktion durch einen Angriff einer 2'-Hydroxylgruppe eines Adenosins auf das Phosphatrückgrat eines Guanosins eingeleitet. In dieser Umesterung bildet sich sowohl im Ribozym als auch im Spleißosom ein Lariat. Des weiteren verfügt das Spleißosom mit der ACAGAGA-Box über eine Sequenz, die essentiell für die Spleißreaktion ist und sich ebenfalls im Ribozym wieder findet. Das Ribozym besteht aus 58 Nukleotiden mit einem Gewicht von 20 kD und stellt damit für Strukturuntersuchungen mit der NMR-Spektroskopie eine Herausforderung dar. Durch die Analogie zwischen dem Ribozym und den am Komplex B\* und C beteiligten snRNAs ist es jedoch erstmals möglich, die strukturelle Reorganisation auf atomarer Ebene zu studieren.

## 4.1 Die Sekundärstruktur des lariatbildenden Ribozyms

Mit NMR-spektroskopischen Untersuchungen und Mutationsstudien, die in Kapitel 3.1 und 3.2.5 erläutert wurden, konnte ein Teil der Sekundärstruktur der linearen Form des lariatbildenden Ribozyms aufgeklärt werden, die bislang unbekannt war. Wie in Abbildung 4.1 ersichtlich, existieren kanonische Watson-Crick-Basenpaarungen zwischen g1 und c27, g5 und c23, a6 und u22, g10 und c19, g11 und c18, c12 und g17, c38 und g58, c39 und g57, a40 und u56 sowie g41 und c55. Nicht kanonische Basenpaarungen befinden sich zwischen g2 und a26, a3 und a25 sowie a4 und a24. In den Sequenzen u29 bis g47 und u42 bis c54 konnten bislang keine Basenpaarungen identifiziert werden.

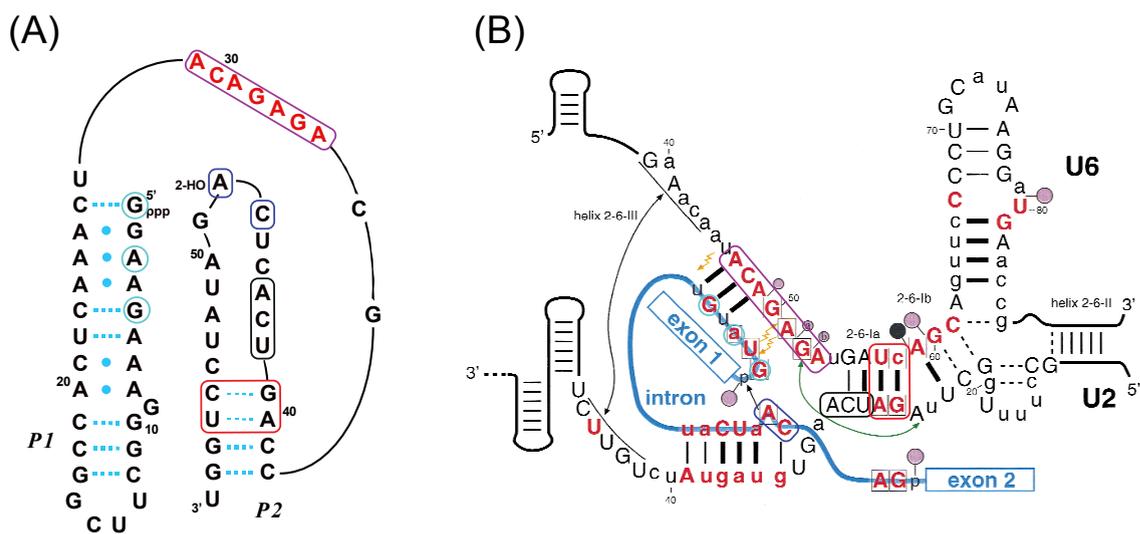
Im Spleißosom geht die ACA-Sequenz der ACAGAGA-Box der U6-snRNA Basenpaarungen mit einer UGU-Sequenz der prä-mRNA ein. Im lariatbildenden Ribozym ist die ACAGAGA-Box ebenfalls essentiell für die Lariatbildung. Es ist allerdings unklar, ob die ACAGAGA-Box an Basenpaarungen im Ribozym beteiligt ist.

Die Sequenz g1 bis a6 des Ribozyms, das analog zu der prä-mRNA am Exon-1 ist, geht Basenpaarungen mit dem Sequenzbereich u22 bis c27, der in 5'-Richtung der ACAGAGA-Box liegt, ein. Dies ist in Abbildung 4.1 (A) dargestellt. Hierbei handelt es sich unter anderem um Basenpaarungen zwischen dem g1 und c27, a3 und a25 sowie g5 und c23. Das Guanosin g9 liegt, wie die Basenaustausch-Experimente gezeigt haben, in einer Auswölbung und ist für die Lariatbildung nicht bedeutsam. Dies wird durch den Mangel an sequentiellen NOEs in den  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{12}\text{C}$ - beziehungsweise  $^{13}\text{C}$ - gefilterten NOESY Spektren bestätigt.

Mutationen in den Regionen mit Basenpaarungen zwischen g1 und a6 sowie u22 und c27, die zu einer Veränderung der Abfolge der Basenpaarung führen, verhindern die Lariatbildung. Wird zum Beispiel durch Mutation die Basenpaarung zwischen g1 und c27 unterbunden und eine Basenpaarung zwischen c2 und g27 eingeführt, wird die Lariatbildung vereitelt. Diese Mutationen haben zur Folge, dass das Phosphatrückgrat des g1 sich nicht mehr in der Nähe des *branchpoint* Adenosins a48 befindet und somit nicht mehr durch dieses attackiert werden kann. Die Abfolge der Basenpaarungen in der Helix ist also für die Lariatbildung essentiell.

Mit Hilfe der Zuordnung der Resonanzen konnte dann eine Reihe von interessanten NOE-Signalen verstanden werden. Zunächst wurde der stabile UUCG-*Tetraloop*

bestätigt. Weiterhin konnten im  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY der Adenosine Kreuzsignale zwischen H2- und H1'(i+1)-Atomen bestimmt werden. Diese Beobachtung weist auf asymmetrische N7 Adenosin-Adenosin-Basenpaarungen hin. Diese nicht kanonischen Basenpaarungen komplementieren das Bild einer ausgebildeten Helix im Segment g1 bis c27 des linearen Ribozyms, das viele Basenpaarungen aufweist und von einem stabilen UUCG-Tetraloop geschlossen wird. Die auftretenden NOEs des Fragments von g1 bis c27 des Ribozyms zeigen, das eine Helix mit einer Auswölbung um das Nukleotid g9 vorliegt. Die Helix ist für die im folgenden Kapitel diskutierte Tertiärstruktur des Ribozyms grundlegend.



**Abbildung 4.1:** (A) Modell des lariatbildenden Ribozyms. Zwischen der Helix P1 und der Sequenz um das a48 könnten Interaktionen bestehen, die das g1 und a48 nebeneinander stellen. (B) Modell des spleißosomalen Komplexes B\*, bestehend aus den snRNAs U2, U5 und U6 sowie der prä-mRNA. In beiden Systemen befindet sich benachbart zum *branchpoint* Adenosin, welches das Phosphatrückgrat eines Guanosins attackiert ein Cytosin. Sowohl das Ribozym als auch die U6-snRNA des Komplexes B\* besitzen eine Sequenz, die ACAGAGA-Box, die im Komplex B\* mit Teilen des Introns interagiert. Im lariatbildenden Ribozym interagiert die ACAGAGA-Box nicht mit dem 5'-Ende des Ribozyms, das demselben Teil des Introns entspricht.

In der Helix-1a des aktivierten Komplexes B\* gibt es zwei kanonische AU- und GC-Basenpaarungen, die die U2- und U6-snRNAs verbinden und so das *branchpoint* Adenosin dem attackierten Phosphatrückgrat eines Guanosins gegenüberstellen. In der Helix P2 des Ribozyms sind ebenfalls zwei kanonische Basenpaarungen vorhanden. Weitere Basenpaarungen im Sequenzbereich u42 bis c54 sind in den NMR-

Spektren nicht sichtbar. Falls es an dieser Stelle zu Basenpaarungen kommt, sind diese im Vergleich zu den zwei Basenpaarungen zwischen c38 und g47 sowie c39 und g48 instabil. Das *branchpoint* Adenosin befindet sich im Komplex B\* in einer Auswölbung [46]. Im lariatformenden Ribozym ist es entweder Teil einer Schleife oder liegt auch in einer Auswölbung vor. Dies zeigt auch die Analyse des *sugar puckers*, die in Kapitel 4.3 besprochen wird.

Das Cytosin c47 in i-1 Position zum *branchpoint* Adenosin a48 geht im spleißosomalen Komplex B\* als Teil der prä-mRNA eine Basenpaarung mit der U2-snRNA ein. Im lariatformenden Ribozym befindet es sich entweder in einer Schleife mit dem a48 oder ist an schwachen Basenpaarungen beteiligt. Die ACU-Sequenz des Ribozyms in 5'-Richtung zum *branchpoint* Adenosin ist im Spleißosom ein Segment der U2-snRNA. Dabei gehen das Cytosin und das Uracil Basenpaarungen mit Nukleotiden der U6-snRNA ein. Im Ribozym konnten für diese Sequenz jedoch keine Basenpaarungen ermittelt werden.

Weiterhin konnte mit Mutationsstudien gezeigt werden, dass das Uracil u28 keine Basenpaarung eingeht. Ein Austausch von u28 gegen c28 führt zu einer Basenpaarung dieses Nukleotides mit g49. Diese Basenpaarung verhindert die Lariatbildung. Es ist wahrscheinlich, dass durch die Basenpaarung die räumliche Anordnung des a48 beeinflusst und so der Angriff auf das Phosphatrückgrat des g1 verhindert wird.

Während zwischen g1 und c27 viele Basenpaarungen im lariatbildenden Ribozym auftreten, beinhaltet der Bereich von u28 bis u59, soweit bislang bekannt, nur die kleine Helix P2, die aus vier Basenpaarungen besteht. In den  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{13}\text{C}$ -selektiven NOESY Spektren treten von c30 bis u59 Austauschsignale auf. Weiterhin lassen die Spektren Aussagen über den Sequenzbereich um die Helix P2 zu. Die Nukleotide a40 und u56 sowie g41 und c55 weisen nur sehr schwache Kreuzsignale in den  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{12}\text{C}$ -gefilterten NOESY Spektren zwischen den H1'-, H2'- und H6/H8(i+1)-Atomen auf. In einer Helix sind diese Signale wesentlich intensiver. Deswegen kann davon ausgegangen werden, dass diese Nukleotide nur sehr schwache Basenpaarungen eingehen.

Das lineare Ribozym liegt ab dem c30 nicht ausschließlich in einer Konformation vor, sondern unterliegt einem konformationellen Gleichgewicht und wechselt mit einer Geschwindigkeit von 112 ms für das *branchpoint* Adenosin a48 zwischen zwei Konformationen. Bis auf die Helix P2 sind in diesem Bereich aufgrund der NMR-Spektren und Mutationsstudien keine Basenpaarungen sichtbar. Dies spricht für eine enorme strukturelle Flexibilität des Systems und könnte eine Voraussetzung für das

Ribozym sein, die Spleißreaktion durchführen zu können. Damit ähnelt das Ribozym auch dem eukaryontischen Spleißosom, das im Komplex B\* und C sehr dynamisch ist.

Eine Konformation zeigt in den  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{12}\text{C}$ -selektiven NOESY Spektren, mit denen, wie in Kapitel 3.2.2.5 beschrieben, die sequentielle Zuordnung des Ribozyms durchgeführt wurde, keine Kreuzsignale. Die fehlenden sequentiellen NOEs deuten darauf hin, dass eine der beiden Konformationen des linearen Ribozyms strukturell so mobil ist, dass sie keine gut ausgebildete Tertiärstruktur annimmt und deshalb keine Kreuzsignale aufweist. Welche der beiden Konformationen die katalytisch aktive ist, kann durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht ermittelt werden.

Durch den konformationellen Austausch sind in den NMR-Spektren für 29 Nukleotide zwei Resonanzen anstatt einer für jedes  $^{13}\text{C}$ -,  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}$ -Atom sichtbar. Dadurch wird die Überlagerung der Resonanzen in den einzelnen Spektren verschärft. Die Zuordnung der einzelnen Signale zu den Atomen ist aus diesem Grund nur mit Hilfe von unterschiedlichen Proben möglich, in denen jeweils nur eines der Nukleotide Adenosin, Cytosin, Guanosin oder Uracil  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Isotopen markiert ist. Dessen ungeachtet ist in diesen Spektren die Überlagerung noch immer immens und die Zuordnung somit sehr anspruchsvoll.

## 4.2 Die Tertiärstruktur des lariatbildenden Ribozyms

Die Tertiärstruktur basiert auf der Sekundärstruktur des Ribozyms. Die unterschiedlichen Motive wie Helices und Auswölbungen interagieren miteinander und formen so eine dreidimensionale Struktur. Für die Untersuchung der Tertiärstruktur sind NOE-Signale zwischen Nukleotiden, die nicht sequentiell miteinander verbunden sind, relevant.

NOE-Kreuzsignale zwischen den Nukleotiden am 5'-Ende des Ribozyms mit Nukleotiden um das *branchpoint* Adenosin zeigen die Nähe des a48 zum Triphosphat am 5'-Ende der Sequenz. Auch die Mutationsstudien haben gezeigt, dass die Basenpaarungen am 5'-Ende des Ribozyms wichtig sind, damit die 2'-Hydroxylgruppe des a48 die nukleophile Substitutionsreaktion durchführen kann.

Es existieren ebenfalls Kreuzsignale zwischen a50, a52 und a3, a4, a25 sowie a26 im  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY Spektrum der  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierten

Adenosin Probe. Diese Signale weisen darauf hin, dass diese Nukleotide miteinander interagieren, obwohl sie zu unterschiedlichen Bereichen des Ribozyms gehören. Die Adenosine a3, a4, a25 und a26 sind Teil der Helix P1. Die Nukleotide a50 und a52 gehören zu einer Sequenz, für die keine Basenpaarungen ermittelt werden konnten.

In Abbildung 4.1 ist ein Modell des Ribozyms dargestellt. Die NOE-Signale weisen auf die Nähe der verlängerten Helix P1 zu der Sequenz g49 bis a52 hin. Dies bringt das *branchpoint* Adenosin in die Nähe des Phosphatrückgrats des g1 und erlaubt so den Angriff der 2'-Hydroxylgruppe des a48 auf das 5'-Phosphat des g1 und die Ausbildung des Lariats.

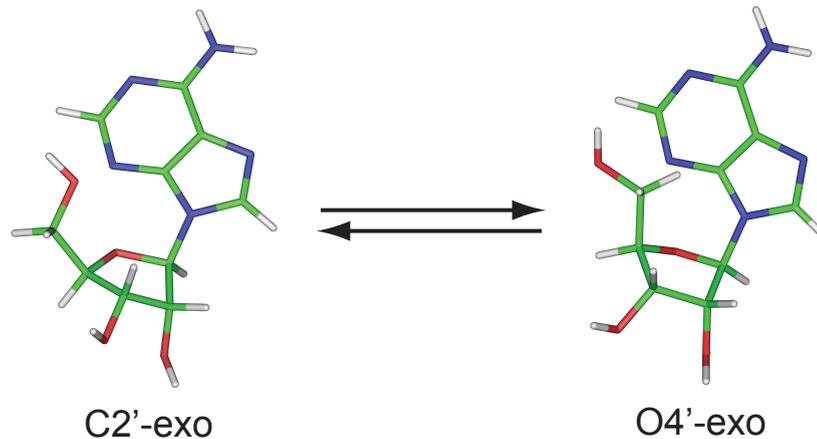
Die Zuordnung der Signale in der ACAGAGA-Box ist durch deren Überlagerung diffizil. Auch der auftretende konformationelle Austausch erschwert die Zuordnung. Dadurch ist die Interpretation der NOE-Kreuzsignale der ACAGAGA-Box kompliziert. Das Motiv ist im Spleißosom für den ersten Schritt der Spleißreaktion essentiell. Die Mutationsstudien am Ribozym haben gezeigt, dass für c30 bis g32 ein Basenaustausch gegen alle anderen Nukleotide toleriert wird. Die ACAGAGA-Box scheint für die Spleißreaktion im Ribozym nicht unerlässlich zu sein.

### 4.3 Das *branchpoint* Adenosin a48 des lariatbildenden Ribozyms

Im spleißosomalen Komplex B\* befindet sich das *branchpoint* Adenosin a48 in einer Auswölbung. Dies ist wesentlich für die Spleißreaktion [46]. Im lariatformenden Ribozym befindet sich das a48 in einer Schleife oder Auswölbung. Die Ribosenkonformation des angreifenden Adenosins ist unbekannt, ist aber für die Ausführung der Spleißreaktion essentiell. Im Folgenden sollen daher die bisher erzielten Erkenntnisse bezüglich des *sugar puckers* aufgezeigt werden.

Die chemische Verschiebung der C2'- und H2'-Atome betragen  $\delta_{C2'} = 80,2$  ppm und  $\delta_{H2'} = 5,3$  ppm. Die Ribose liegt also nicht in der C3'-endo-Konformation oder einem konformationellen Gleichgewicht zwischen C3'-endo- und C2'-endo-Konformation vor. Die chemischen Verschiebungen der C2'- und H2'-Atome deuten auf eine C2'-endo-Konformation hin [90], allerdings müssten die  $J_{H1',H2'}$ -Kopplungen in dieser Konformation groß sein (ca. 7,0 Hz bis 9,0 Hz) [97]. Die  $J_{H1',H2'}$ -Kopplungen betragen jedoch lediglich 1,4 Hz. Damit ist die C2'-endo-Konformation ebenfalls ausgeschlossen. In der O1'-exo-, C1'-endo- oder C2'-exo-Konformation liegen die  $J_{H1',H2'}$ -Kopplungen ebenfalls zwischen 1,0 Hz und 2 Hz. Die Kopplungen und che-

mischen Verschiebungen deuten darauf hin, dass sich der *sugar pucker* des a48 innerhalb eines Pseudorotationswinkels [104] von  $P = 260^\circ$  bis  $360^\circ$  bewegt. Die Ribose nimmt somit die O1'-exo-, C1'-endo- oder C2'-exo-Konformation ein, wie in Abbildung 4.2 dargestellt.



**Abbildung 4.2:** Die Ribose des *branchpoint* Adenosins liegt entweder in der O1'-exo-, C1'-endo- oder C2'-exo-Konformation vor.

Die Konformation der Ribose des *branchpoint* Adenosins in der prä-mRNA des Spleißosoms ist unbekannt. Es existiert jedoch eine Kristallstruktur eines Modells bestehend aus einem U2-snRNA Duplex mit jeweils einem Adenosin des komplementären Stranges in einer Auswölbung. Die Ribose eines Adenosins in der Auswölbung liegt in der C3'-endo-Konformation vor, die Ribose des anderen Adenosins in der C2'-endo-Konformation [119]. Auch in einem Protein-RNA-Komplex der Hülle des Bakteriophagen MS2 wurde ein Adenosin der RNA in einer Auswölbung untersucht, das analog dem U2-snRNA Duplex ist. Hier ist die Ribose in der C3'-endo-Konformation vorzufinden [120]. In beiden Strukturen weist die Ribose einen *sugar pucker* auf, der häufig in Auswölbungen und Helices von RNA zu finden ist. Es kann daraus jedoch nicht geschlossen werden, dass das *branchpoint* Adenosin der prä-mRNA auch eine dieser Konformationen aufweist, ist doch keine der strukturell charakterisierten RNAs in der Lage, eine Umesterungsreaktion einzugehen.

Die Untersuchungen an der linearen Form des lariatbildenden Ribozyms deuten vielmehr darauf hin, dass die Ribose des a48 eine außergewöhnliche Konformation für die Ribose mit Pseudorotationswinkeln von  $260^\circ$  bis  $360^\circ$  einnimmt. Es ist anzunehmen, dass diese Konformation für die Umesterungsreaktion zum Lariat essentiell ist. Um den *sugar pucker* des linearen Ribozyms zu verifizieren, ist es auch interessant, die Konformation der Ribose des Lariats zu untersuchen.

Der *sugar pucker* der Ribose wird ebenfalls durch die Konformation des Phosphatrückgrats beeinflusst. Der Winkel  $\epsilon$  des Phosphatrückgrats kann durch  $J_{P,H3'}$ - und  $J_{P,H5'}$ -Kopplungen bestimmt werden. Die  $J_{g49P,a48H3'}$ -Kopplungen sind, wie in Kapitel 3.2.4 dargestellt, klein, die  $J_{P,H5'}$ -Kopplungen größer. Dies impliziert, dass der Dihedralwinkel  $\epsilon$  bei ca.  $160^\circ$  oder  $320^\circ$  liegt. Nukleotide in A-Form Helix weisen in der Regel Dihedralwinkel  $\epsilon$  im Phosphatrückgrat von  $190^\circ$  bis  $230^\circ$  auf. In Auswölbungen liegen die Dihedralwinkel  $\epsilon$  zwischen  $260^\circ$  bis  $280^\circ$ . Auch die Adenosine in den Auswölbungen des bereits beschriebenen U2-snRNA Duplexes und Protein-RNA-Komplexes der Hülle des Bakteriophagen MS2 weisen Dihedralwinkel  $\epsilon$  von  $190^\circ$  bis  $260^\circ$  auf [119, 120]. Da die Ribose des a48 im lariatformenden Ribozym allerdings einen anderen *sugar pucker* einnimmt als im Duplex und Protein-RNA-Komplex, ist es möglich, dass die Ribose auch unterschiedliche Phosphatrückgratwinkel aufweist.

## 4.4 Das Lariat des lariatbildenden Ribozyms

Die  $^{13}\text{C}$ -editierten HSQC Spektren der Proben, in denen die Guanosine oder Cytosine  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Isotopen markiert sind, sind in Kapitel 3.3 in Abbildung 3.26 dargestellt. In den Spektren des Lariats sind weniger Resonanzen sichtbar als in den Spektren des linearen Ribozyms. Die Signale der C1'H1'- und C6H6- beziehungsweise C8H8-Korrelationen der Nukleotide in der Helix P1 und dem UUCG-*Tetraloop* erscheinen in beiden Konstrukten bei vergleichbaren chemischen Verschiebungen. Die Resonanzen der anderen Guanosine treten in den  $^{13}\text{C}$ -editierten HSQCs nur noch eingeschränkt auf. Ein großer Teil des Lariats liegt somit in einem Austausch zwischen verschiedenen Konformationen auf einer Zeitskala von Mikro- bis Millisekunden vor. Die Linien der Signale sind in der Koaleszenztemperatur so breit, dass die Resonanzen im Spektrum nicht mehr sichtbar sind. Das Lariat des Ribozyms ist demzufolge wesentlich flexibler als die lineare Form. Eine stabile verlängerte Helix P1 ist im Lariat nicht mehr vorhanden. Dies wird auch die Tertiärstruktur des Ribozyms beeinflussen. Die Tertiärstruktur des Ribozyms verändert sich dementsprechend nach der Reaktion zum Lariat erheblich.

# Kapitel 5

## Einleitung: Die 2'-Hydroxylgruppe in der RNA

Die RNA übernimmt in der Proteinbiosynthese - Transkription und Translation - die unterschiedlichsten Aufgaben. mRNA dient als Duplikat der DNA zur Informationsweitergabe. In Form der tRNA fungiert sie bei der Proteinbiosynthese als Bindeglied, indem sie eine Aminosäure koordiniert und parallel das Anticodon der mRNA bildet [121]. Aber auch katalytisch spielt die RNA eine große Rolle [122]. Ribozyme sind in der Lage, RNA katalytisch zu spalten [123] und auch im Spleißosom, in dem nicht kodierende mRNA Sequenzen von den kodierenden Sequenzen abgespalten werden, ist das katalytische Zentrum aus RNAs, den snRNAs, aufgebaut [124]. In der Genregulation durch RNA-Interferenz (RNAi) gehen einzelsträngige siRNAs (*small interfering-RNAs*) oder miRNAs (**micro**-RNAs), die in der Regel circa 21 Nukleotide lang sind, mit der prä-mRNA Basenpaarungen ein. Dies führt über unterschiedliche Mechanismen zu einer Blockade der Translation [125].

Im Gegensatz zu Proteinen sind die RNAs nur aus vier unterschiedlichen Bausteinen, den Nukleotiden mit den Basen Adenin, Guanotin, Cytosin und Uracil, aufgebaut. Dennoch sind sie in der Lage, trotz ihres einfachen Aufbaus, diese Vielzahl an Aufgaben wahrzunehmen. Die RNA, die sich von der DNA konstitutionell nur durch das Fehlen der 5-Methylgruppe in der Base Uracil und einer Hydroxylgruppe anstatt eines Wasserstoffatoms in der 2'-Position der Pentose unterscheidet, weist in der Sekundärstruktur gewaltige Unterschiede auf. Die DNA liegt in einer Helix der B-Form vor und wird hauptsächlich in den Chromosomen zur Informationsspeicherung verwendet, während die RNA mit einer Vielzahl von Sekundärstrukturen wie Helices, Auswölbungen, Schleifen und Kreuzungen die unterschiedlichsten Aufgaben in der

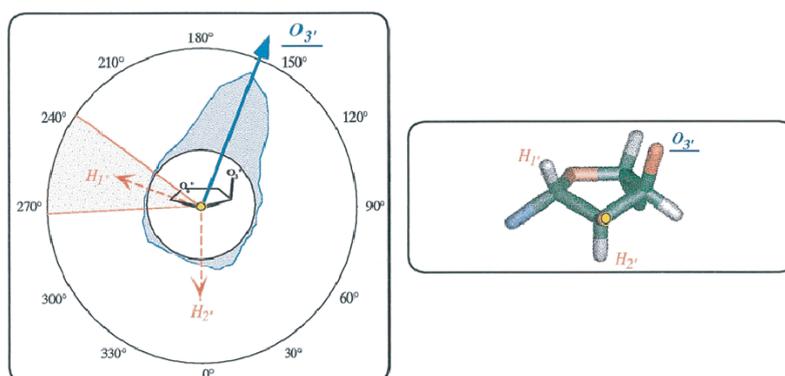
Zelle wahrnehmen kann. Diese Strukturen werden von einem Netzwerk an Wasserstoffbrücken, an denen die 2'-Hydroxylgruppe beteiligt ist, stabilisiert [117, 126–129].

Die Hydroxylgruppe in der 2'-Position der Ribose ist somit die Basis für die strukturelle Vielfalt in der RNA und demzufolge auch für alle wichtigen Prozesse der RNA verantwortlich. Beim Spleißen der prä-mRNA im Spleißosom, auf das in Kapitel 1 näher eingegangen wurde oder bei selbstspleißenden Gruppe-II Introns wird der Prozess durch eine Umesterungsreaktion mit Hilfe der 2'-Hydroxylgruppe bewerkstelligt [24, 130–133]. Auch bei der Spaltung von Ribonukleinsäuren durch das *Hammerhead* (HH)-Ribozym wird der Prozess durch einen Angriff der 2'-Hydroxylgruppe eingeleitet [134]. Die 2'-Hydroxylgruppe ist ebenfalls an Protein-RNA Wechselwirkungen beteiligt [135]. Insofern ist es interessant, die Konformation dieser funktionellen Gruppe zu bestimmen, um die Reaktionsabläufe besser verstehen zu können [136].

## 5.1 Die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe in der RNA

Die 2'-Hydroxylgruppe der RNA ist für die strukturellen und katalytischen Unterschiede zwischen der RNA und DNA verantwortlich [137, 138]. Mit Moleküldynamik-Simulationen (MD) [139], der Röntgenstrukturanalyse [140] und der nuklearmagnetischen Resonanzspektroskopie [141] konnten bislang erste Präferenzen der Konformation der 2'-Hydroxylgruppe gefunden werden, doch war es bislang nicht möglich, die Konformation dieser wichtigen funktionellen Gruppe genau zu bestimmen.

In MD-Simulationen konnte von Auffinger et al. 1997 gezeigt werden, dass die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe von der Konformation der Ribose beeinflusst wird [139]. Wie in den Abbildungen 5.1 und 5.2 ersichtlich, nimmt die 2'-Hydroxylgruppe in den MD-Simulationen, je nachdem ob sich die Ribose in der C2'-endo- oder C3'-endo-Konformation befindet, unterschiedliche Vorzugskonformationen ein. In helikalen Bereichen liegt die RNA in der A-Form vor. In dieser Form bevorzugt die Ribose die C3'-endo-Konformation, während in unstrukturierten Bereichen wie Schlaufen und Auswölbungen die Ribose entweder in einem konformationellen Gleichgewicht zwischen der C2'-endo- und C3'-endo- oder ausschließlich in der C2'-endo-Konformation vorliegt.

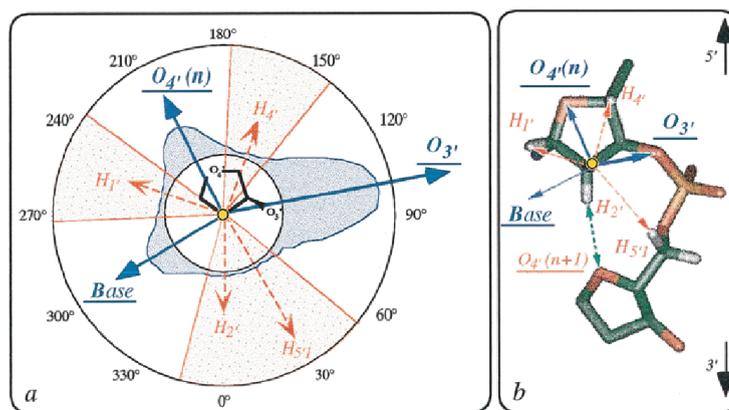


**Abbildung 5.1:** Konformationen der 2'-Hydroxylgruppe (gelb) mit der Ribose in der C2'-endo-Konformation; in blau ist die bevorzugte Orientierung der 2'-Hydroxylgruppe in Richtung des O3'-Atoms, in rot die ungünstige Orientierung in Richtung des H1'- und H2'-Atoms dargestellt [139].

Liegt die Ribose in der C2'-endo-Konformation vor, besitzt die 2'-Hydroxylgruppe nur eine bevorzugte Konformation in Richtung des O3'-Atoms des Phosphatrückgrats. Konformationen, in denen die 2'-Hydroxylgruppe in Richtung des H1'- und H2'-

Atoms zeigt, sind aus sterischen Gründen ungünstig. Dies ist in Abbildung 5.1 veranschaulicht [139].

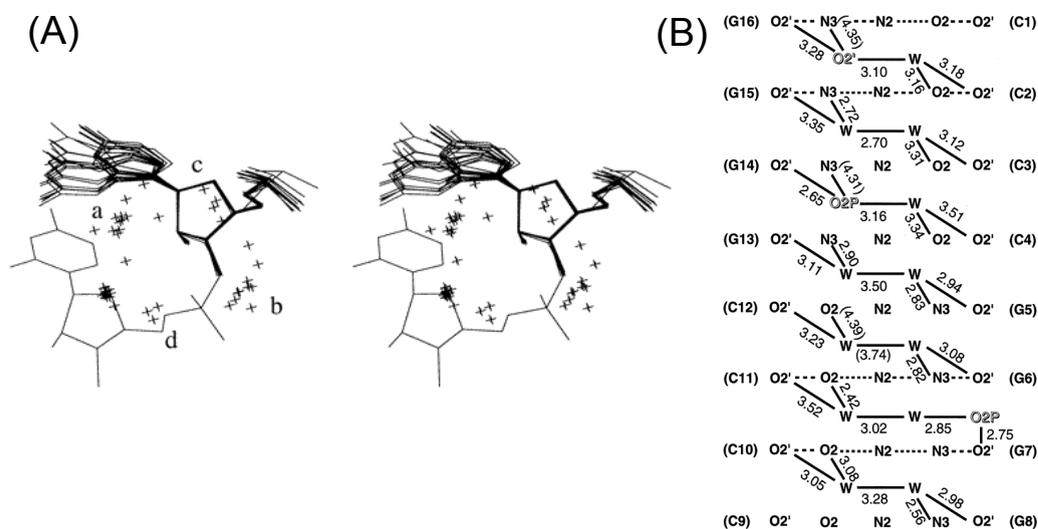
Solange die Ribose in der C3'-endo-Konformation vorliegt, zeigt die 2'-Hydroxylgruppe bevorzugt in Richtung des O4'-, O3'- oder N3- beziehungsweise O2-Atoms der eigenen Base. Dies ist in Abbildung 5.2 dargestellt. Mit diesen Atomen kann die 2'-Hydroxylgruppe elektrostatische Interaktionen eingehen. Es liegen auch drei konformationelle Bereiche vor, die von der 2'-Hydroxylgruppe aus sterischen Gründen gemieden wird, da die Wasserstoffatome H1', H4', und H5' nur in einer Entfernung von ca. 2,5 Å, 2,6 Å und 2,7 Å zum O2'-Atom liegen.



**Abbildung 5.2:** Konformation der 2'-Hydroxylgruppe der Ribose in der C3'-endo-Konformation der RNA; in blau sind die bevorzugten Bereiche, in rot die ungünstigen Bereiche des 2'OH-Atoms dargestellt. In ihrer bevorzugten Orientierung zeigt die 2'-Hydroxylgruppe in Richtung O3'-, O4'-Atom oder Base. Ungünstig sind die Konformationen, in denen die 2'-Hydroxylgruppe in Richtung des H1'-, H2'-, H4'- oder H5'-Atoms zeigt [139].

In einer A-Form Helix der RNA ist es auch möglich, in der kleinen Furche ein durch die 2'-Hydroxylgruppe vermitteltes Wassernetzwerk zu beobachten. Egli et al. haben 1996 die Kristallstruktur eines Oktamer-Duplexes (CCCCGGGG)<sub>2</sub> mit einer Auflösung von 1,46 Å gelöst [140]. In dieser Struktur konnte über die Elektronendichte in der kleinen Furche eine Kette von Wassermolekülen identifiziert werden, die sich parallel zur Helix befinden und in der zwei 2'-Hydroxylgruppen der komplementären Stränge durch zwei Wassermoleküle überbrückt werden. Dies ist in Abbildung 5.3 ersichtlich, in der die Wasserbrücken schematisch dargestellt sind.

Neben den MD-Simulationen und der Röntgenstrukturanalyse wurde die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe auch mit der NMR-Spektroskopie untersucht [142]. Erstmals haben Lynch et al. 1996 einige chemische Verschiebungen der 2'-Hydroxylgruppen einer *hairpin*-RNA zuordnen können [143]. Die erste vollständige Zuord-



**Abbildung 5.3:** (A) In diesem Stereobild ist die Struktur des RNA-Oktamers dargestellt, in dem die Wassermoleküle über ihre Elektronenverteilung identifiziert werden konnten. (B) Schematische Darstellung des Netzwerks der Wassermoleküle in der longitudinalen Ebene des RNA-Oktamers. Der Abstand zwischen den einzelnen Atomen beziehungsweise Wassermolekülen (W) ist in Ångström angegeben. Die 2'-Hydroxylgruppen sind für den Aufbau des Netzwerkes aus Wassermolekülen essentiell [140].

nung der 2'-Hydroxylgruppen einer RNA mit dreißig Nucleotiden, der TAR (**T**at **A**ctivation **R**esponse **R**egion)-RNA aus HIV (**H**uman **I**mmundeficiency **V**irus)-II, wurde 2005 von Hennig et al. veröffentlicht [136]. Die chemischen Verschiebungen der 2'-Hydroxylgruppen liegen in einem Bereich zwischen 6,6 ppm und 7,1 ppm und wurden bei 5°C (278 K) mit Hilfe von 2D-TOCSY Spektren, in denen die Korrelationen der 2'-Hydroxylgruppen mit den H2'-Atomen und 2D-NOESY Spektren, in denen die Resonanzen der 2'-Hydroxylgruppen mit den H1'-Atomen sichtbar sind, zugeordnet. In Abbildung 5.4 sind die beiden Spektren dargestellt.

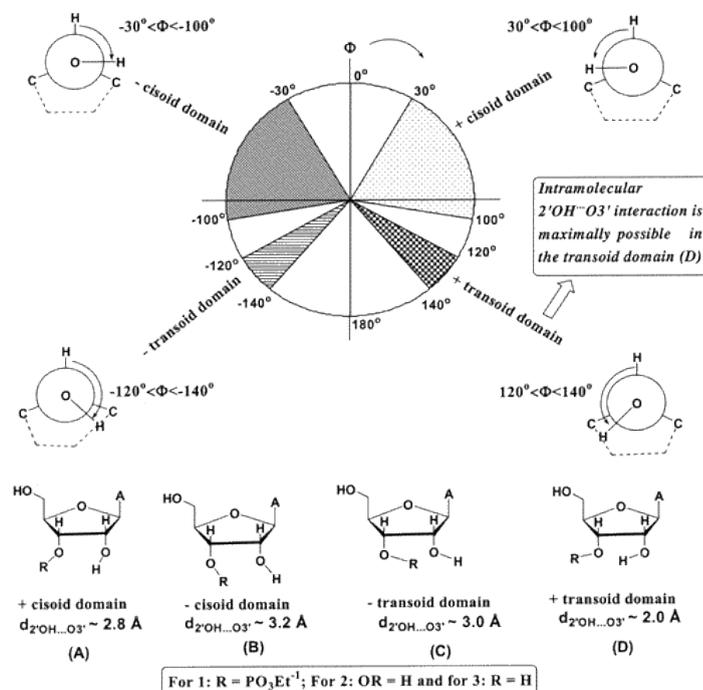
## 5.2 Die skalaren Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe

Die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe der RNA kann mit Hilfe der  $^3J$ -Kopplungen zu den C1'-, C3'- und H2'-Atomen bestimmt werden. Die homonukleare  $^3J$ -Kopplung der 2'-Hydroxylgruppe mit dem H2'-Atom wurde bereits 2002 an Adenosin von Acharya et al. bestimmt. Die Messung erfolgte in deuteriertem DMSO, da hier die



**Tabelle 5.1:** Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe einzelner Nukleosidtriphosphate (NTPs) mit Kohlenstoffatomen der Ribose, die in deuteriertem DMSO gemessen wurden [143].

|     | Adenosin | Cytosin | Guanosin | Uridin |
|-----|----------|---------|----------|--------|
| C1' | 3,7      | ~ 3,2   | 4,0      | 3,7    |
| C2' | -2,3     | ~ -3,0  | -2,5     | -2,2   |
| C3' | 2,2      | ~ 1,7   | 2,1      | 2,4    |



**Abbildung 5.5:** Die 2'-Hydroxylgruppe in Adenosin, 3'-Desoxyadenosin und Adenosin-3-Ethylphosphat nimmt in ihrer Konformation bevorzugt vier Domänen ein, die hier mit +cisoid ( $30^\circ$  bis  $100^\circ$ ), +transoid ( $120^\circ$  bis  $140^\circ$ ), -transoid ( $-120^\circ$  bis  $-140^\circ$ ) und -cisoid ( $-30^\circ$  bis  $-100^\circ$ ) bezeichnet werden [142].

Diese kann bei vorgegebenen Dihedralwinkeln von Modellsubstanzen aus den gemessenen Kopplungen [144] oder theoretisch mit DFT (Dichtefunktional Theorie)-Kalkulationen bestimmt werden [145, 146]. Die Karplus-Kurve für die homonukleare  $^3J_{2'OH,H2'}$ -Kopplung der 2'-Hydroxylgruppe wurde 1969 von Fraser et al. experimentell bestimmt [147].

$${}^3J_{2'OH,H2'} = 10, 4\cos^2\Phi + 1, 5\cos\Phi + 0, 2^3 \quad (5.1)$$

Für die heteronuklearen  ${}^3J_{2'OH,C1'/C3'}$ -Kopplungen existierten bisher keine Karplus-Beziehungen. Um die mit der NMR bestimmten  ${}^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe der TAR-RNA aus HIV-II auswerten zu können, sind diese allerdings essentiell [141].

### 5.3 Theorie der skalaren Kopplung

Die Spin-Spin-Kopplung oder auch  $J$ -Kopplung wird über eine Wechselwirkung der Elektronen vermittelt. Der Tensor der Spin-Spin-Kopplung  $G$  zweier Atomkerne kann über die zweite Ableitung des elektronischen Potentials der  $\sigma$ -Elektronen beschrieben werden [148]. Für die Elemente dieses Tensors zweiten Ranges gilt:

$$G_{KL} = \left. \frac{d^2 E(M_1, M_2, \dots)}{dM_K dM_L} \right|_{M_K=M_L=0} \quad (5.2)$$

$E(M_1, M_2, \dots)$  ist die elektronische Energie des kompletten Systems in Bezug auf das magnetische Moment  $M$  der Kerne  $K$  und  $L$ . Die Spin-Spin-Kopplung  $J$  ergibt sich aus dem Tensor der Kopplung  $G$  über:

$$J_{KL} = h \frac{\gamma_K}{2\pi} \frac{\gamma_L}{2\pi} G_{KL} \quad (5.3)$$

Dieser Zusammenhang wurde erstmals von Ramsey et al. 1953 gezeigt [149]. In einer nicht relativistischen Darstellung ergibt sich die  $J$ -Kopplung aus folgenden Übergangsmomenten:

$$J_{KL} = h \frac{\gamma_K \gamma_L}{(2\pi)^2} \left( \langle 0 | h_{KL}^{DSO} | 0 \rangle - 2 \sum_{n_S \neq 0} \frac{\langle 0 | h_K^{PSO} | n_S \rangle \langle n_S | (h_L^{PSO})^T | 0 \rangle}{E_{n_S} - E_0} \right) \quad (5.4a)$$

$$- 2 \sum_{n_T} \frac{\langle 0 | h_K^{FC} + h_K^{SD} | n_T \rangle \langle n_T | (h_L^{FC})^T + (h_L^{SD})^T | 0 \rangle}{E_{n_T} - E_0} \quad (5.4b)$$

Die Spin-Spin-Kopplung setzt sich aus vier verschiedenen Hamilton-Operatoren zusammen, die in Gleichung 5.5 bis 5.8 beschrieben werden: den diamagnetischen (DSO) und paramagnetischen Spin-Orbit (PSO) Operator sowie den Fermi-Kontakt-(FC) und Spin-Dipol (SD) Operator. Dabei wird über alle elektronisch angeregten Singulett-Zustände  $n_s$  mit der Energie  $E_{n_s}$  und alle Triplett-Zustände  $n_T$  mit der Energie  $E_{n_T}$  summiert [150, 151].  $\gamma_K$  entspricht dem gyromagnetischen Verhältnis

des Kerns K,  $\gamma_L$  dem gyromagnetischen Verhältnis des Kerns L.  $h$  ist das Plancksche Wirkungsquantum.

$$h_{KL}^{DSO} = \alpha^4 \sum_i \frac{(r_{iK}^T r_{iL} I_3 - r_{iK} r_{iL}^T)}{(r_{iK}^3 r_{iL}^3)} \quad (5.5)$$

$$h_K^{PSO} = -i\alpha^2 \sum_i \frac{(r_{iK} \times \nabla_i)}{(r_{iK}^3)} \quad (5.6)$$

$$h_K^{FC} = \frac{8\pi\alpha^2}{3} \sum_i \delta(r_{iK}) s_i \quad (5.7)$$

$$h_K^{SD} = \alpha^2 \sum_i \frac{(3r_{iK}^T s_i r_{iK} - r_{iK}^2 s_i)}{(r_{iK}^5)} \quad (5.8)$$

$\alpha$  ist die Feinstruktur-Konstante,  $r$  die Position des Elektrons  $i$  relativ zum Kern K,  $I_3$  ist die 3x3 Einheitsmatrix,  $\delta(r_{iK})$  ist die Diracsche Delta Funktion und  $s_i$  der Spin des Elektrons  $i$ . Ein hochgestelltes T symbolisiert eine Transposition des Vektors. In den Gleichungen 5.5 bis 5.8 wird über alle Elektronen summiert.

Die Operatoren der DSO- und PSO-Terme der Gleichungen 5.5 und 5.6 sind Singulett-Operatoren, die das magnetische Moment der Kerne mit der Bewegung der Elektronen in den Orbitalen korrelieren, während die FC- und SD-Terme der Gleichungen 5.7 und 5.8 auf Triplett-Operatoren basieren, die das magnetische Moment der Kerne mit den Spins der Elektronen verbinden. In die DSO und PSO Operatoren gehen die Abstände der Atomkerne zu den Elektronen mit der zweiten Potenz im Nenner ein. Dadurch führen große Abstände zu kleinen Kopplungen. In vielen Fällen wird die isotrope  $J$ -Kopplung am stärksten durch den FC Operator beeinflusst, da dieser Anteil der Kopplung einen großen Vorfaktor mit  $\frac{8\pi}{3}$  enthält. Für die FC-Wechselwirkung ist allerdings eine genaue Beschreibung der elektronischen Aufenthaltswahrscheinlichkeit um den Atomkern essentiell. Dies erfordert in vielen Berechnungen große Basissätze von Gaussfunktionen.

Der anisotrope Anteil der  $J$ -Kopplung, der bei Messungen mit NMR in Lösung allerdings keine Rolle spielt, wird am stärksten durch den kombinierten FC- und SD-Anteil beeinflusst. Gerade bei  $^1J$ -Kopplungen spielen die DSO-, PSO- und SD-Operatoren nur eine untergeordnete Rolle, können allerdings bei Spin-Spin-Kopplungen über mehrere Bindungen nicht vernachlässigt werden.

In DFT-Berechnungen werden über einen kombinierten numerischen und analytischen Ansatz, der **F**inite **P**erturbation **T**heory (FPT) genannt wird [152, 153], die Terme für die Operatoren der  $J$ -Kopplung gelöst. Die Elektronen werden dabei mit einem Satz an Gaussfunktionen beschreiben. Mit den heute zur Verfügung stehenden

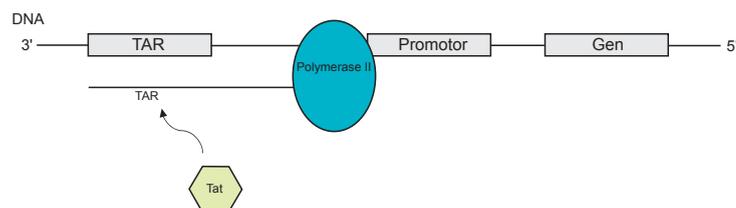
Methoden ist es dadurch möglich, die  $J$ -Kopplung zwischen zwei Spins theoretisch zu ermitteln.

## 5.4 TAR-RNA

Die Untersuchung der Konformation der 2'-Hydroxylgruppe mit der NMR-Spektroskopie erfolgt in dieser Arbeit an einem Abschnitt einer RNA, der TAR (**T**at **A**ctivation **R**esponse **R**egion)-RNA, auf die in diesem Kapitel näher eingegangen werden soll. Die TAR-RNA spielt bei der Replikation der HI (**H**uman **I**mmundeficiency)-Viren eine Rolle [154, 155].

Der Zyklus der HI-Viren Replikation lässt sich in zwei Phasen einteilen. Nach dem Eindringen des Virus in eine eukaryontische Zelle wird in einer inversen Transkription das Erbgut des Virus in das Erbgut der Zelle integriert. Anschließend beginnt sich der Virus über die zelleigene Transkription und Translation zu replizieren. Dabei nutzt er sowohl die Regulation durch die Zelle als auch die Regulation durch Mechanismen, die auf seinem eigenen Erbgut beruhen [156, 157].

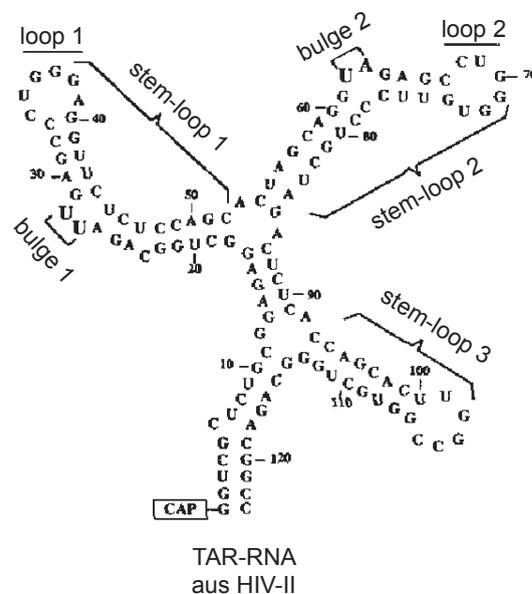
Die Transkription der HI-Viren wird vorrangig durch das virale Tat-Protein (**T**ranscriptional **A**ctivator) reguliert [158]. Die Regulation erfolgt nicht bei der Initiation der Transkription, sondern erst bei der Elongation. Wie in Abbildung 5.6 dargestellt, wird die mRNA über den Promotor hinaus nur verlängert, wenn das Tat-Protein an einen Teil der mRNA bindet, der vor dem Promotor kodiert wird. Ansonsten kommt es zu keiner signifikanten Verlängerung der mRNA durch die Polymerase II [159]. Das Tat-Protein aktiviert somit die Transkription, indem es an das TAR am 5'-Ende der mRNA bindet. Neben dem TAR/Tat-Komplex werden zur Stabilisation und Weiterführung der Transkription durch die Polymerase II noch die menschlichen Proteine CyclinT und CDK9 benötigt [160, 161]. Die TAR-RNA von



**Abbildung 5.6:** Schema der Transkription eines HIV-Gens. Bindet das Tat-Protein an die TAR-RNA, kommt es zu einer Elongation der Transkription über den Promotor hinaus. Die Transkription wird jedoch gestoppt, sollte es zu keiner Aktivierung der Polymerase II kommen.

HIV-I und HIV-II unterscheiden sich. Die TAR-RNA aus HIV-I besteht aus 43 Nu-

kleotiden. Die Bindung zum Tat-Protein erfolgt über die trinukleotide Auswölbung. Die TAR-RNA aus HIV-II besteht aus 123 Nukleotiden, die drei *hairpin*-Strukturen [162], wie in Abbildung 5.7 gezeigt, ausbildet. Die Bindung an das Tat-Protein erfolgt über die als *stem-loop* 1 und 2 bezeichneten Regionen. Beide Regionen können unabhängig voneinander an das Tat-Protein binden [163]. In HIV-II erfolgt die Bindung des Proteins im *stem-loop* 1 vor allem im Bereich des dinukleotiden *bulge* 1 der TAR-RNA. Hier kommt es zu Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der Guanidingruppe eines Arginins des Tat und dem Phosphatrückgrat sowie den Basen der TAR-RNA in der großen Furche der Auswölbung [164, 165].



**Abbildung 5.7:** Berechnete Sekundärstruktur der TAR-RNA aus HIV-II. Die RNA besteht aus drei *stem-loop*-Bereichen. In den Auswölbungen des *stem-loop* 1 und 2 erfolgt die Bindung zum Tat-Protein [162].

Obwohl das Tat-Protein sowohl an den Auswölbungen des *stem-loop* 1 der TAR-RNA als auch an *stem-loop* 2 bindet, zeigen Mutationen an beiden Bindungsstellen, dass die Transkriptionsrate nur von Änderungen im *stem-loop* 1 beeinflusst wird. Mutationen in der Auswölbung des *stem-loop* 1 verringern die Transkriptionsrate auf 30 % des Wildtyps, während Mutationen in *stem-loop* 2 die Transkription nicht beeinflussen. Demnach ist der *stem-loop* 1 der essentielle Bereich in der TAR-RNA, der die Bindung an das Tat-Protein und die Elongation der Transkription beeinflusst [166].



# Kapitel 6

## Zielsetzung

Die RNA unterscheidet sich von der DNA durch die 2'-Hydroxylgruppe und die Methylgruppe des Thymins. Diese kleinen konstitutionellen Unterschiede führen zu konformationellen Unterschieden, wie zum Beispiel der Helix, die bei der DNA in der Regel in der B-Form, bei der RNA aber in der A-Form vorliegt. Auch weist die RNA eine größere Vielfalt an Sekundärstrukturelementen auf, die ihr eine große funktionelle Vielfalt eröffnet. Deshalb ist es von größtem Interesse, die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe zu untersuchen und die strukturellen Unterschiede zur DNA zu erörtern. Dafür sollen die folgenden Schritte durchgeführt werden.

1) Die  $^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe werden in der TAR-RNA aus HIV-II mit der NMR-Spektroskopie gemessen. Die TAR-RNA bietet sich für die Analyse an, da sie alle wichtigen strukturellen Merkmale der RNA wie Helices, Auswölbungen und Schleifen aufweist und strukturell und NMR-spektroskopisch sehr gut charakterisiert ist.

2) Um die gemessenen  $^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe mit den H2'-, C1'- und C3'-Atomen in den Dihedralwinkel dieser funktionellen Gruppe umsetzen zu können, wird mit Hilfe von ab initio Kalkulationen die Winkelabhängigkeit der heteronuklearen  $^3J$ -Kopplungen untersucht. Die daraus erhaltenen Karplus-Beziehungen werden für die Interpretation der Kopplungen verwendet.

3) NOEs der 2'-Hydroxylgruppe können ebenfalls zur Bestimmung der Konformation verwendet werden. Je nachdem in welcher Orientierung die 2'-Hydroxylgruppe vorliegt, unterscheiden sich die NOEs zu den Wasserstoffatomen in der Base oder der Ribose. Durch die große Wasserstoffatomdichte in der Ribose der RNA ist es

allerdings essentiell, die NOEs zu simulieren, um den Einfluss von Spin-Diffusion in der Ribose einschätzen zu können, da Spin-Diffusion die Größe der NOEs beeinflusst und diese falsch interpretiert werden können.

4) Die  ${}^3J_{2'OH}$ -Kopplungen in Kombination mit den Karplus-Beziehungen und die NOEs der 2'-Hydroxylgruppe werden zur Analyse der Konformation der 2'-Hydroxylgruppe eingesetzt.

# Kapitel 7

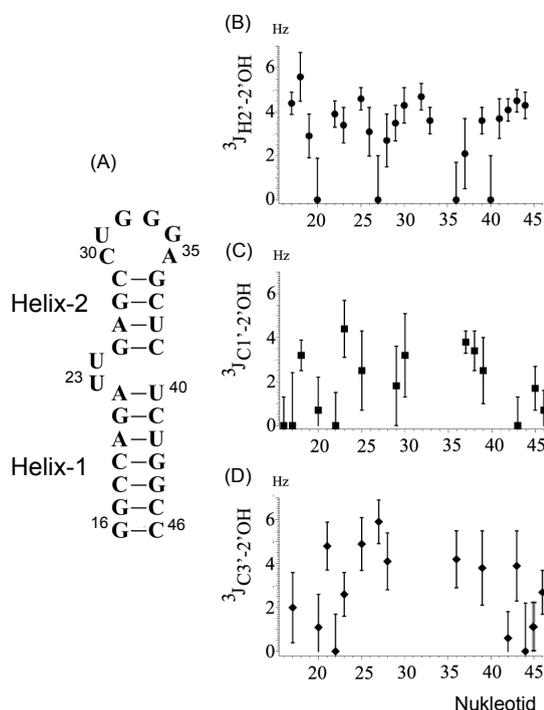
## Ergebnisse: Die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe in der RNA

Die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe in der RNA kann über die  $^3J$ -Kopplungen sowie über NOEs bestimmt werden. Um die  $^3J$ -Kopplungen in die passenden Dihedralwinkel umzusetzen, werden die korrespondierenden Karplus-Beziehungen benötigt. Diese wurden in der hier vorliegenden Arbeit mit Hilfe von DFT-Kalkulationen mit dem Programm Gaussian [167] ermittelt. Da die 2'-Hydroxylgruppe mit Wasser in einem Austausch steht, werden die Kopplungen bei Temperaturen unter  $5^\circ\text{C}$  gemessen.

### 7.1 Messungen der $^2J$ - und $^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe

Wie in meiner Diplomarbeit [168] gezeigt, können die  $^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe zu den C1'-, C3'- und H2'-Atomen in  $^{13}\text{C}$ -editierten ct-HSQC mit Hilfe der  $J$ -quantitativen Korrelation bei  $5^\circ\text{C}$  gemessen werden [141, 169]. Für jede  $^3J$ -Kopplung werden zwei Spektren aufgenommen. In einem Spektrum evolviert die Kopplung der 2'-Hydroxylgruppe zu den C1'-, C3'- und H2'-Atomen, in dem anderen Spektrum wird diese Kopplung refokussiert. Aus der Differenz der Signalintegrale der beiden Spektren kann dann die  $^3J$ -Kopplung bestimmt werden [141]. In weiterführenden Arbeiten haben Ying et al. 2006 eine Pulssequenz veröffentlicht, mit deren Hilfe gleichzeitig die  $^2J$ - und  $^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe sowie deren NOEs bestimmt werden können [170].

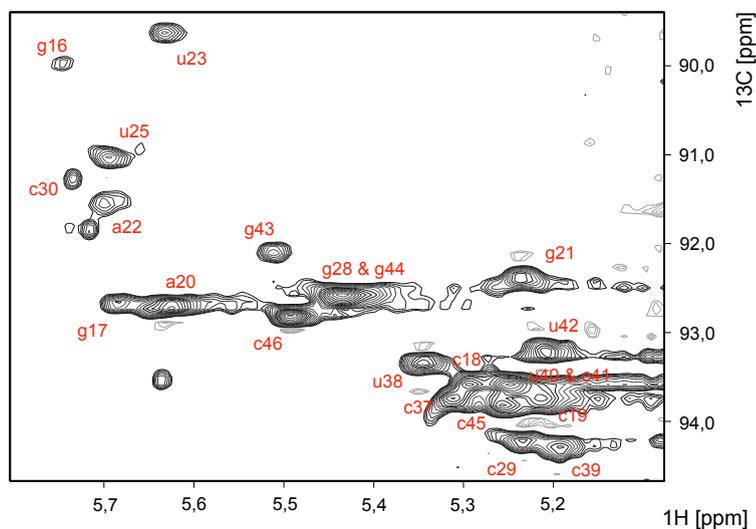
In Abbildung 7.1 sind die  $^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe mit den C1'-, C3'- und H2'-Atomen der TAR-RNA aus HIV-II dargestellt. Die homonuklearen  $^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe mit den H2'-Atomen variieren zwischen 0,0 Hz und 6,0 Hz. Die heteronuklearen  $^3J$ -Kopplungen mit den C1'-Atomen liegen zwischen 0,0 Hz und 4,5 Hz, während die  $^3J$ -Kopplungen mit den C3'-Atomen in einem Bereich zwischen 0,0 Hz und 6,0 Hz zu finden sind. Die  $^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplungen sind also insgesamt kleiner als die  $^3J_{2'OH,C3'}$ -Kopplungen. Die Fehler der Kopplungen werden über eine Fehlerfortpflanzung aus dem Verhältnis des Signals zu Rauschen bestimmt. Dafür werden verschiedene Rauschspuren auf die Signalspuren eines Spektrums addiert und die Standardabweichung der Signale ermittelt. Diese gehen in die Fehlerfortpflanzungen bei der Bestimmung der Kopplungen ein.



**Abbildung 7.1:**  $^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe mit den H2'- (B), C1'- (C) und C3'-Atomen (D) der TAR-RNA aus HIV-II (A) bei 5 °C [141].

Die Kopplungen werden bei 5 °C und 1 °C (274 K) bestimmt. Unterscheiden sich die Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe bei diesen beiden Temperaturen, tauschen diese Wasserstoffatome mit dem Wasser während der Evolutionszeit dieser Kopplungen von 25 ms in der Pulssequenz aus und nivellieren so die Kopplungen, so dass sie für die Auswertung nicht verwendet werden können. Des weiteren ist es möglich, dass die Hydroxylgruppen einem konformationellen Austausch unterliegen. Diese

Konformationen weisen bei den beiden Temperaturen unterschiedliche Populationen auf und skalieren dadurch die Kopplungen. Die Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe für die kurze Helix-2 der TAR-RNA unterscheiden sich bei den beiden Temperaturen, so dass diese durch den Austausch der 2'-Hydroxylgruppe mit Wasser gegen 0 gemittelt werden. Ebenso ist es möglich, dass ein konformationeller Austausch auftritt, indem die beiden Konformationen bei 5 °C und 1 °C unterschiedlich populiert sind. Es wird dann der Mittelwert der Kopplungen für beide Konformationen in Abhängigkeit von der Population gemessen. Die  $^3J$ -Kopplungen für die Helix-1 sind bei beiden Temperaturen innerhalb des Fehlers identisch. Hier ist der Austausch so langsam, dass die Kopplungen genau bestimmt werden können. Der Austausch der 2'-Hydroxylgruppe ist also abhängig von der Länge der Helix und damit von deren Stabilität.

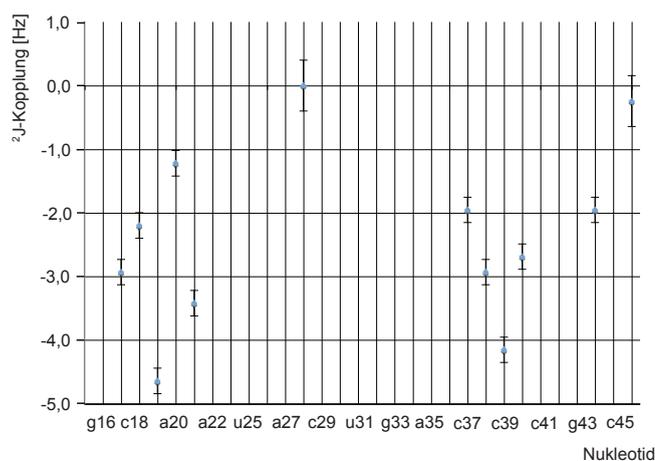


**Abbildung 7.2:** ct-HSQC-Spektrum mit einer Evolutionszeit von 25 ms bei 5 °C. Abgebildet ist das Referenzspektrum. Die Signale sind den einzelnen H1'- und C1'-Atomen der Nukleotide zugeordnet. Das Kreuzspektrum unterscheidet sich nur in der Intensität der Signale vom Referenzspektrum, deshalb ist es an dieser Stelle nicht abgebildet. Die Bestimmung der Kopplungen der Nukleotide, deren Signale sich in der Nähe der Wasserresonanz befinden, ist schwierig, da es hier zu Überlagerungen kommt.

Die Austauschrate der 2'-Hydroxylgruppe kann über die Kreuzsignale mit dem Wasser in einem NOESY bestimmt werden. Durch die Überlagerung der Resonanzen ist dies nur für das Nukleotid c19 möglich. Die Austauschrate  $k_{ex}$  beträgt für c19 15 Hz bei 5 °C. Die Raten der 2'-Hydroxylgruppen in der Helix-1 sollten auf Grund der identischen Kopplungen bei 5 °C und 1 °C vergleichbar sein, während die Raten in der Helix-2 kleiner sein sollten.

In Abbildung 7.2 ist das Referenzspektrum des  $^{13}\text{C}$ -editierten HSQCs für die  $^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplungen dargestellt. Aus den Integralen der Resonanzen aus den gekoppelten und refokussierten Spektren wird die  $^3J$ -Kopplung bestimmt. Da sich die Signale der C1'H1'-Korrelationen in der Nähe des Wassersignals befinden, ist die Extraktion der Kopplungen schwierig, da diese vom Wassersignal beeinflusst sein können.

Die  $^2J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe mit den C2'-Atomen können mit Hilfe des ct-HMQC-IPAP-NOESY gemessen werden [170]. Sie sind in Abbildung 7.3 für die TAR-RNA aus HIV-II dargestellt. Die  $^2J_{2'OH,C2'}$ -Kopplungen liegen zwischen -4,6 Hz und 0,0 Hz und können ebenfalls für die konformationelle Analyse der 2'-Hydroxylgruppe herangezogen werden. Die Fehler der Kopplungen werden über eine Fehlerfortpflanzung aus dem Verhältnis des Signals zu Rauschen, wie bereits in diesem Kapitel für die  $^3J$ -Kopplungen beschrieben, bestimmt.



**Abbildung 7.3:**  $^2J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe mit den C2'-Atomen der Helix 1 der TAR-RNA. Die Kopplungen liegen zwischen -4,6 Hz und 0,0 Hz.

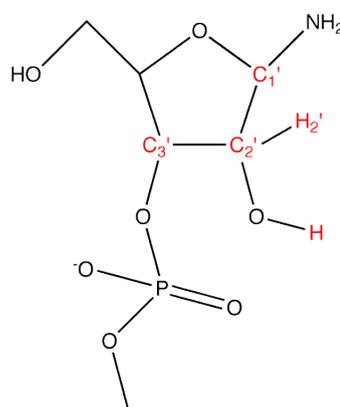
## 7.2 Ab-initio Kalkulationen der $^2J$ - und $^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe

Ab initio Methoden eignen sich zur Kalkulation von unterschiedlichen NMR-Parametern, wie chemischer Verschiebungen oder  $J$ -Kopplungen. Da vor allem die  $^3J$ -Kopplungen eine starke Winkelabhängigkeit besitzen, eignen sie sich ideal zur Bestimmung der Konformation einer chemischen Verbindung. Stehen zwei vicinale Ato-

me trans zueinander, sind die  $^3J$ -Kopplungen größer als würden sie cis zueinander stehen.

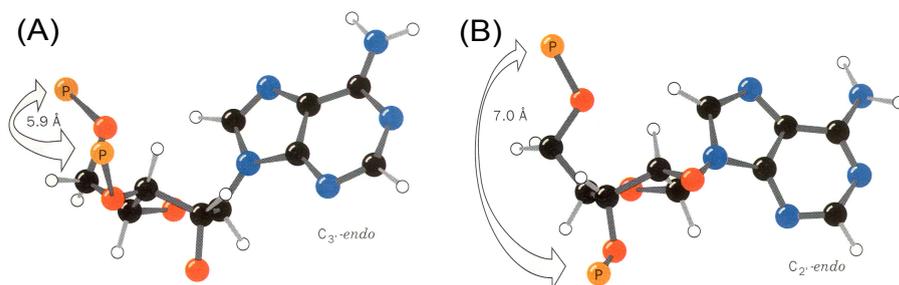
Für die Kalkulation der NMR-Parameter wurden DFT-Kalkulationen auf Basis des Programms Gaussian verwendet [167]. Für die Berechnung der Parameter sind die verwendeten Basissätze ausschlaggebend, da deren Funktionen zur Beschreibung der Elektronendichte verwendet werden. Große Basissätze enthalten eine größere Anzahl an Funktionen. Diese zusätzlichen Funktionen führen vor allem zu einer besseren Beschreibung der Elektronendichte um die Atomkerne. Da manche Anteile der Spin-Spin-Kopplungen vor allem auf Interaktionen der Elektronen um die Kerne basieren, werden diese Anteile der Kopplung, zum Beispiel die Fermi-Dirac-Wechselwirkung, mit größeren Basissätzen besser beschrieben. Natürlich führen größere Basissätze zu einem erhöhten Rechenaufwand, so dass es gilt, einen Kompromiss zwischen der Kalkulationsdauer und einer idealen Beschreibung des Systems zu finden. Es ist nicht möglich, die Berechnung der NMR-Parameter an einer RNA zu vollführen, weil dieses System für eine Berechnung zu groß wäre. Deshalb ist es wichtig, Modellsysteme auszuwählen, die die RNA gut repräsentieren und an denen die Berechnungen durchgeführt werden können.

Um zu verhindern, dass die Berechnung der  $J$ -Kopplungen an Modellmolekülen stattfindet, die konformationell und energetisch ungünstig sind, wird zunächst für jedes Modellsystem eine Geometrieoptimierung vorgenommen und daraufhin die  $J$ -Kopplung berechnet. Das Modellsystem für die Berechnung ist in Abbildung 7.4 dargestellt.



**Abbildung 7.4:** Modellsystem für die Berechnung der  $^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe mit den C1'-, C3'- und H2'-Atomen sowie der  $^2J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe mit den C2'-Atomen. Das Modellsystem wurde für die Berechnung der Kopplungen mit der Ribose in der C2'-endo- als auch in der C3'-endo-Konformation verwendet.

Als Modellsystem für die DFT-Berechnung wird eine Ribose mit einer Aminogruppe am C1'-Atom anstatt der Base verwendet und eine methylierte Phosphatgruppe am C3'-Atom. Es wurden auch Berechnungen mit einer Dimethylamino- anstatt der Aminogruppe durchgeführt. Die Methylgruppen wirken sich allerdings nicht auf die  $J_{2'OH}$ -Kopplungen aus. Die Konformation der Ribose spielt eine maßgebliche Rolle und beeinflusst die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe. Die RNA liegt in der Regel helikal in der A-Form vor. Hier nimmt die Ribose die C3'-endo-Konformation ein, während die Ribose in unstrukturierten Bereichen wie Auswölbungen und Schleifen in einem konformationellen Gleichgewicht zwischen C2'- und C3'-endo-Konformation vorliegt, wie in Abbildung 7.5 dargestellt. Dieses konformationelle Gleichgewicht, der *sugar pucker*, erschwert die Auswertung der Kopplungen in den unstrukturierten Bereichen, da die Populationen der Konformationen unbekannt sind. Deshalb sind vor allem die Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe in den Helices der RNA interpretierbar, da hier die Ribose ausschließlich in der C3'-endo-Konformation vorliegt [99].

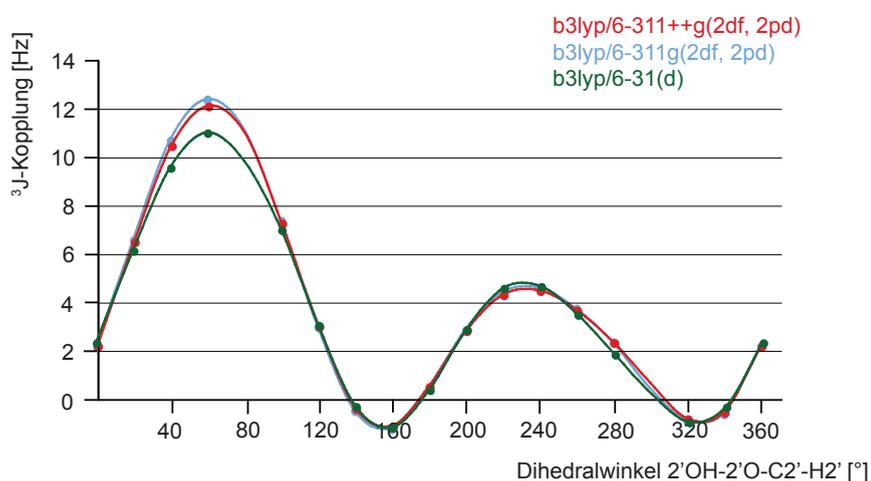


**Abbildung 7.5:** Die möglichen Konformationen (a) C3'-endo und (b) C2'-endo der Ribose in RNA und DNA. Die DNA nimmt in der Helix der B-Form die C2'-endo-; die RNA in der Helix der A-Form die C3'-endo-Konformation ein. In nicht helikalen Bereichen befindet sich die Ribose in einem Gleichgewicht der beiden Konformationen [99].

Die Kalkulationen der  $J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe werden deshalb für das Modellmolekül mit der Ribose in der C3'-endo-Konformation vorgenommen. Als Basissätze für die Beschreibung der Elektronendichte werden b3lyp/6-31g(d), b3lyp/6-311g(2df, 2pd) und b3lyp/6-311++g(2df, 2pd) verwendet [171, 172]. Die Basissätze b3lyp/6-311g(2df, 2pd) und b3lyp/6-311++g(2df, 2pd) enthalten zusätzliche Funktionen, die vor allem die Elektronendichte um den Atomkern herum besser beschreiben. Der Basissatz b3lyp/6-311++g(2df, 2pd) enthält zusätzlich Funktionen, die die Unschärfe der Elektronendichte in den Orbitalen durch die Heisenbergsche Unschärferelation eingehender beschreiben.

Die Geometrieoptimierung wird mit dem gleichen Basissatz durchgeführt wie die Berechnung der Kopplungen. Damit die Ribose ihre Konformation behält, werden die Bindungswinkel im Phosphatrückgrat bei der Optimierung eingefroren. Damit ändert sich der *sugar pucker* der Ribose zwar leicht, bleibt aber in der C3'-endo-Konformation. Die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe wird zur Berechnung der einzelnen Kopplungen bei vorgegebenem Dihedralwinkel in 20°-Schritten ebenfalls fixiert. Anschließend erfolgt die Berechnung der NMR-Parameter mit demselben Basissatz.

In Abbildung 7.6 sind die kalkulierten  $^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe mit den C1'-Atomen für die drei verschiedenen Basissätze angegeben. Die Karplus-Kurven, berechnet mit den beiden Basissätzen b3lyp/6-311g(2df, 2pd) und b3lyp/6-311++g(2df, 2pd), sind sehr ähnlich. Die Verwendung diffuser Elektronenfunktionen in den Basissätzen erhöhen zwar signifikant die Rechenzeit, das Ergebnis ist allerdings vergleichbar, so dass der Basissatz b3lyp/6-311g(2df, 2pd) für die Berechnung der  $^2J$ - und  $^3J$ -Kopplungen ausreichend ist. Die Karplus-Kurve mit dem kleinen Basissatz b3lyp/6-31g(d) unterscheidet sich im Maximum bei einem Dihedralwinkel von 60° signifikant von den Karplus-Kurven, die mit den größeren Basissätzen berechnet wurden. In dieser Konformation führt die bessere Beschreibung der Elektronendichte um die Atomkerne mit den Basissätzen b3lyp/6-311g(2df, 2pd) und b3lyp/6-311++g(2df, 2pd) zu einer höheren Kopplung von 12 Hz.



**Abbildung 7.6:** Berechnete Karplus-Kurven für die  $^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplungen mit den drei Basissätzen b3lyp/6-311++g(2df, 2pd) (rot), b3lyp/6-311g(2df, 2pd) (blau) und b3lyp/6-31g(d) (grün).

In Abbildung 7.7 sind alle Karplus-Kurven für die  $^2J$ - und  $^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe dargestellt. Die Kalkulationen sind mit dem Basissatz b3lyp/6-311g(2df, 2pd) ausgeführt worden. Die Karplus-Beziehung für die homonukleare  $^3J_{2'OH,H2'}$ -Kopplung lautet (Abbildung 7.7 (A)):

$$^3J_{2'OH,H2'} = 11,8\cos^2\theta - 2,2\cos\theta - 0,7 \quad (7.1)$$

Zum Vergleich ist bei der ab-initio kalkulierten Karplus-Beziehung der  $^3J_{2'OH,H2'}$ -Kopplung die von Fraser et al. experimentell mit 3 $\beta$ -Acetoxy-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -Oxidocholestan-19-ol bestimmte Karplus-Kurve dargestellt (blau gestrichelte Linie) [147]. Die experimentell bestimmte Karplus-Beziehung stimmt sehr gut mit der kalkulierten Kurve überein. Das Maximum der Beziehung bei 180° ist bei der berechneten Kurve ca. 2,0 Hz größer als bei der experimentell bestimmten Kurve. Der Verlauf der Beziehungen gleicht sich sehr stark. Das ausgewählte Modellmolekül eignet sich also für die Kalkulation.

Die Karplus-Beziehung der  $^3J_{2'OH,H2'}$ -Kopplung erreicht ihr globales Maximum von ca. 14 Hz bei 180°. Hier stehen die beiden Wasserstoffatome 2'OH und H2' trans zueinander. Dies führt zu der großen Kopplung. Globale Minima hat die symmetrische Karplus-Beziehung bei 80° und 270°; hier sind die beiden Wasserstoffatome 2'OH und H2' gauche.

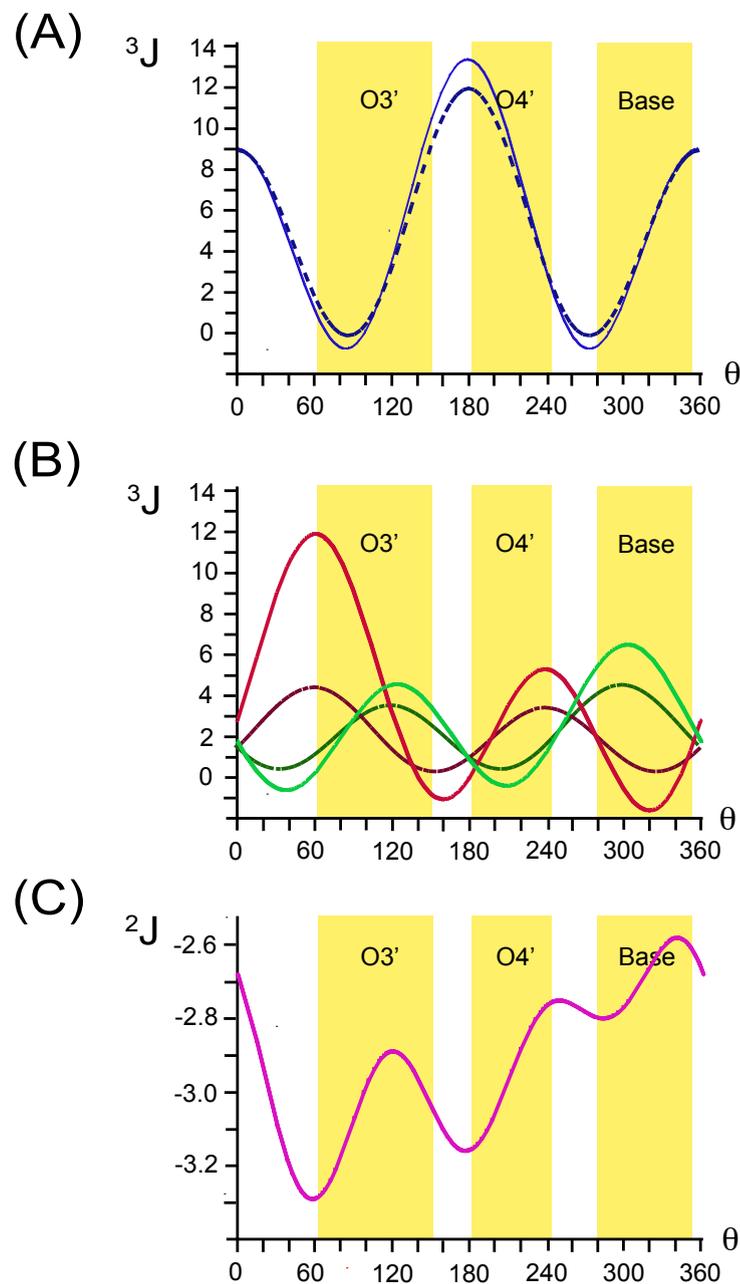
Die Karplus-Beziehung für die heteronukleare  $^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplung lautet (Abbildung 7.7 (B)):

$$^3J_{2'OH,C1'} = 9,6\sin^2(\theta + 30,0) + 3,3\sin(\theta + 25,3) - 1,0 \quad (7.2)$$

während die Karplus-Beziehung für die heteronukleare  $^3J_{2'OH,C3'}$ -Kopplung lautet (Abbildung 7.7 (B)):

$$^3J_{2'OH,C3'} = 5,9\sin^2(\theta - 33,2) - 1,0\sin(\theta - 27,0) - 0,4 \quad (7.3)$$

Die beiden heteronuklearen Karplus-Beziehungen der  $^3J_{2'OH,C1'/C3'}$ -Kopplungen sind asymmetrisch und unterscheiden sich voneinander. In Abbildung 7.7 sind die Karplus-Kurven der kalkulierten heteronuklearen  $^3J$ -Kopplungen (kontinuierliche Linie) im Vergleich mit zwei an Alkane angelehnte Karplus-Beziehungen (gestrichelte Linie) dargestellt, die zunächst für die konformationelle Analyse der 2'-Hydroxylgruppe verwendet wurden [141]. Die genäherten Karplus-Beziehungen wurden aus den Karplus-Kurven für die  $^3J_{C,H}$ -Kopplungen in Alkanen ermittelt. Die Koeffizienten der Beziehung wurden dabei skaliert, um die mittlere Kopplung der  $^3J_{C,OH}$ -Kopplung in Ethanol zu reflektieren [144].



**Abbildung 7.7:** Karplus-Beziehungen für die Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe (A) mit den H2'-Atomen ab initio (blau) und experimentell bestimmt mit 3 $\beta$ -Acetoxy-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -Oxidcholestan-19-ol (blau gestrichelte Linie) [147]; (B) ab initio mit den C1'-Atomen (rot) sowie C3'-Atomen (grün) und näherungsweise für die C1'-(rot gestrichelt) und C3'-Atome (grün gestrichelt); (C) berechnet mit den C2'-Atomen (rosa). Die bevorzugten Konformationen der 2'-Hydroxylgruppe laut der MD-Simulationen sind in gelb hinterlegt [139].

Die kalkulierte Karplus-Beziehung der  ${}^3J_{2'OH,C3'}$ -Kopplung weist ein globales Maximum von 6,5 Hz bei  $302^\circ$  auf. Falls die Konformationen gauche +, gauche - und trans gleiche Populationen aufweisen, führt dies zu einer mittleren Kopplung von 2,3 Hz; diese mittlere Kopplung stimmt recht gut mit der mittleren  ${}^3J_{C,OH}$ -Kopplung in Ethanol von 2,9 Hz überein [144].

Die Karplus-Beziehung der  ${}^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplung weist ein globales Maximum von 11,6 Hz bei  $62^\circ$  auf. Diese Kopplung weicht sehr stark von dem Maximum der zuvor angenäherten Karplus-Kurve ab. Die beiden kalkulierten heteronuklearen  ${}^3J_{2'OH,C1'/C3'}$ -Kopplungen sind also sehr asymmetrisch. Um dieses Phänomen zu verstehen, wurden DFT-Kalkulationen an den folgenden Molekülen mit Dihedralwinkeln der Hydroxylgruppen (H-C-O-H) von  $60^\circ$  und  $300^\circ$  durchgeführt:

- 1) 1-Methyl-3-Phosphatomethylpropan-2-ol-1-aminoether
- 2) 1-(Dimethylamino)-1,3-Dimethoxybutan-2-ol
- 3) 2,4-Dimethoxypentan-3-ol

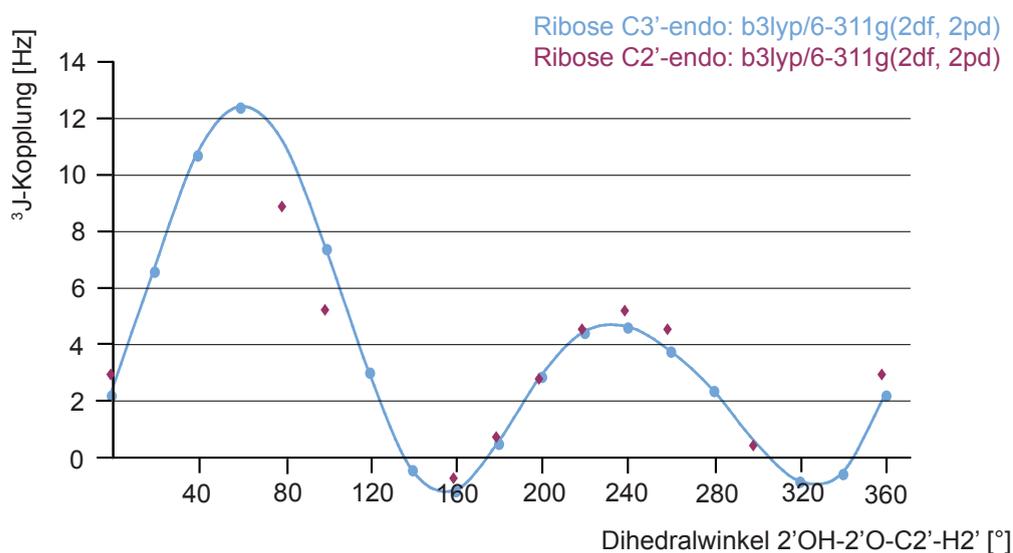
Die heteronuklearen  ${}^3J_{OH,C1'/C3'}$ -Kopplungen der Modellsubstanzen, in der Tabelle 7.1 dargelegt, sind jeweils bei  $60^\circ$  beziehungsweise  $300^\circ$  sehr ähnlich. Die Asymmetrie der beiden heteronuklearen Kopplungen ist also in der zyklischen Struktur der Ribose begründet.

**Tabelle 7.1:**  ${}^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe mit den Modellmolekülen 1-Methyl-3-Phosphatomethylpropan-2-ol-1-aminoether, 1-(Dimethylamino)-1,3-Dimethoxybutan-2-ol und 2,4-Dimethoxypentan-3-ol bei  $60^\circ$  und  $300^\circ$  in Hertz.

| $\theta$           | 1-Methyl-3-Phosphatomethylpropan-2-ol-1-aminoether |             | 1-(Dimethylamino)-1,3-Dimethoxybutan-2-ol |             | 2,4-Dimethoxypentan-3-ol |             |
|--------------------|--|-------------|---|-------------|--------------------------|-------------|
|                    | $60^\circ$   | $300^\circ$ | $60^\circ$                                | $300^\circ$ | $60^\circ$               | $300^\circ$ |
| ${}^3J_{2'OH,C1'}$ | 8,4  | 0,6         | 8,1                                       | 0,8         | 8,1                      | 0,7         |
| ${}^3J_{2'OH,C3'}$ | 0,8  | 7,3         | 0,9                                       | 7,8         | 0,8                      | 8,0         |
| ${}^3J_{2'OH,H2'}$ | 2,4  | 1,9         | 1,9                                       | 1,6         | 1,7                      | 1,6         |

Auch Wasserstoffbrückenbindungen können die Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe beeinträchtigen, da sie die Elektronendichte der Hydroxylgruppe verändern. Deswegen wurden die  ${}^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplungen bei einem Dihedralwinkel (H2'-C2'-O2'-H) von  $62^\circ$  in Abwesenheit eines Wassermoleküls sowohl als Elektronenak-

zeptor als auch als Elektronendonator bestimmt. Die Wasserstoffbrückenbindung der 2'-Hydroxylgruppe reduziert die  ${}^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplung bei  $62^\circ$  allerdings nur um 0,8 Hz. Auch die Konformation der Ribose kann sich auf die  ${}^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe auswirken. Neben der C3'-endo-Konformation, für die die Karplus-Beziehungen der 2'-Hydroxylgruppe in Abbildung 7.7 dargestellt sind, nimmt in der RNA die Ribose auch die C2'-endo-Konformation ein. Die Berechnung der NMR-Parameter mit Hilfe von DFT-Kalkulationen stellt sich hier allerdings als schwierig dar, neigt die Ribose während der Geometrieoptimierung doch dazu, eine andere Konformation einzunehmen. Dies lässt sich durch das Fixieren des Phosphatrückgrates nicht verhindern. Deshalb konnten die  ${}^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe nur für die Dihedralwinkel (H2'-C2'-O2'-H)  $0^\circ$ ,  $80^\circ$ ,  $100^\circ$ ,  $160^\circ$ ,  $180^\circ$ ,  $200^\circ$ ,  $220^\circ$ ,  $240^\circ$ ,  $260^\circ$  und  $300^\circ$  bestimmt werden. Die  ${}^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplungen, kalkuliert mit dem Basissatz b3lyp/6-311g(2df, 2pd), sind in Abbildung 7.8 zum Vergleich mit der Karplus-Beziehung der  ${}^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplungen mit der Ribose in der C2'-endo-Konformation dargestellt.



**Abbildung 7.8:** Karplus-Beziehung der  ${}^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplungen mit der Ribose in der C3'-endo-Konformation (blau) und C2'-endo-Konformation (violett).

Bei einem Dihedralwinkel (H2'-C2'-O2'-H) von  $100^\circ$  ist die  ${}^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplung in der C2'-endo-Konformation der Ribose um 2,2 Hz kleiner als in der C3'-endo-Konformation. Auch bei einem Dihedralwinkel von  $80^\circ$  ist die Kopplung in der C2'-endo-Konformation um 2,4 Hz kleiner als in der C3'-endo-Konformation. Die  ${}^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe bei den unterschiedlichen Dihedralwinkeln (H2'-

C2'-O2'-H) sind also abhängig von der Konformation der Ribose. Die Unterschiede der  $^3J$ -Kopplungen sind allerdings gering und können nur bei sehr genau ermittelten Kopplungen berücksichtigt werden.

Die Karplus-Beziehung für die heteronukleare  $^2J_{2'OH,C2'}$ -Kopplung lautet (Abbildung 7.7 (C)):

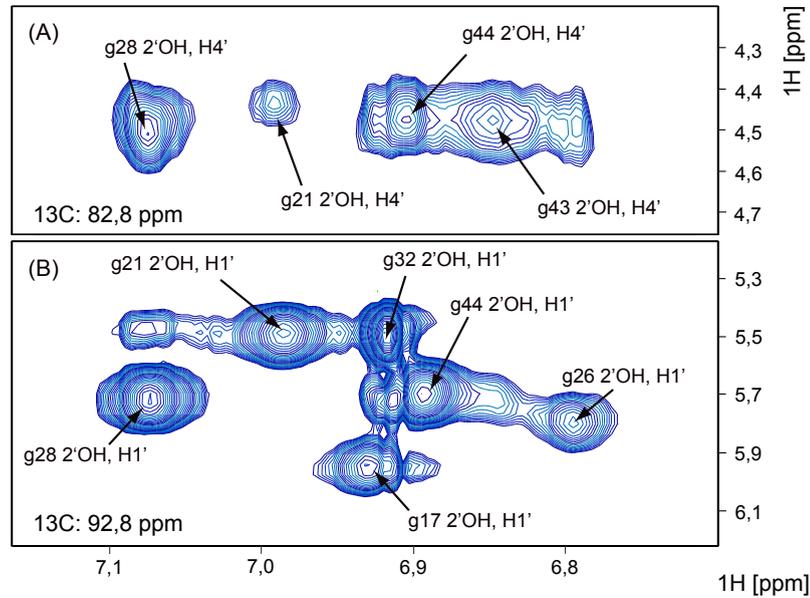
$$^2J_{2'OH,C2'} = 0,6\cos^3(\theta + 5,9) - 0,2\cos^2(\theta - 46,1) - 0,4\cos(\theta - 21,2) - 2,8 \quad (7.4)$$

Die  $^2J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe mit den C2'-Atomen sind, wie in Abbildung 7.7 ersichtlich, negativ. Auch die Karplus-Beziehung dieser  $^2J_{2'OH,C2'}$ -Kopplung ändert sich bei den einzelnen Dihedralwinkeln. Es ist also theoretisch möglich, auch diese Kopplung zur Bestimmung der Konformation der 2'-Hydroxylgruppe heran zu ziehen. Allerdings variieren die Kopplungen nur zwischen ca. -2,6 Hz und -3,3 Hz und stimmen damit mit den von Ying et al. bestimmten  $^2J_{2'OH,C2'}$ -Kopplungen überein [170]. Es ist also sehr wichtig, die  $^2J$ -Kopplungen mit der NMR-Spektroskopie präzise zu messen, um sie in einer konformationellen Analyse einsetzen zu können.

## 7.3 NOEs der 2'-Hydroxylgruppe

### 7.3.1 Messung der NOEs der 2'-Hydroxylgruppe

Bei der Zuordnung der Resonanzen der 2'-Hydroxylgruppen in der TAR-RNA aus HIV-II ist in den zweidimensionalen NOESY-Spektren in Abbildung 5.4 in Kapitel 5.1 ersichtlich, dass die 2'-Hydroxylgruppe eine Reihe von NOEs mit den Wasserstoffatomen der Ribose und der Base zeigt. Die Resonanzen der Hydroxylgruppe weisen jedoch in den zweidimensionalen Spektren im Bereich der H2'-, H3'-, H4'- und H5'-Atome eine große Überlagerung auf, die sowohl die Zuordnung als auch eine quantitative Auswertung der NOEs zur Konformationsbestimmung erschwert [136]. Um das Problem der spektralen Überlagerung der Resonanzen zu verringern, können dreidimensionale  $^{13}C$ -editierte NOESY-Spektren aufgenommen werden oder auch Proben hergestellt werden, in denen jeweils nur ein Nukleotid  $^{13}C$ - und  $^{15}N$ -markiert ist. Diese Ansätze wurden in dieser Arbeit zur Reduzierung der Überlagerung erfolgreich kombiniert, wie in der Abbildung 7.9 ersichtlich.



**Abbildung 7.9:**  $^{13}\text{C}$ -editiertes NOESY-Spektrum der TAR-RNA mit  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierten Guanosinen: Kreuzsignale der 2'-Hydroxylgruppe mit den H4'- (A) und H1'- (B) Atomen.

In diesem Spektrum können die Integrale der Resonanzen auf Grund der geringeren Überlagerung quantifiziert werden, um den Abstand zwischen den beiden Atomen, zwischen denen der NOE auftritt, zu bestimmen. Der NOE kann in Form von

$$NOE = \frac{W_2 - W_0}{W_1} \quad (7.5)$$

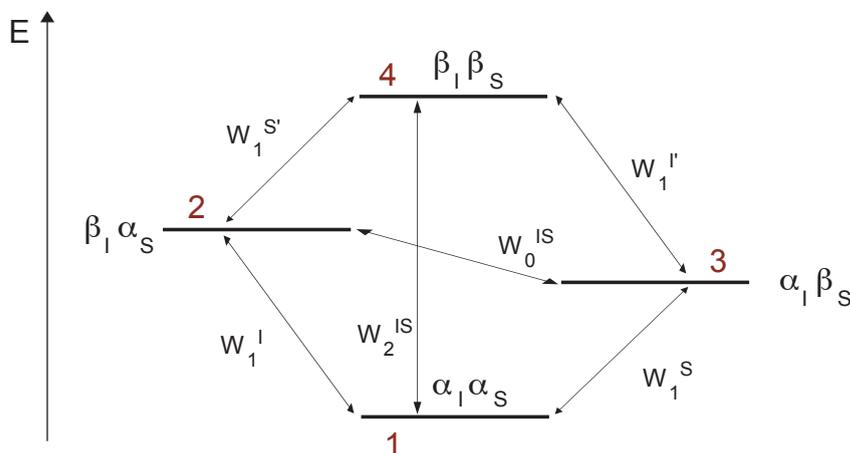
beschrieben werden. Die Übergangswahrscheinlichkeiten  $W$  für die Kreuzrelaxation zwischen den Spins I und S betragen [173]:

$$W_0 = \frac{1}{10} \frac{\hbar^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2}{r_{IS}^6} \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_c^2} \quad (7.6a)$$

$$W_1 = \frac{3}{20} \frac{\hbar^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2}{r_{IS}^6} \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I^2 \tau_c^2)} \quad (7.6b)$$

$$W_2 = \frac{3}{5} \frac{\hbar^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2}{r_{IS}^6} \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau_c^2} \quad (7.6c)$$

$\gamma_I$  ist das gyromagnetische Moment des Spins I,  $\gamma_S$  das des Spins S.  $\hbar$  entspricht dem Planckschen Wirkumsquantum über  $2\pi$ ,  $\mu_0$  ist die magnetische Feldkonstante und  $\omega_I - \omega_S$  die Differenz zwischen den Energieniveaus  $\alpha\beta$  und  $\beta\alpha$  beziehungsweise für  $\omega_I + \omega_S$  den Energieniveaus  $\alpha\alpha$  und  $\beta\beta$ , wie in Abbildung 7.10 dargestellt.



**Abbildung 7.10:** Kreuzrelaxation im Zweispinsystem mit den Spins I und S. Der NOE beruht auf den beiden Übergangswahrscheinlichkeiten  $W_0$  und  $W_2$  und führt im NOESY zu einem Kreuzsignal, das eine abstandsabhängige Intensität besitzt [173].

Das Integral des NOEs  $I(x)$  ist proportional zu dem Abstand  $\frac{1}{r^6}$  zwischen den beiden Atomen, zwischen denen der NOE auftritt:

$$\frac{1}{r^6} \propto I(x) \quad (7.7)$$

$x$  symbolisiert den NOE zwischen zwei beliebigen Protonen z.B. der Ribose einer RNA. Die Integrale der NOEs müssen für die Quantifizierung der Abstände normalisiert werden. Für die Normalisierung werden die NOEs zwischen den 2'-Hydroxylgruppen und den H1'-Atomen verwendet, so dass gilt:

$$\frac{r^6(2'OH, H1')}{r^6(2'OH, Hx)} = \frac{I(2'OH, Hx)}{I(2'OH, H1')} \quad (7.8)$$

$I(2'OH, Hx)$  entspricht den Integralen der NOEs zwischen der 2'-Hydroxylgruppe und den H2'- beziehungsweise H4'-Atomen. In Tabelle 7.2 sind die Verhältnisse der NOEs von den 2'OH-/H2'- zu den 2'OH-/H1'-Atomen und von den 2'OH-/H4'- zu den 2'OH-/H1'-Atomen der TAR-RNA aufgelistet. Die Werte stammen für die Guanosine aus einem dreidimensionalen  $^{13}C$ -editierten NOESY mit einer Mischzeit  $\tau_m$  von 50 ms einer  $^{13}C$ - und  $^{15}N$ -markierten Guanosin TAR-RNA sowie für die Cytosine und Adenosine aus einem  $^{13}C$ -editierten NOESY einer vollmarkierten TAR-RNA mit einer Mischzeit von 50 ms bei  $5^\circ C$ .

Diese Integral- beziehungsweise Distanzverhältnisse können nun in die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe umgesetzt werden, falls die theoretischen Abstände in der Ribose bekannt sind. Die Auswertung der NOEs erfolgt für die Nukleotide mit der Ribose in der C3'-endo-Konformation in Kapitel 7.4.

**Tabelle 7.2:** Verhältnis der Resonanzintegrale der 2'OH-/H2'- zu den 2'OH-/H1'-NOEs, beziehungsweise 2'OH-/H4'- zu den 2'OH-/H1'-NOEs. Diese entsprechen einem Abstandsverhältnis von  $r^6(2'OH, H1')/r^6(2'OH, Hx)$ .

| Nukleotid | I(2'OH,H2') / I(2'OH,H1') | I(2'OH,H4') / I(2'OH,H1') |
|-----------|---------------------------|---------------------------|
| g17       | 1,54                      | 0,19                      |
| c19       | 0,84                      | 0,40                      |
| g21       | 1,05                      | 0,16                      |
| g26       | 1,25                      | 0,26                      |
| a27       | 1,06                      | 0,22                      |
| g28       | 1,17                      | 0,37                      |
| g36       | -                         | 0,08                      |
| g43       | 0,92                      | 0,30                      |
| g44       | -                         | 0,15                      |

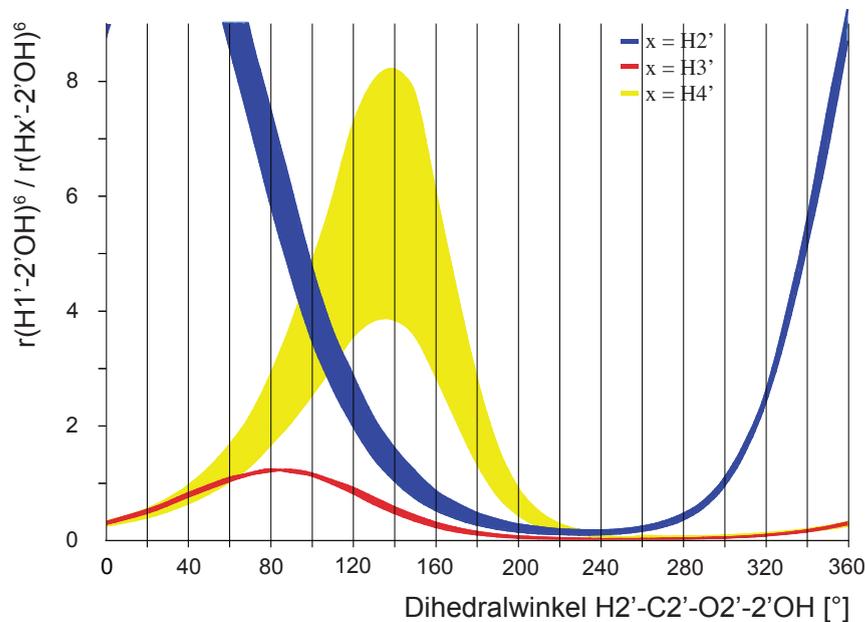
### 7.3.2 Theoretische Ermittlung der Abstände der 2'-Hydroxylprotonen zu Wasserstoffatomen der Ribose und Base

Mit Hilfe von  $^{13}\text{C}$ -editierten NOESY Spektren werden die Abstände zwischen den 2'-Hydroxylgruppen und den H2'- und H4'-Atomen, normalisiert auf die H1'-Atome, ermittelt. Um diese anschließend in die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe umsetzen zu können, müssen die theoretischen Abstände in der Ribose bekannt sein. Die RNA liegt als Helix in der A-Form vor mit einer C3'-endo-Konformation der Ribose. In unstrukturierten Bereichen unterliegt die Ribose einem konformationellen Austausch zwischen der C2'- und C3'-endo-Konformation. Dies macht die Auswertung der NOEs für diese RNA-Bereiche komplex, da es schwierig ist, zu bestimmen, inwiefern diese beiden Populationen besetzt sind und die Abstände der Wasserstoffatome in der Ribose beeinflussen. Deshalb werden die Abstände der H2'-, H3'- und H4'-Atome zu den 2'OH-Atomen nur für die Ribose in der C3'-endo-Konformation bestimmt. Natürlich besteht auch in der C3'-endo-Konformation eine gewisse Varianz in den Bindungswinkeln, so dass es eine Reihe von Orientierungen gibt, in denen die Ribose die C3'-endo-Konformation erfüllt. Daher wird die Betrachtung der Abstandsabhängigkeit der 2'-Hydroxylgruppe von den H2'- und H4'-Atomen normiert auf die H1'-Atome für zwei Extrempositionen der C3'-endo-Konformation unter-

nommen. Die Pseudorotationswinkel für die beiden Konformationen werden nach der folgenden Formel berechnet [104]:

$$\tan P = \frac{(\theta_2 - \theta_4) - (\theta_1 - \theta_4)}{2\theta_0(\sin 36 + \sin 72)} \quad (7.9)$$

Dabei entspricht  $\theta_0$  dem Dihedralwinkel um das C2'- und C3'-Atom in der Ribose,  $\theta_1$  dem Dihedralwinkel um das C3'- und C4'-Atom,  $\theta_2$  dem Dihedralwinkel um das C4'- und O1'-Atom,  $\theta_3$  dem Dihedralwinkel um das O1'- und C1'-Atom und  $\theta_4$  dem Dihedralwinkel um das C1'- und C2'-Atom. Die Pseudorotationswinkel betragen in der einen Konformation  $P = 13^\circ$ , in der anderen  $P = 43^\circ$ .



**Abbildung 7.11:** Die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe beeinflusst die Abstände dieser funktionellen Gruppe zu den anderen Wasserstoffatomen in der Ribose. Der Zusammenhang der einzelnen Abstände normiert auf die H1'-Atome zu der Konformation der 2'-Hydroxylgruppe ist vor allem für die 2'OH- zu den H2'- (blau) und H4'-Atomen (gelb) augenscheinlich.

Wie in Abbildung 7.11 ersichtlich, hängen die NOEs der 2'-Hydroxylgruppe mit den H2'-, H3'- und H4'-Atomen von der 2'OH-Orientierung und der Konformation der Ribose ab. Die Orientierung der 2'-Hydroxylgruppe beeinflusst dabei besonders die Abstandsrelationen zu den H2'- und H4'-Atomen, während der Abstand zum H3'-Atom in Abhängigkeit von dem Abstand zum H1'-Atom nur sehr wenig von der Konformation beeinflusst wird. So liegen die  $\text{NOE}_{2'OH,H3'}$ -Verhältnisse je nach Orientierung der 2'-Hydroxylgruppe zwischen 0,01 und 1,23. In Abhängigkeit von

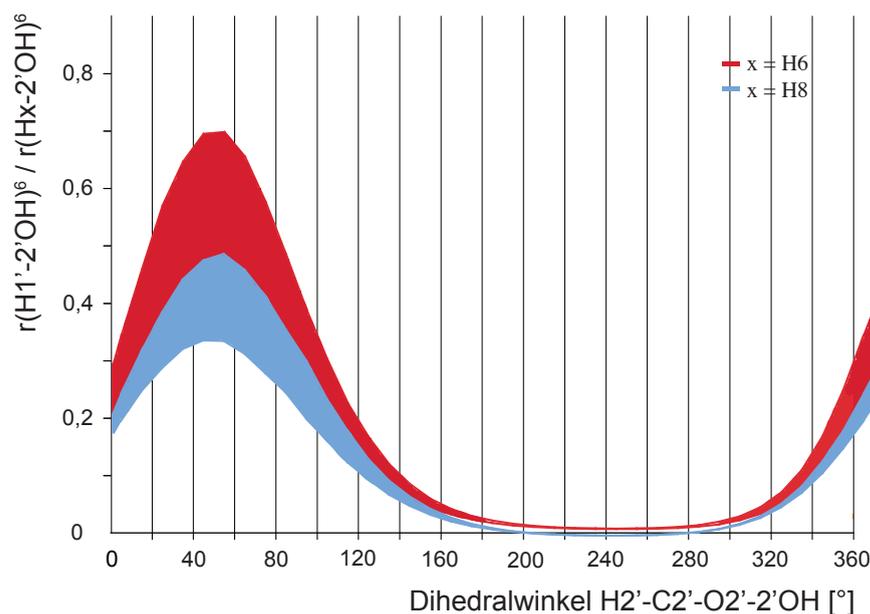
der Größe des experimentellen Fehlers ist dieses NOE-Verhältnis in den unterschiedlichen Konformationen nicht charakteristisch genug. Die  $\text{NOE}_{\text{S}_{2'\text{OH},\text{H}2'}}$  weisen Relationen zwischen 0,16 und 12,83 auf. Sie unterscheiden sich demnach eindeutig in den unterschiedlichen 2'OH-Konformationen. Die 2'-Hydroxylgruppe bevorzugt laut der MD-Simulationen von Egli et al. drei Konformationen. In der O3'-Domäne liegen die Relationen zwischen 1,2 und 11, in der O4'-Domäne zwischen 0,2 und 0,5 und in der Basen-Domäne zwischen 1,0 und 7,4. Mit Hilfe des  $\text{NOE}_{2'\text{OH},\text{H}2'}$ -Verhältnisses kann also zwischen der O3'-Domäne beziehungsweise Basen-Domäne und der O4'-Domäne unterschieden werden. Die Verhältnisse innerhalb der O3'-Domäne und Basen-Domäne sind identisch, so dass mit diesem Verhältnis nicht zwischen diesen Orientierungen unterschieden werden kann. Die  $\text{NOE}_{2'\text{OH},\text{H}4'}$ -Relationen liegen zwischen 0,02 und 8,19. In der O3'-Domäne betragen die Verhältnisse 1,6 bis 7,8, in der O4'-Domäne 0,1 bis 2,8 und in der Basen-Domäne 0,1 bis 0,2. Die  $\text{NOE}_{2'\text{OH},\text{H}4'}$ -Verhältnisse unterscheiden sich in allen bevorzugten Orientierungen und sind insofern prädestiniert für die Konformationsanalyse der 2'-Hydroxylgruppe.

Auch die Konformation der Ribose beeinflusst die Abstandsverhältnisse der 2'-Hydroxylgruppe. In Abbildung 7.11 ist für das  $\text{NOE}_{2'\text{OH},\text{H}4'}$ -Verhältnis (gelber Bereich),  $\text{NOE}_{2'\text{OH},\text{H}3'}$ -Verhältnis (roter Bereich) und die  $\text{NOE}_{2'\text{OH},\text{H}2'}$ -Relation (blauer Bereich) je nach Orientierung der 2'-Hydroxylgruppe ein Bereich angegeben. Je nach C3'-endo-Konformation ( $P = 13^\circ$  und  $P = 43^\circ$ ) der Ribose betragen zum Beispiel die  $\text{NOE}_{2'\text{OH},\text{H}4'}$ -Verhältnisse bei einem Dihedralwinkel ( $\text{H}2'\text{-C}2'\text{-O}2'\text{-}2'\text{OH}$ ) von  $140^\circ$  8,2 oder 3,8. Bei dieser Orientierung unterscheiden sich die Relationen erheblich. Dennoch beeinflusst der *sugar pucker* die NOE-Verhältnisse nicht so erheblich, dass eine eindeutige Unterscheidung der 2'OH-Konformation anhand der Relationen nicht mehr möglich wäre.

Ebenfalls kann der NOE der 2'-Hydroxylgruppe mit den H6- beziehungsweise H8-Atomen in der Base für die Bestimmung der Konformation verwendet werden. Da sich deren Abstände konstitutionell unterscheiden, muss jedoch zwischen Nucleotiden mit Purin- und Pyrimidinbasen unterschieden werden. Die Pseudorotationwinkel der Ribose für die beiden untersuchten Konformationen betragen für die Analyse der Pyrimidinbase  $P = 16^\circ$  beziehungsweise  $P = 43^\circ$  und für die Purinbase  $P = 13^\circ$  beziehungsweise  $P = 43^\circ$ . In Abbildung 7.12 ist die Abhängigkeit der NOEs der 2'-Hydroxylgruppe mit den H6- beziehungsweise H8-Atomen der Pyrimidin- beziehungsweise Purinbasen, die auf die H1'-Atome normiert sind, auf die Orientierung der 2'-Hydroxylgruppe gezeigt. Je nach Fehler, der in den NOESY-

Spektren bestimmten Abstände, sind diese Korrelationen allerdings nur bedingt in die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe umsetzbar, da die Verhältnisse  $r_6(H1' - 2'OH)/r_6(H6/8-2'OH)$  relativ gering sind. In der O3'-Domäne liegen die  $NOE_{2'OH,H6}$ -Relationen zwischen 0,06 und 0,7, in der O4'-Domäne zwischen 0,0 und 0,02 und in der Basen-Domäne zwischen 0,03 und 0,25. Die NOE-Relationen zwischen der 2'-Hydroxylgruppe und den H8-Atomen der Purinbasen sind in den unterschiedlichen 2'OH-Konformationen vergleichbar.

Auch in diesem Fall beeinflusst die Konformation der Ribose die NOE-Verhältnisse, wie anhand des roten Bereichs für die Pyrimidin und des blauen Bereichs für die Purinbasen in Abbildung 7.12 ersichtlich ist. Bei einem Dihedralwinkel ( $H2'-C2'-O2'-2'OH$ ) von  $20^\circ$  bis  $90^\circ$  ist auf Grund der Geometrie der Ribose die NOE-Relation am stärksten beeinträchtigt.

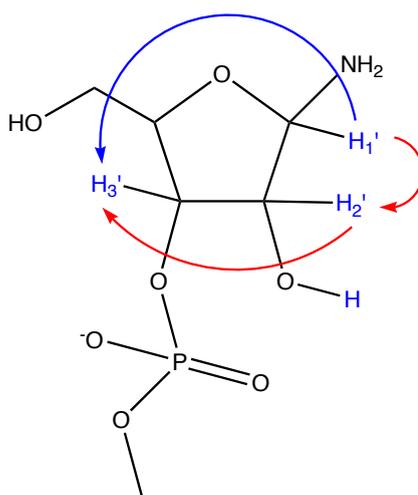


**Abbildung 7.12:** Auch die NOEs der 2'-Hydroxylgruppe zu den H6- (rot) und H8-Atomen (blau) können zur Analyse der 2'OH-Konformation verwendet werden. Auch hier beeinflusst der *sugar pucker* der Ribose merklich die Abstände der Wasserstoffatome in der Ribose in Abhängigkeit von der 2'-Hydroxylgruppenkonformation.

Die mit Hilfe der  $^{13}C$ -editierten NOESY Spektren gewonnen Abstände der 2'-Hydroxylgruppe zu den H2'-, H3'-, H4'- und H6- beziehungsweise H8-Atomen in Kapitel 7.3.1 können also zur Bestimmung der Konformation dieser wichtigen funktionellen Gruppe beitragen.

### 7.3.3 Simulation der NOEs der 2'-Hydroxylprotonen zu den anderen Wasserstoffatomen in der Ribose und Base

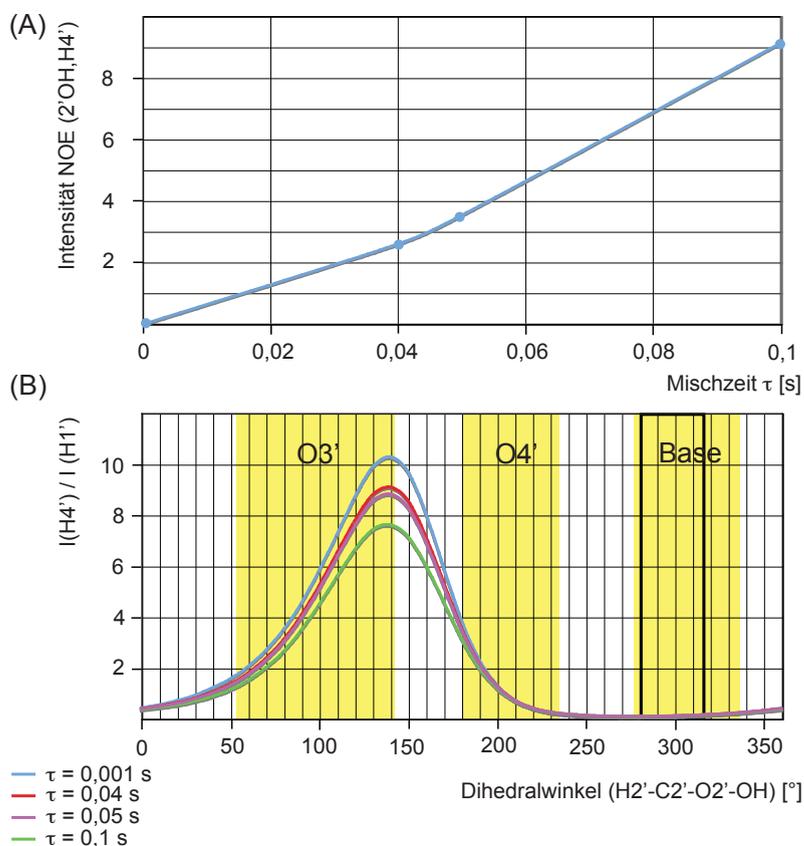
Die Ribose besitzt in Form der H1', H2', H3', H4' und H5' viele Wasserstoffatome. Wie in Kapitel 7.3 ersichtlich, können die Kreuzsignale der 2'-Hydroxylgruppe mit den H1'-, H2'- und H4'-Atomen in einem NOESY zur Ermittlung der Orientierung dieser funktionellen Gruppe benutzt werden, da die Kreuzrelaxation eine Abstandsabhängigkeit in Form von  $r^6$  enthält. Durch die vielen Wasserstoffatome kann es allerdings zu Spin-Diffusion kommen. Hier treten NOEs, wie in Abbildung 7.13 dargestellt, während der Mischzeit  $\tau$  nicht nur direkt zwischen zwei beteiligten Spins H1' und H3', sondern auch über einen dritten Spin H2' auf. Dadurch wird die Signalintensität des NOEs zwischen den Spins H1' und H3' beeinflusst und diese hängt nicht mehr ausschließlich vom Abstand zwischen den Spins H1' und H3' über  $r^6$  ab, sondern auch vom Abstand der Spins H1' zu H2' und H2' zu H3'.



**Abbildung 7.13:** Spin-Diffusion in der Ribose: Das Kreuzsignal zwischen den Atomen H1' und H3' tritt durch den NOE direkt auf. Allerdings kommt es auch zu longitudinaler Relaxation des H1'-Atoms mit dem H3', der nun in der Mischzeit wiederum ebenfalls mit dem H2'-Atom kreuzrelaxiert. Dadurch verändert sich die Signalintensität des NOEs zwischen dem H1'- und H3'-Atom.

Für die Interpretation der NOEs zur Konformationsbestimmung der 2'-Hydroxylgruppe ist es also essentiell, diesen Effekt zu simulieren, um den Einfluss der Spin-Diffusion bei der Auswertung der NOEs in der Ribose mit einbeziehen zu können. Die NOEs der 2'-Hydroxylgruppe zu den Wasserstoffatomen H1', H2', H3' und H4' in der Ribose und H6 beziehungsweise H8 in der Base wurden mit TRIO

(**T**ransfer **I**nterligand **O**verhauser **E**ffect) simuliert. Dieses Programm benutzt einen Voll-Relaxationsmatrix-Ansatz zur Simulation der NOEs und berücksichtigt damit die Spin-Diffusion [174, 175]. Falls die simulierten NOEs von Spin-Diffusion beeinflusst werden, weist die NOESY Aufbaukurve einen parabolischen Verlauf auf. Ohne Spin-Diffusion ist die Kurve linear.



**Abbildung 7.14:** (A) NOESY Aufbaukurve des NOEs der 2'-Hydroxylgruppe mit dem H4'-Atom bei einem Dihedralwinkel (H2'-C2'-O2'-OH) von  $0^\circ$ . (B) Verhältnis der NOE-Intensitäten zwischen dem 2'-OH- und H4'-Atom, normiert auf die H1'-NOEs, bei unterschiedlichen Mischzeiten  $\tau$  von 0,001 s, 0,4 s, 0,5 s und 0,1 s. Die bevorzugten Konformationen der 2'-Hydroxylgruppe in Richtung des O3'-, O4'- und N3/O2-Atoms sind in gelb hinterlegt.

In Abbildung 7.14 (A) ist eine NOESY Aufbaukurve für den NOE der 2'-Hydroxylgruppe mit dem H4'-Atom bei einem Dihedralwinkel (H2'-C2'-O2'-OH) von  $0^\circ$  dargestellt. Die Kurve weist einen nicht-linearen Verlauf auf. Dies zeigt, dass der NOE zwischen den beiden Atomen von Spin-Diffusion beeinflusst wird.

In Abbildung 7.14 (B) sind die Intensitäten der NOEs zwischen der 2'-Hydroxylgruppe und den H4'-Atomen, normiert mit den NOEs zu den H1'-Atomen, bei Mischzeiten  $\tau$  von 0,001 s, 0,4 s, 0,5 s und 0,1 s dargestellt. Die Kurven unterscheiden sich

in ihrem Maximum, das bei einer Mischzeit  $\tau$  von 0,001 s 10,5 erreicht und bei einer Mischzeit  $\tau$  von 0,1 s ein Maximum von 7,8. Die simulierten  $\text{NOE}_{2'OH,H4'}$ -Verhältnisse unterscheiden sich auf Grund der Spin-Diffusion vor allem im Bereich des Maximums. Bei kleinen Verhältnissen um Dihedralwinkel von  $0^\circ$  bis  $60^\circ$  und  $180^\circ$  bis  $360^\circ$  wirkt sich die Spin-Diffusion nicht markant aus. In der Abbildung 7.14 ist ersichtlich, dass sich die Intensitätsverhältnisse der NOEs trotz der Spin-Diffusion zwischen den von der 2'-Hydroxylgruppe bevorzugten Konformationen in der O3'-, O4'- oder Basen-Domäne sehr unterscheiden. In der O3'-Domäne liegen die  $\text{NOE}_{2'OH,H4'}$ -Verhältnisse bei einer Mischzeit  $\tau$  von 0,001 s zwischen 2,1 und 9,7 (Mischzeit  $\tau$  von 0,1 s zwischen 1,5 und 7,2), in der O4'-Domäne weisen die  $\text{NOE}_{2'OH,H4'}$ -Verhältnisse bei einer Mischzeit  $\tau$  von 0,001 s Werte zwischen 0,2 und 4,0 (Mischzeit  $\tau$  von 0,1 s zwischen 0,2 und 3,2) auf und in der Basen-Domäne liegen die Verhältnisse zwischen 0,1 und 0,4 (Mischzeit  $\tau$  von 0,1 s zwischen 0,1 und 0,4).

Die NOEs der 2'-Hydroxylgruppe in der Ribose werden also von Spin-Diffusion beeinflusst. Allerdings ist der Effekt der Spin-Diffusion nicht so gravierend, als dass die NOEs nicht zur Bestimmung der Konformation der 2'-Hydroxylgruppe herangezogen werden können, wie von Ying et al. 2006 gezeigt wurde [170].

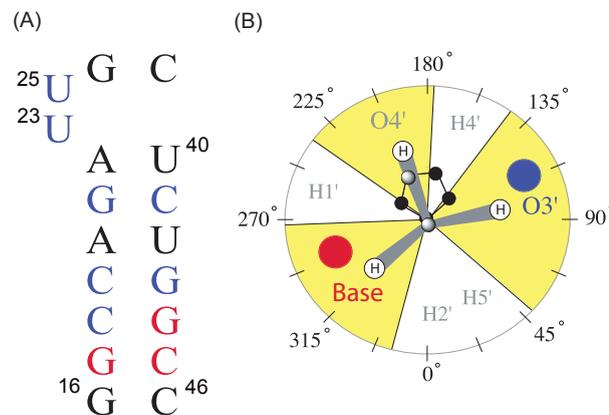
## 7.4 Die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe

Die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe kann mit den gemessenen  $^3J$ -Kopplungen bei  $5^\circ\text{C}$  (278K) und den ab-initio kalkulierten Karplus-Beziehungen bestimmt werden. Für die Bestimmung der Konformation der 2'-Hydroxylgruppe wurde folgende Formel angewendet:

$$\Upsilon = \frac{\sqrt{\left(\left(\frac{(J_{C1',OH2'}^{mes} - J_{C1',OH2'}^{theo})}{dJ_{C1',OH2'}^{mes}}\right)^2 + \left(\frac{(J_{C3',OH2'}^{mes} - J_{C3',OH2'}^{theo})}{dJ_{C3',OH2'}^{mes}}\right)^2\right)}}{\sqrt{\left(\frac{(J_{H2',OH2'}^{mes} - J_{H2',OH2'}^{theo})}{dJ_{H2',OH2'}^{mes}}\right)^2}} / 3 \quad (7.10)$$

Stimmen die gemessenen Kopplungen  $J^{mes}$  mit den aus den Karplus-Beziehungen theoretisch ermittelten Kopplungen  $J^{theo}$  überein, so geht der Zähler und damit der gesamte Term gegen null. Ist die Abweichung aller theoretisch ermittelten und gemessenen Kopplungen einer Hydroxylgruppe gleich den Fehlern der Messung, so ist der gesamte Term eins. Koeffizienten  $\Upsilon$  zwischen null und eins beschreiben deshalb

realistische Bindungswinkel. Nur die Konformationen der 2'-Hydroxylgruppen der Helix-1 der TAR-RNA können mit Hilfe der  $^3J$ -Kopplungen bestimmt werden, da die 2'-Hydroxylgruppen der kürzeren Helix-2 zu schnell mit Wasser austauschen, als dass ihre  $^3J$ -Kopplungen zur Konformationsanalyse verwendet werden könnten.



**Abbildung 7.15:** (A) Konformation der 2'-Hydroxylgruppe in der Helix-1 der TAR-RNA von HIV-II. Die 2'-Hydroxylgruppe nimmt Orientierungen in Richtung der O3'-Atome der Ribose (blau) oder N3/O2-Atome der Base (rot) ein. Die Konformation der übrigen Nucleotide (schwarz) konnte nicht ermittelt werden. (B) Bevorzugte Konformationen der 2'-Hydroxylgruppe [139].

Die Konformationen der 2'-Hydroxylgruppen der Helix-1 und Auswölbung der TAR-RNA sind in Abbildung 7.15 dargestellt. Die Nucleotide c18, c19, g21, u23, u25, c41 und g43 nehmen eine Konformation in Richtung der O3'-Atome der Ribose mit einem Dihedralwinkel ( $H2'-C2'-O2'-OH$ ) von  $\theta=120^\circ$  bis  $130^\circ$  ein. Sie bevorzugen also die +transoide Domäne aus Abbildung 5.5. Die Nucleotide g17, g44 und c45 nehmen eine Konformation in Richtung des N3- beziehungsweise O2-Atoms der Base mit einem Dihedralwinkel ( $H2'-C2'-O2'-OH$ ) von  $\theta=270^\circ$  bis  $320^\circ$  ein. Sie bevorzugen die -cisoide Domäne. Die O4'-Domäne (-transoid) wird von keiner 2'-Hydroxylgruppe eingenommen.

Die Konformationsanalyse wurde nur für 2'-Hydroxylgruppen in der Helix-1 und Auswölbung ausgeführt, deren Ribose sich in der C3'-endo-Konformation befindet [168].

Auch die in Kapitel 7.3.1 gemessenen und in Kapitel 7.3.2 theoretisch ermittelten NOEs der 2'-Hydroxylgruppe können zur Konformationsbestimmung herangezogen werden. Die Verhältnisse der experimentell bestimmten NOEs der 2'-Hydroxylgruppe für die Guanosine der TAR-RNA, sowie die von Ying et al. be-

schriebenen Werte [170] stimmen allerdings nicht mit einer Konformation der 2'-Hydroxylgruppe ausschließlich in der Basen- oder O3'-Domäne überein. Auch wenn der  $\text{NOE}_{2'OH,H4'}$  in der Basendomäne immer kleiner als der  $\text{NOE}_{2'OH,H1'}$  ist, so beinhaltet eine ausschließliche Population der Konformation in Richtung der N3- beziehungsweise O2-Atome der Basen, dass das Verhältnis  $\text{NOE}_{2'OH,H4'}:\text{NOE}_{2'OH,H1'}$  bei ca. 0,1 liegt, während das Verhältnis  $\text{NOE}_{2'OH,H2'}:\text{NOE}_{2'OH,H1'}$  kleiner als 2,0 ist oder aber das Verhältnis  $\text{NOE}_{2'OH,H4'}:\text{NOE}_{2'OH,H1'}$  müsste größer als 0,1 und von  $\text{NOE}_{2'OH,H2'}:\text{NOE}_{2'OH,H1'}$  größer als 2,0 sein. Dies gilt für NOEs, die in einer Ribose mit einer Mischzeit  $\tau$  von 50 ms unter Anwesenheit von Spin-Diffusion, aufgenommen wurden. Die mittleren Werte von 0,24 für das Verhältnis  $\text{NOE}_{2'OH,H4'}:\text{NOE}_{2'OH,H1'}$  und 1,25 für das Verhältnis  $\text{NOE}_{2'OH,H2'}:\text{NOE}_{2'OH,H1'}$  deuten auf einen konformationellen Austausch der 2'-Hydroxylgruppe hin. Dieser wird in Kapitel 8 diskutiert.



# Kapitel 8

## Diskussion: Auswirkungen der 2'-Hydroxylgruppe auf die Hydrathülle der RNA

Die 2'-Hydroxylgruppe beeinflusst die Struktur der RNA grundlegend. Durch elektrostatische Wechselwirkungen innerhalb der RNA sowie mit Wassermolekülen führt sie zur Ausbildung der charakteristischen Sekundärstruktur motive und ist maßgeblich am Aufbau einer Hydrathülle um die RNA beteiligt, die sich wesentlich von der Hydrathülle der DNA unterscheidet [99]. Die 2'-Hydroxylgruppe unterliegt bei Raumtemperatur einem schnellen Austausch mit Wasser, so dass ihre Resonanz in der NMR-Spektroskopie nur bei niedrigen Temperaturen um  $5^{\circ}\text{C}$  beobachtet werden kann [143]. So konnten bei niedrigen Temperaturen die Resonanz der 2'-Hydroxylgruppe in einem *Tetraloop* in Wasser [143] und einige chemische Verschiebungen einer RNA-Doppelhelix und eines RNA-DNA-Hybrids zugeordnet werden [176]. Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden 2004 22 Protonenresonanzen der 2'-Hydroxylgruppe der TAR-RNA aus HIV-II in Wasser bei  $5^{\circ}\text{C}$  beobachtet und zugeordnet [136, 168]. Die chemischen Verschiebungen der Hydroxylprotonen liegen zwischen 6,5 ppm und 7,1 ppm.

Durch vicinale  $^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe mit den H2'-, C1'- und C3'-Atomen und deren NOEs kann die Konformation der Hydroxylgruppe der RNA bei niedrigen Temperaturen in Wasser bestimmt werden [141]. Aufgrund des schnellen Austauschs der 2'-Hydroxylgruppe wurden  $J_{2'OH}$ -Kopplungen zunächst nur in  $d_6$ -DMSO an einzelnen Nukleotiden bestimmt [142, 143]. Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Nukleotiden werden dabei außer Acht gelassen. In dieser Arbeit

ist die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe der TAR-RNA aus HIV-II untersucht worden. Diese RNA besteht aus 30 Nukleotiden und ist mit ihren vielfältigen Sekundärstrukturelementen bestens geeignet, die 2'-Hydroxylgruppen in unterschiedlichen RNA-Motiven zu untersuchen.

## 8.1 Der Austausch der 2'-Hydroxylgruppe mit Wasser

Die  ${}^3J_{2'OH,H2'}$ -Kopplungen aller Nukleotide in der kürzeren Helix-2 und von c30 in der Schleife sowie von a20, u40 und u42 in der Helix-1 der TAR-RNA unterscheiden sich bei 1 °C und 5 °C in Wasser. Die Hydroxylprotonen tauschen bei den beiden Temperaturen mit einer Rate über 25 Hz mit Wasser aus oder unterliegen einem konformationellen Austausch, so dass ihre Orientierungen mit Hilfe der Kopplungen nicht interpretiert werden können. Die anderen Nukleotide der unteren Helix sowie u23 und u25 in der Auswölbung der TAR-RNA weisen innerhalb des Fehlers identische gemessene  ${}^3J_{2'OH}$ -Kopplungen bei den unterschiedlichen Temperaturen auf. Der Austausch mit Wasser ist also so langsam, dass mit Hilfe der Kopplungen die Orientierung der Hydroxylgruppe bestimmt werden kann [141].

Die Austauschrate der 2'-Hydroxylgruppe kann in NOESY Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen über das Kreuzsignal zwischen dem 2'-Hydroxylproton und Wasser bestimmt werden. Die Austauschrate des 2'-Hydroxylprotons des Nukleotids c19 mit Wasser, ermittelt bei 1 °C, 5 °C und 10 °C, stimmt mit  $k_{ex} = 15 \text{ Hz}$  bei 5 °C mit den Austauschraten überein, die von Gyi et al. 1998 veröffentlicht wurden [176]. Die Austauschraten der anderen Hydroxylprotonen können auf Grund der spektralen Überlagerung nicht ausgewertet werden. Allerdings deuten die identischen  ${}^3J_{2'OH,H2'}$ -Kopplungen bei 1 °C und 5 °C in Wasser für die Nukleotide u23 und u25 in der Auswölbung darauf hin, dass diese eine ähnliche Austauschrate  $k_{ex}$  mit Wasser aufweisen wie die Nukleotide der kanonischen CG-Basenpaarungen der Helix-1. Anhand des Austauschs der 2'-Hydroxylgruppe mit Wasser und der  ${}^3J_{2'OH,H2'}$ -Kopplungen in den beiden Helices der TAR-RNA ist ersichtlich, dass die Länge der Helix einen maßgeblichen Einfluss auf die Stabilität der RNA und damit auch auf die Austauschrate der 2'-Hydroxylgruppe hat.

Sollte die Austauschrate der 2'-Hydroxylprotonen mit dem Wasser für manche Nukleotide schneller sein als  $k_{ex} = 15 \text{ Hz}$  für c19, wird die  $J_{2'OH,H2'}$ -Kopplung, die in einem NOESY mit einer  $ct$ -Periode von 40 ms evolviert, reduziert. Bei einer Rate von

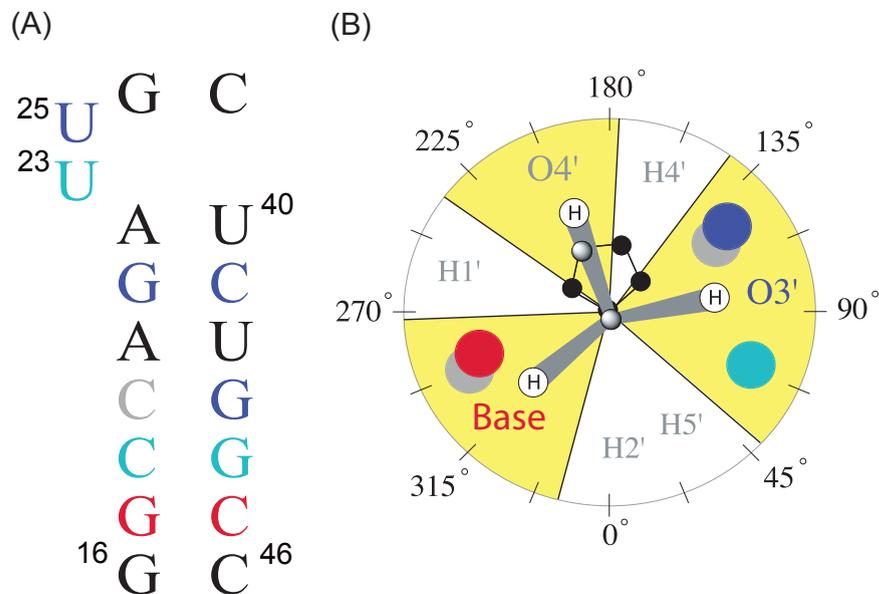
$k_{ex} = 25$  Hz wird die Kopplung um 15% verringert. Die Reduktion der Kopplung um 15% liegt allerdings innerhalb des Fehlers der gemessenen Kopplung, so dass dieser sich bei höheren Austauschraten  $k_{ex}$  nicht in den Kopplungen widerspiegelt.

Die Helix basiert auf den Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Basen. Die kanonischen Basenpaare der A-Form Helix in der RNA sind nicht stabil, sondern öffnen sich. Dieser Prozess konnte von Pan et al. 2003 in MD-Simulationen für AU-Basenpaare gezeigt werden. In der DNA tritt dieser Prozess nicht auf. Auch ein Austausch von Thymin gegen Uracil führt in der DNA nicht zu einer Öffnung der Basenpaare. Demnach ist die 2'-Hydroxylgruppe die beeinflussende Größe, die die Öffnung der Basenpaare verursacht [138, 177]. Untersuchungen der Austauschrate von Iminoprotonen der Wasserstoffbrücken zwischen den Basen in Wasser mit der NMR-Spektroskopie haben gezeigt, dass auch GC-Basenpaare sich in der A-Form Helix öffnen [178, 179]. In der Zeit, in der die Basenpaarungen geöffnet sind, kommt es zu einem Austausch der Iminoprotonen mit Wasser. In den geschlossenen Basenpaarungen können die Iminoprotonen nicht mit Wasser austauschen. Die 2'-Hydroxylgruppe beeinflusst demnach die Wasserstoffbrückenbindungen in der Helix der RNA. Die Öffnung sowohl der GC- als auch der AU-Basenpaarungen wird durch die funktionelle Gruppe verstärkt. Dieser Effekt kann auf dem Wassernetzwerk in der kleinen Furche basieren, dass in Kapitel 8.5 beschrieben wird.

## 8.2 Die $^3J$ -Kopplungen und die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe

Über die  $^3J_{2'OH}$ -Kopplungen kann der Dihedralwinkel ( $H2'-C2'-O2'-2'OH$ ) und damit die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe bestimmt werden. Wie in meiner Diplomarbeit gezeigt [168], eignen sich für die Messung der heteronuklearen  $^3J_{2'OH}$ -Kopplungen  $^{13}C$ -editierte ct-HSQC Spektren und für die homonuklearen Kopplungen ct-NOESY Experimente. Mit diesen Experimenten können die Kopplungen mit Hilfe der J-quantitativen Methode extrahiert werden. Die  $^3J_{2'OH}$ -Kopplungen sind in Kapitel 7.1 für die TAR-RNA aus HIV-II aufgeführt. Die homonuklearen  $J_{2'OH,H2'}$ -Kopplungen liegen außer für c18 zwischen 3 Hz und 4,5 Hz. Die heteronuklearen  $J_{2'OH,C1'}$ -Kopplungen sind außer für u23 kleiner als 4,0 Hz. Die  $J_{2'OH,C3'}$ - sind größer als die  $J_{2'OH,C1'}$ -Kopplungen und reichen bis zu 6,0 Hz.

Die Korrelationen der C1'H1'-Atome in der Schleife sind im  $^{13}C$ -editierten HSQC bei 5 °C nicht sichtbar. Die C3'H3'-Korrelationen dieser Nukleotide sind im  $^{13}C$ -



**Abbildung 8.1:** (A) Helix-1 der TAR-RNA mit den farblich kodierten Konformationen der 2'-Hydroxylgruppen. (B) Die bevorzugten Konformationen liegen in der Basen- (rot) oder O3'-Domäne (hellblau  $\Theta \sim 60^\circ$ , dunkelblau  $\Theta \sim 120^\circ$ ). c19 (grau) kann sowohl die Basen- als auch O3'-Domäne einnehmen.

editierten HSQC Spektrum auch bei  $5^\circ\text{C}$  sichtbar. Die geringe Signalintensität führt allerdings zu großen Fehlern bei der Bestimmung der  $^3J_{2'OH,C3'}$ -Kopplung, weswegen diese Kopplungen für die Konformationsanalyse nicht geeignet sind.

Die gemessenen Kopplungen der TAR-RNA liegen in demselben Bereich, in dem sich die  $^3J_{2'OH}$ -Kopplungen bewegen, die zwischenzeitlich von Ying et al. 2006 für einen Ausschnitt der Helix-35 der 23S-rRNA aus *E. coli* (*Escherichia coli*) ermittelt wurden [170]. Ying et al. bestimmten 2006 die Kopplungen in 3D ct-HMQC-IPAP NOESY und HMBC Spektren. Die  $^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplungen der 23S-rRNA betragen einheitlich ca.  $1,3 \pm 0,7$  Hz. Die  $^3J_{2'OH,C3'}$ -Kopplungen in dieser RNA sind ebenfalls größer als die  $^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplungen und belaufen sich auf ca.  $4,2 \pm 0,7$  Hz. Die  $^2J_{2'OH,C2'}$ -Kopplungen liegen zwischen  $-2,2$  Hz und  $-3,3$  Hz. Im Vergleich mit den in dieser Arbeit ermittelten  $^3J_{2'OH}$ -Kopplungen der TAR-RNA sind die Kopplungen der Helix-35 der 23S-rRNA gleichförmig. Während der untersuchte 23S-Sequenzbereich nur helikalen Charakter hat, besitzt die TAR-RNA vielfältige Sekundärstruktur motive, die sich auf die 2'-Hydroxylgruppen auswirken können.

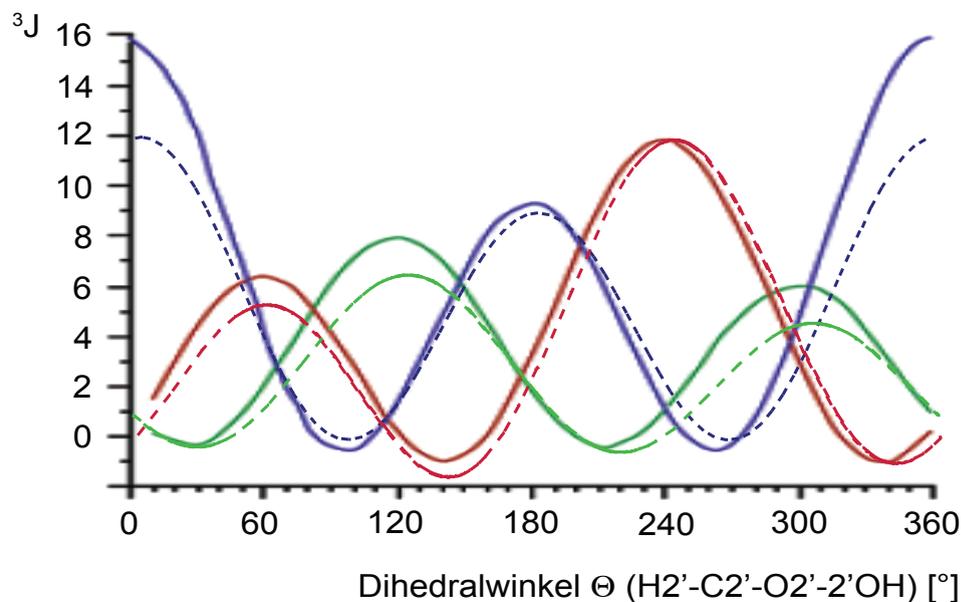
Die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe kann mit Karplus-Beziehungen aus den  $^3J_{2'OH}$ -Kopplungen bestimmt werden. Da zunächst nur für die homonukleare

${}^3J_{2'OH,H2'}$ -Kopplung eine geeignete Karplus-Kurve existierte, wurden für die Konformationsbestimmung modellierte Karplus-Beziehungen für die beiden heteronuklearen  ${}^3J_{2'OH,C1'/C3'}$ -Kopplungen verwendet. Diese sind in Kapitel 7.2 beschrieben. Eine erste Analyse der Kopplungen mit diesen Karplus-Kurven und eine qualitative Auswertung der Kreuzsignale des NOESY mit einer Mischzeit  $\tau_m$  von 50 ms aus Abbildung 5.4 führte zu Konformationen, die in Abbildung 8.1 dargestellt sind. In der Abbildung sind die bevorzugten Konformationen der 2'-Hydroxylgruppe in der O3'-, O4'- und Basen-Domäne, die auf MD-Simulationen beruhen [139], besonders hervorgehoben. Die 2'-Hydroxylgruppen der Nukleotide g17 und c45 nehmen eine Orientierung in Richtung der Basen-Domäne ein, die der Nukleotide c18, u23 und g44 eine Orientierung in Richtung der O3'-Domäne (Dihedralwinkel  $\Theta \sim 60^\circ$ ) und der Nukleotide g21, u25, c41 und g43 in Richtung der O3'-Domäne (Dihedralwinkel  $\Theta \sim 120^\circ$ ). Auf Grund der  ${}^3J_{2'OH,C1'/C3'}$ -Kopplungen, die aus den ct-HSQC Spektren nicht extrahiert werden können, kann für das Nukleotid c19 nicht zwischen der Basen- und O3'-Domäne (Dihedralwinkel  $\Theta \sim 120^\circ$ ) differenziert werden.

Für eine quantitative Analyse der Kopplungen sind allerdings die entsprechenden Karplus-Beziehungen nötig. Dafür wurden in dieser Arbeit die Karplus-Beziehungen in ab-initio Kalkulationen ermittelt. Wie in Abbildung 7.7 für die Karplus-Kurve der  ${}^3J_{2'OH,H2'}$ -Kopplung ersichtlich, stimmt die theoretisch ermittelte Beziehung mit der experimentell von Fraser et al. 1969 mit 3 $\beta$ -Acetoxy-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -Oxidocholestan-19-ol bestimmten Karplus-Kurve überein [147]. Die Karplus-Beziehungen der heteronuklearen  ${}^3J$ -Kopplungen sind beide asymmetrisch. Die  ${}^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplung weist ein Maximum von 11,6 Hz bei  $62^\circ$  auf. Die  ${}^3J_{2'OH,C3'}$ -Kopplung besitzt ein Maximum von 6,5 Hz bei  $302^\circ$ . Die Asymmetrie der beiden heteronuklearen  ${}^3J_{2'OH}$ -Kopplungen basiert auf dem Ringsystem der Ribose, wie anhand von DFT-Kalkulationen an drei Modellsystemen in Tabelle 7.1 gezeigt werden konnte. In den azyklischen Modellsystemen sind die  ${}^3J_{2'OH,C1'/C3'}$ -Kopplungen bei einem Dihedralwinkel von  $\theta = 60^\circ$  und  $\theta = 300^\circ$  sehr ähnlich.

Ist die 2'-Hydroxylgruppe an einer Wasserstoffbrückenbindung mit Wassermolekülen sowohl als Protonenakzeptor als auch als -donor beteiligt, wird die große  ${}^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplung bei  $62^\circ$  von 11,6 Hz nur um 0,8 Hz reduziert. Somit basiert das große Maximum der  ${}^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplung auf den elektronegativen Substituenten in der Ribose.

Auch die Konformation der Ribose wirkt sich nur bedingt auf die  ${}^3J_{2'OH}$ -Kopplung aus, wie anhand der  ${}^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplung in Abbildung 7.8 ersichtlich ist. Die

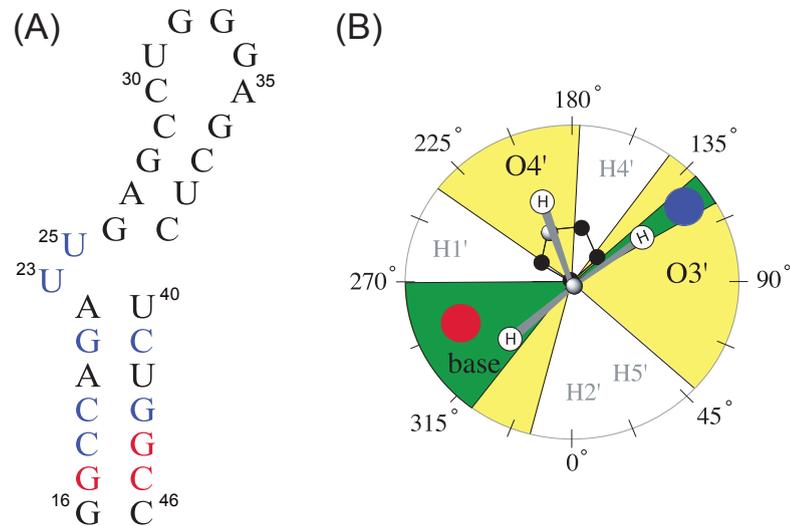


**Abbildung 8.2:** Karplus-Beziehungen der  $^3J_{2'OH,H2'}$ - (blau),  $^3J_{2'OH,C1'}$ - (rot) und  $^3J_{2'OH,C3'}$ -Kopplungen (grün). Dabei beziehen sich die gestrichelten Linien auf die Ribose und die durchgängigen Linien auf die Glukose.

$^3J_{2'OH}$ -Kopplung, bei einem Dihedralwinkel von  $62^\circ$ , ist in der C2'-endo- im Gegensatz zur C3'-endo-Konformation nur um 0,5 Hz reduziert. Auch die DFT-Kalkulationen der  $^3J_{2'OH}$ -Kopplungen von Zhao et al. 2007 an Glukose weisen darauf hin, dass die Konstitution und Konformation des Zuckers die maximale Amplitude der  $^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplung marginal beeinflussen [146].

In Abbildung 8.2 sind die in dieser Arbeit ermittelten Karplus-Beziehungen mit den Karplus-Kurven der  $^3J_{2'OH,H2'/C1'/C3'}$ -Kopplungen, die von Zhao et al. 2007 in DFT-Kalkulationen mit einer  $\beta$ -Glukose bestimmt wurden, dargestellt [146]. In den DFT-Kalkulationen der Karplus-Kurven für die Glukose wurden nur die FC-Anteile der Kopplung berücksichtigt. In den Kalkulationen der Karplus-Beziehungen für die Ribose wurden alle Anteile der Kopplung mit einbezogen. Je nachdem wie stark sich auch die DSO-, PSO- und SD-Anteile auf die Kopplung auswirken, kann dies zu den unterschiedlichen Amplituden der Kopplungen führen. Der Kurvenverlauf der jeweiligen Kopplung verbleibt jedoch sehr ähnlich.

Mit den akkuraten Karplus-Beziehungen wurden die Konformationen der 2'-Hydroxylgruppen erneut ermittelt. Die kalkulierten Karplus-Beziehungen unterscheiden sich für die heteronuklearen Kopplungen in ihrer Amplitude von den modellierten Karplus-Kurven, die zunächst für die Konformationsanalyse verwendet wurden.



**Abbildung 8.3:** (A) TAR-RNA aus HIV-II. (B) Die 2'-Hydroxylgruppen der Nucleotide (rot) nehmen eine Konformation in der Basen-Domäne ein. Die Nucleotide (blau) okkupieren die O3'-Domäne. Die  $^3J$ -Kopplungen ergeben, dass die 2'-Hydroxylgruppen nur in einem kleinen Bereich der O3'- oder Basen-Domäne (grün) vorliegen. Die generell bevorzugten Konformationen der 2'-Hydroxylgruppen sind gelb hinterlegt.

So liegt das globale Maximum der  $^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplung in der präzisen Karplus-Kurve bei 11,6 Hz im Gegensatz zu 4,5 Hz bei der approximierten Karplus-Beziehung. Dies führt dazu, dass bei einem Dihedralwinkel ( $H2'-C2'-O2'-2'OH$ ) zwischen  $\theta = 60^\circ$  und  $120^\circ$  die  $^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplungen wesentlich größer sein müssen als bei der zuvor verwendeten modellierten Karplus-Kurve. Die  $^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplungen der TAR-RNA liegen unter 4,5 Hz. Es liegt also keine 2'-Hydroxylgruppe in der O3'-Domäne zwischen  $\theta = 60^\circ$  und  $120^\circ$  vor. Damit beschränken die Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppen der TAR-RNA in Kombination mit den Karplus-Beziehungen die Konformation der jeweiligen Nucleotide auf einen kleinen Bereich der O3'-Domäne ( $\theta = 120^\circ$  bis  $130^\circ$ ) und einen größeren Bereich der Basen-Domäne ( $\theta = 270^\circ$  bis  $320^\circ$ ).

In Abbildung 8.3 sind die mit den präzisen Karplus-Beziehungen ermittelten Konformationen der Nucleotide dargestellt. Die 2'-Hydroxylgruppen von g17, g44 und c45 nehmen eine Orientierung in Richtung der N3- oder O2-Atome der Base ein. Das Hydroxylproton geht in diesem Fall eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem N3- oder O2-Atom als Protonendonator ein. In der Konformationsanalyse mit den approximierten Karplus-Beziehungen lag die 2'-Hydroxylgruppe des g44 in der O3'-Domäne vor. Durch die kleine  $^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplung von 1,0 Hz ergab die erneute Evaluation allerdings, dass das 2'-Hydroxylproton die Basen-Domäne einnimmt.

Die 2'-Hydroxylgruppen der Nukleotide c18, c19, g21, u23, u25, c41 und g43 nehmen eine Konformation in der O3'-Domäne ein. Hier besteht eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Hydroxylproton und dem O3'-Atom des Phosphatrückgrats. In der Konformationsanalyse basierend auf den approximierten Karplus-Beziehungen lagen die 2'-Hydroxylgruppen der Nukleotide c18 und u23 in der O3'-Domäne ( $\theta = 60^\circ$  bis  $120^\circ$ ) vor. Auf Grund der kleinen  ${}^3J_{2'OH,C1'}$ -Kopplungen von 3,3 Hz für c18 sowie 4,4 Hz für u23, kann die O3'-Domäne ( $\theta = 60^\circ$  bis  $120^\circ$ ) nun ausgeschlossen werden. c19 weist eine  ${}^3J_{2'OH,H2'}$ -Kopplung von 2,9 Hz auf. Auf Grund der Kopplung kann es entweder die O3'- oder Basen-Domäne einnehmen. Die Basen-Domäne kann angesichts des schwachen NOEs zwischen der 2'-Hydroxylgruppe und dem H8-Atom des a20 im NOESY aus Abbildung 5.4 ausgeschlossen werden.

### 8.3 Die ${}^2J$ -Kopplung und die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe

Die Karplus-Beziehung für die  ${}^2J_{2'OH,C2'}$ -Kopplung, dargestellt in Abbildung 7.7, zeigt sehr ähnliche Kopplungen für alle Konformationen in einem Bereich zwischen -2,6 Hz und -3,3 Hz. Diese Kopplungen stimmen mit den von Ying et al. 2006 experimentell ermittelten Kopplungen überein [170]. Allerdings sind diese Kopplungen für eine konformationelle Analyse der 2'-Hydroxylgruppe nicht geeignet, da sie über alle Dihedralwinkel  $\theta$  zu gleichförmig sind.

### 8.4 Die NOEs der 2'-Hydroxylgruppe

Auf der Grundlage der  ${}^3J$ -Kopplungen kann ein konformationeller Austausch der 2'-Hydroxylgruppe zwischen verschiedenen Orientierungen nicht ausgeschlossen werden. Die  ${}^3J$ -Kopplungen für die Helix-35 der 23S-rRNA sind relativ einheitlich [170]. Es ist möglich, dass die 2'-Hydroxylgruppe neben einer Orientierung einen konformationellen Austausch eingeht und die Kopplungen gegen 0 skaliert. Die  ${}^3J$ -Kopplungen der TAR-RNA nehmen einen größeren Bereich ein. Hier ist eine Skalierung auf Grund eines konformationellen Austausches nicht eindeutig sichtbar.

Dennoch ist es essentiell für die Konformationsbestimmung, die NOEs der 2'-Hydroxylgruppe quantitativ in die Analyse einzubeziehen [136, 170]. Bislang wurden die NOEs nur qualitativ in die Bestimmung der Konformation einbezogen, da die spektrale Überlagerung im 2D NOESY Spektrum die quantitative Auswertung

nicht gestattete. Aus dreidimensionalen NOESY Spektren wie dem ct-HMQC-IPAP NOESY [170] oder  $^{13}\text{C}$ -editierten NOESY [82] können die NOE-Kreuzsignale quantitativ analysiert werden. Dies ist nur möglich, wenn sich die Resonanzen im Spektrum nicht überdecken. Um die spektrale Überlagerung der Kreuzsignale der 2'-Hydroxylprotonen mit den anderen Wasserstoffatomen der Ribose zu verringern, ist es deswegen hilfreich, RNA-Proben einzusetzen, bei denen jeweils nur ein Nukleotid  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markiert ist. Um die NOEs der 2'-Hydroxylgruppe quantitativ auswerten zu können, werden diese im Verhältnis zueinander, wie in Kapitel 7.3.1 beschrieben, ausgewertet. Die theoretische Betrachtung der Abstände zwischen der 2'-Hydroxylgruppe und den anderen Wasserstoffatomen in der Ribose und Base ist in Abbildung 7.11 dargestellt. Sie zeigt, dass vor allem die NOE-Intensitätsverhältnisse und somit Abstandsverhältnisse  $r^6(2'\text{OH},\text{H1}')/r^6(2'\text{OH},\text{H4}')$  geeignet sind, die Konformation der Ribose zu bestimmen, da die Verhältnisse sich eindeutig zwischen der Basen- und O3'-Domäne unterscheiden.

Auch der *sugar pucker* der Ribose [122] hat einen Einfluss auf die Abstände zwischen der 2'-Hydroxylgruppe und den anderen Wasserstoffatomen in der Ribose. Je nach Pseudorotationswinkel [104] kann bei einem Dihedralwinkel (H2'-C2'-O2'-2'OH) von  $\theta = 120^\circ$  (O3'-Domäne) das Verhältnis  $r^6(2'\text{OH},\text{H1}')/r^6(2'\text{OH},\text{H4}')$  zwischen 7,5 und 3,8 variieren. Dennoch ist der Unterschied zur Basen-Domäne ( $\theta = 270^\circ$  bis  $320^\circ$ ) mit einem Verhältnis  $r^6(2'\text{OH},\text{H1}')/r^6(2'\text{OH},\text{H4}')$  von unter 0,5 so eindeutig, dass bei der Auswertung der NOE-Resonanzen die Konformation der Ribose innerhalb des Bereichs der C3'-endo-Konformation vernachlässigt werden kann.

Die Protonendichte in der Ribose der RNA ist erheblich. Infolgedessen kann es bei der Kreuzrelaxation durch den NOE nicht nur zu direkten Kreuzsignalen zwischen der 2'-Hydroxylgruppe und anderen Protonen in den Spektren kommen. Die Signalintensitäten werden vielmehr auch von der Spin-Diffusion beeinflusst [180–182]. Dies wurde in der Analyse der NOE-Intensitäten durch Ying et al. 2006 nicht berücksichtigt [170]. Deshalb wurden mit Hilfe von TRIO [174], einem Programm das einen Voll-Relaxationsmatrix-Ansatz verwendet, die NOEs zwischen der 2'-Hydroxylgruppe und den anderen Wasserstoffatomen in der Ribose unter dem Einfluss der Spin-Diffusion simuliert. Das Ergebnis der Simulation, dargestellt in Abbildung 7.14 zeigt, dass die NOE-Intensitäten unter dem Einfluss der Spin-Diffusion stehen. Die Beeinflussung der Intensitätsverhältnisse durch Spin-Diffusion ist ähnlich wie die Beeinflussung der Konformation der Ribose jedoch so gering, dass trotz dieser

Effekte die NOE-Kreuzsignale zur Analyse der Konformation der 2'-Hydroxylgruppe eingesetzt werden können.

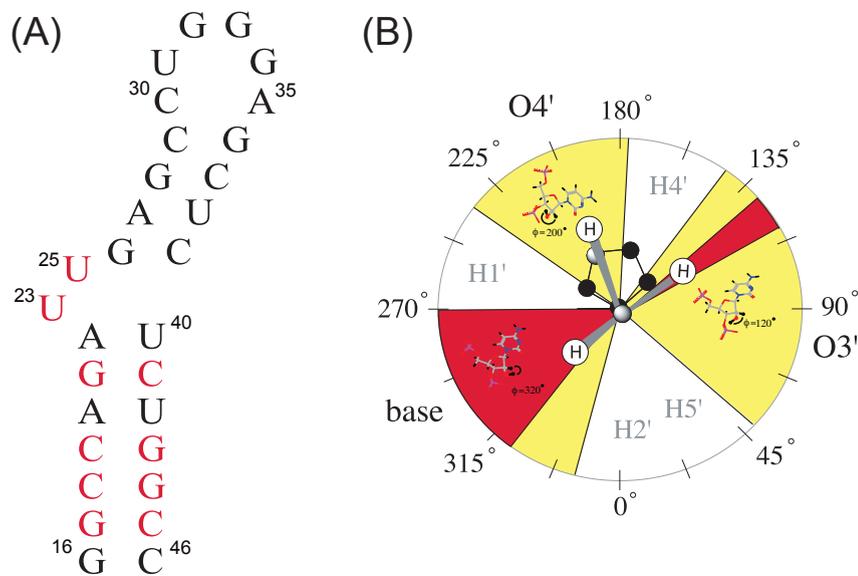
Eine genau Betrachtung der gemessenen NOE-Kreuzsignalintensitäten für die 2'-Hydroxylgruppe der TAR-RNA aus HIV-II und der Helix-35 der 23S-rRNA aus *E. coli* [170] ergibt allerdings, dass diese nicht mit den simulierten Intensitäten für die Basen-Domäne übereinstimmen. In der Basen-Domäne ist das Verhältnis der NOEs(2'OH,H4':2'OH,H1') ca. 0,1 sowie NOEs(2'OH,H2':2'OH,H1') kleiner als 2 ( $\theta < 310^\circ$ ) oder der NOEs(2'OH,H4':2'OH,H1') größer als 0,1 sowie der NOEs(2'OH,H2':2'OH,H1') größer als 2 ( $\theta > 310^\circ$ ). Wie in Tabelle 7.2 ersichtlich, beträgt das NOE(2'OH,H4':2'OH,H1')-Verhältnis des g17 0,19, die NOE(2'OH,H4':2'OH,H1')-Relation 1,54. Anhand der Kopplungen nimmt die 2'-Hydroxylgruppe die Basen-Domäne ein, die NOEs widersprechen allerdings einer ausschließlichen Population dieser Orientierung.

In der O3-Domäne sind die Relationen der NOEs(2'OH,H4':2'OH,H1') größer als 3,5 beziehungsweise der NOEs(2'OH,H2':2'OH,H1') circa 2. Für die Nukleotide c19, g21 und g43 betragen die Verhältnisse für die NOEs(2'OH,H4':2'OH,H1') im Mittel 0,25 und für die NOEs(2'OH,H2':2'OH,H1') 0,94. Dies widerspricht ebenfalls einer ausschließlichen Population der O3'-Domäne. Die 2'-Hydroxylgruppe unterliegt einem konformationellen Austausch.

## 8.5 Die Konformation der 2'-Hydroxylgruppe

Die Konformation der Hydroxylgruppe darf nicht unter der Annahme nur einer Orientierung analysiert werden. Vielmehr liegt die 2'-Hydroxylgruppe in einem konformationellen Gleichgewicht vor, in dem sie sowohl die O3'-Domäne als auch die Basen-Domäne populiert und zwischen diesen Konformationen wechselt. Aus den NOEs der 2'-Hydroxylgruppe, aufgelistet in Tabelle 7.2, ist dies ersichtlich. In Folge dessen, ist die statische Repräsentation der Konformationen der 2'-Hydroxylgruppen aus Abbildung 8.3 ungültig. Statt dessen werden beide Domänen von den 2'-Hydroxylgruppen populiert, wie in Abbildung 8.4 dargestellt. Der konformationelle Austausch führt zu den gleichförmigen  $^3J$ -Kopplungen der 2'-Hydroxylgruppe, die von Ying et al. 2006 veröffentlicht wurden [170].

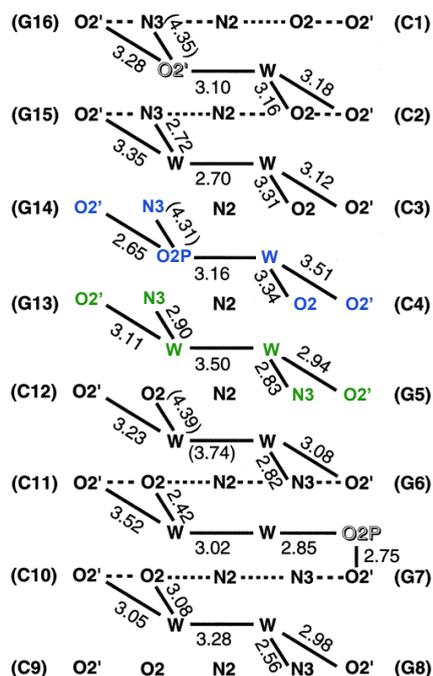
Die kleine Furche der RNA Helix wird von einem Wassernetzwerk überspannt, in dem die 2'-Hydroxylgruppe sowohl als Elektronendonator als auch -akzeptor eine bedeutende Rolle spielt [140]. Dieses Netzwerk an Wassermolekülen verläuft in der



**Abbildung 8.4:** (A) TAR-RNA aus HIV-II. Die 2'-Hydroxylgruppen der Nukleotide (rot) liegen in einem konformationellen Gleichgewicht zwischen der in (B) dargestellten Basen- und O3'-Domäne vor.

hochaufgelösten Röntgenstruktur eines RNA-Oktamers senkrecht zur Helixachse. Die beiden RNA-Stränge werden dabei von zwei Wassermolekülen überbrückt, die je eine Hydroxylgruppe am komplementären Strang koordinieren. In Abbildung 8.5 ist das Wassernetzwerk des RNA-Oktamers schematisch dargestellt.

Die untersuchten 2'-Hydroxylgruppen der TAR-RNA der unteren Helix befinden sich in einem konformationellen Gleichgewicht zwischen der Basen- und O3'-Domäne. In der O3'-Domäne geht die Hydroxylgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung als Protonendonator mit dem O3'-Atom des Phosphatrückgrates ein. Die freien Elektronenpaare des O2'-Atoms zeigen so in Richtung des komplementären RNA-Stranges und können als Protonenakzeptor ein Wassermolekül koordinieren. In der Basen-Domäne geht die 2'-Hydroxylgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung mit den N3- oder O2-Atomen der Purin- beziehungsweise Pyrimidinbasen ein. Hier koordiniert die Hydroxylgruppe als Protonendonator ein Wassermolekül. In Folge des konformationellen Austausches wechselt die eine Hydroxylgruppe aus der O3'-Domäne in die Basen-Domäne, während die andere Hydroxylgruppe weiterhin die Basen-Domäne okkupiert. In beiden Fällen - eine 2'-Hydroxylgruppe in der Basen-, die andere in der O3'-Domäne oder beide 2'-Hydroxylgruppen in der Basen-Domäne - besteht das Netzwerk aus Wassermolekülen in der kleinen Furche, wie in

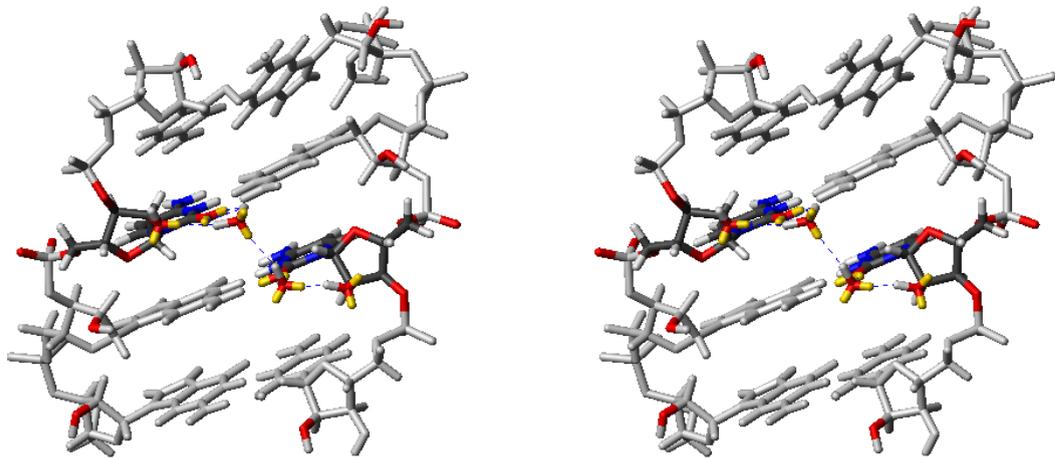


**Abbildung 8.5:** Schema eines Wassernetzwerkes in der kleinen Furche senkrecht zur Helixachse der RNA. Der Abstand zwischen den einzelnen Atomen beziehungsweise Wassermolekülen (W) ist in Ångström angegeben. Das Wassernetzwerk besteht mit beiden 2'-Hydroxylgruppen in der Basen-Domäne (grün) und mit einer Hydroxylgruppe in der Basen- sowie einer Hydroxylgruppe in der O3'-Domäne (blau) [140].

Abbildung 8.5 ersichtlich. So können die beiden Hydroxylgruppen fortwährend ihre Konformation ändern.

In Abbildung 8.6 ist eine repräsentative Momentaufnahme des Wassernetzwerkes für einen Abschnitt der TAR-RNA aus HIV-II dargestellt. Eine 2'-Hydroxylgruppe nimmt eine Konformation in der O3'-, die andere 2'-Hydroxylgruppe eine Orientierung in der Basen-Domäne ein. So können sie als Protonenakzeptor beziehungsweise -donator die beiden Wassermoleküle koordinieren. Da zwischen beiden Hydroxylgruppen ein konformationelles Gleichgewicht besteht, kommt es permanent zu einer Umlagerung der Hydroxylgruppen und in Folge dessen zu einer Neugestaltung des Wassernetzwerkes. Dabei bleibt das Netzwerk aus zwei Wassermolekülen, die die beiden komplementären RNA-Stränge überbrücken, bestehen.

Mit Hilfe der quantitativen Auswertung der  $^3J_{2'O-H}$ -Kopplungen, der Karplus-Beziehungen und der NOE-Daten der 2'-Hydroxylgruppe der TAR-RNA ist es möglich gewesen, einen Einblick in das dynamische Wassernetzwerk der kleinen Furche der RNA zu erhalten, das von Egli et al. 1996 in einer hochaufgelösten



**Abbildung 8.6:** Stereobild eines Segments der TAR-RNA. Die kleine Furche wird in dieser Momentaufnahme von zwei Wassermolekülen überbrückt. Eine 2'-Hydroxylgruppe (links) befindet sich in der O3'-Domäne, die andere 2'-Hydroxylgruppe (rechts) in der Basen-Domäne.

RNA-Kristallstruktur beobachtet wurde [140]. Dieses ist einer andauernden Reorganisation unterworfen, das auch Auswirkungen auf andere strukturelle Eigenschaften der RNA haben kann. So werden in NMR-spektroskopischen Untersuchungen [179] und MD-Simulationen [138] von RNAs eine Öffnung der Basenpaaarungen beobachtet. In der DNA findet dieser Prozess auf einer vergleichbaren Zeitskala in den MD-Simulationen nicht statt. Die Öffnung der Basenpaaarungen basiert nicht auf dem Uracil in der Base, sondern auf der 2'-Hydroxylgruppe. Die Reorganisation des Wassernetzwerks in der kleinen Furche der RNA kann mit der Öffnung von Basenpaaren in Zusammenhang stehen. So ist es möglich, dass sich auf Grund der Öffnung der Basenpaare das Netzwerk an Wassermolekülen neu ordnet oder die Umgruppierung der Wassermoleküle zur Öffnung der Basenpaaarungen führt.



# Kapitel 9

## Material und Methoden

### 9.1 Material

#### Puffer

15% denaturierendes Polyacrylamidgel

7 M Harnstoff (M=60,06 g/mol)  
375 mL 40% Akrylamid-Lösung (19:1)  
100 mL 10x TBE-Puffer  
auf 1 L mit Wasser auffüllen

10x TBE-Puffer

0,89 M TRIS (M=121,14 g/mol)  
0,89 M Borsäure (M=61,83 g/mol)  
10 mM Na-EDTA-Lösung pH=8,0  
auf 1 L mit Wasser auffüllen

10x Transkriptionspuffer

400 mM Tris-HCl pH=8,0 (M=157,60 g/mol)  
10 mM Spermidin (M=145,25 g/mol)  
50 mM DTT (M=154,25 g/mol)  
0,1% Triton X-100 (v/v)

Ladepuffer

8M Harnstoff (M=60,06 g/mol)  
Bromphenolblau  
Xylenecyanol

Puffer für die Schneidreaktion 40 mM Tris (M=121,14 g/mol)  
100 mM Natriumchlorid (M=58,4 g/mol)

NMR-Puffer 20 mM Natriumphosphat pH=6,6

**Chemikalien****Firma**

Deuteriumoxid  $D_2O$ , 99,9 %

Deutero GmbH

Chloroform

Ethanol

Isoamylalkohol

Isopropanol

Magnesiumchlorid

Millipore-Wasser

Natriumchlorid

Nukleosidtriphosphate

Roth

Nukleosidtriphosphate  $^{13}C$ - und  $^{15}N$ -markiert

Spectra Gases

Nukleosidtriphosphate  $^2H$ (H3', H4', H5')-markiert

Cambridge Isotopes

Phenol

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen der Qualität p.a. oder Biochemica (d.h. auf biochemische Verunreinigungen überprüft) und wurden von den Firmen AppliChem, Boehringer-Ingelheim, Fermentas, Fluka, Merck, New England Biolabs, Roche, Roth, Sigma-Aldrich und Stratagene bezogen.

**Geräte****Firma**

Biotrap

Whatman

Drehschiebervakuumpumpe RZ 2

Vakuubrand GmbH

Elutrap Membranen BT1 und BT2

Whatman

Eppendorf-Pipetten P1000, P200, P200, P20, P10 Abimed

Lyophille Loc-1m Alpha 2-4

Christ

NMR-Probenröhrchen

Shigemi Co. LTD

NeoBlock 12-2503

neoLab

pH-Meter 766 Calimatic

Knick

|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| pH-Elektrode InLab 423 (pH=0 bis pH=14,<br>0 °C bis 80 °C)                   | Mettler Toledo                       |
| Kristallisationsroboter Microsys 4000 XL                                     | Zinsser Analytic, Harvard Bioscience |
| Kristallisations-Kit Classics Suite  | Qiagen                               |
| Kristallisations-Kit MPD Suite   | Qiagen                               |
| Kristallisations-Kit Nucleix Suite   | Qiagen                               |
| Kristallisations-Kit PEG/Ion Suite   | Qiagen                               |
| Kristallisations-Kit Sparse Matrix II Suite                                  | Qiagen                               |
| Stromversorgung Gelelektrophorese<br>Power Pac 1000 V beziehungsweise 3000 V | Bio-Rad                              |
| Stromversorgung Gelelektrophorese<br>BRL PS9009 (bis 3000 V)                 | Gibco                                |
| Tube-O-Dialyzer (1kDa Cut-Off)   | Chemicon                             |
| UV DU-70   | Beckmann                             |
| Vortex Genie-2   | Scientific Industries                |
| Zentrifuge Avanti J-30I (bis 75000 g)  | Beckmann-Coulter                     |
| Zentrifuge 5415D (bis 16100 g)   | Eppendorf                            |

**Spektrometer**

|                                       |                |
|---------------------------------------|----------------|
| NMR-Spektrometer 900 MHz (21,1 Tesla) | Bruker         |
| mit Avance-Konsole                    | Bruker         |
| HCN Kalt-Probenkopf                   | Bruker Biospin |
| NMR-Spektrometer 800 MHz (18,8 Tesla) | Bruker         |
| mit DRX-Konsole                       | Bruker         |
| HCN Kalt-Probenkopf                   | Bruker Biospin |
| HCN Probenkopf mit Z-Gradienten       | Bruker Biospin |
| NMR-Spektrometer 700 MHz (16,4 Tesla) | Bruker         |
| mit Avance-Konsole                    | Bruker         |
| HCP Kalt-Probenkopf                   | Bruker Biospin |
| HCN Probenkopf mit XYZ-Gradienten     | Bruker Biospin |
| HCP Probenkopf mit XYZ-Gradienten     | Bruker Biospin |
| NMR-Spektrometer 600 MHz (14,0 Tesla) | Bruker         |
| mit Avance-Konsole                    | Bruker         |
| HCN Kalt-Probenkopf                   | Bruker Biospin |
| NMR-Spektrometer 600 MHz (14,0 Tesla) | Bruker         |
| mit DRX-Konsole                       | Bruker         |
| HCPN Probenkopf mit Z-Gradienten      | Bruker Biospin |
| HCN Probenkopf mit Z-Gradienten       | Bruker Biospin |

**Firma****Computerprogramme**

|                            |  |
|----------------------------|--|
| CNS                        | Brunger, A. T. et al., Yale University   |
| FELIX 2000.1               | Accelrys Inc., San Diego CA, USA         |
| Gaussian 03, Revision C.02 | Gaussian Inc., Wallingford CT, USA [167] |
| INSIGHT 2000               | Accelrys Inc., San Diego CA, USA         |
| MolMol Version 2K.1        | Konradi, R. [183]                        |
| Topspin Version 1.3        | Bruker, Karlsruhe                        |
| XWINNMR Version 3.1        | Bruker, Karlsruhe                        |

**Firma**

## 9.2 Methoden

### 9.2.1 RNA-Synthese

Die Isotopen markierten RNA-Oligonukleotide werden in einer *in vitro* Transkription mit DNA-abhängigen RNA-Polymerasen aus DNA-Templaten hergestellt. Dazu wird die ca. 98 kDa große Untereinheit einer RNA-Polymerase des T7-Bakteriophagen (T7-RNAP) verwendet [184], die aus Nukleosidtriphosphaten (NTPs) die Oligomere synthetisiert [185, 186]. Auch  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierte oder spezifisch deuterierte Nukleotide können für die Synthese verwendet werden [98, 187, 188].

Als Templat kann für die biochemische RNA-Synthese eine doppelsträngige DNA mit der Promotor-Region für die T7-RNAP am 3'-Ende verwendet werden [189] oder ein DNA-Plasmid mit der gewünschten RNA *Antisense*-Sequenz [190]. Für die Synthese der TAR-RNA wurde eine doppelsträngige Templat-DNA verwendet, während das lariatbildende Ribozym aus einem DNA-Plasmid synthetisiert wurde.

Bei der Transkription wird das DNA-Templat in  $3' \rightarrow 5'$ -Richtung abgelesen. Da bei der *in vitro* Transkription am 5'-Ende keine Stopsequenz vorhanden ist, da diese ohne sequenzspezifische Proteinfaktoren nicht wirksam ist, wird das Ende der Transkription nur durch das Ende der Templatsequenz gegeben. Jedoch synthetisiert die T7-RNAP häufig nach der letzten Templatbase weiter und fügt noch ein bis fünf Nukleotide an das 3'-Ende der synthetisierten RNA. Diese heterogenen RNA sind für die Strukturaufklärung mit der NMR-Spektroskopie ungeeignet. Deshalb wird das 3'-Ende der synthetisierten RNA durch Schneiden mit dem *Hammerhead* (HH)-Ribozym homogenisiert [191]. Das native HH-Motiv kann auf ein funktionelles Kerngerüst reduziert werden, das weiterhin katalytisch und einfach in der Handhabung ist [192]. Dieses ist in Abbildung 9.1 dargestellt.

Die Bedingungen für die Transkription müssen für jede Zielsequenz, also die TAR-RNA aus HIV-II und das lariatbildende Ribozym sowie für jedes Isotopenmarkierungsmuster optimiert werden. Neben der eigentlichen Sequenz spielt die Konzentration des DNA-Templats, des Enzyms, der Magnesiumionenkonzentration, der Nukleotide und die Reaktionszeit eine Rolle.

Die Aufreinigung der biochemisch synthetisierten RNA erfolgt mit der Gelelektrophorese. RNA-Sequenzen wie die TAR-RNA aus HIV-II mit 30 Nukleotiden lassen sich mit der Gelelektrophorese im analytischen und präparativen Maßstab bis auf  $\pm 1$  Nukleotid separieren. Große RNAs wie das lariatbildende Ribozym mit 59 Nukleotiden lassen sich schlechter mit der Gelelektrophorese auftrennen, da die



**Tabelle 9.1:** Ansatz für eine 40 mL Transkription der TAR-RNA aus HIV-II aus einem DNA-Doppelstrang.

| Edukte                    | Menge             |
|---------------------------|-------------------|
| TAR <i>Sense</i>          | 430 $\mu\text{g}$ |
| TAR <i>Antisense</i>      | 430 $\mu\text{g}$ |
| 10x Transkriptions-Puffer | 4 mL              |
| MgCl <sub>2</sub>         | 6 mM              |
| DTT                       | 10 mM             |
| PEG 8000                  | 64 $\mu\text{L}$  |
| IPP                       | 160 $\mu\text{L}$ |
| ATP                       | 5,0 mM            |
| CTP                       | 5,0 mM            |
| GTP                       | 5,0 mM            |
| UTP                       | 5,0 mM            |
| T7-RNAP                   | 8 mL              |
| H <sub>2</sub> O          | 22,0 mL           |

20 min bei 4°C wird der Überstand erneut mit 20 mL Chloroform versetzt und 5 min bei Raumtemperatur ausgeschüttelt. Daraufhin wird die wässrige Phase nochmals bei 3000 *g* für 20 min bei 4°C separiert. Zum Ausfällen der RNA wird die wässrige Phase auf 0,3 M Natriumchlorid eingestellt und im Verhältnis von 1:1 mit kaltem Isopropanol gemischt und für mindestens 12 h bei -20°C gelagert. Nach dem Pelletieren der RNA bei 75000 *g* wird diese getrocknet und anschließend bei Raumtemperatur in Wasser gelöst. Vor der Aufreinigung der Probe auf einem denaturierenden Polyakrylamidgel 15% wird die Probe zu gleichen Teilen mit dem Ladepuffer versetzt. Die Gelelektrophorese läuft bei 40–55 W für 12–16 h. Sobald die entsprechende RNA-Bande im UV-Licht visualisiert ist, wird diese ausgeschnitten und mit einer Elektroelution aus dem Polyakrylamidgel bei 4°C diffundiert. Die wässrige RNA-Lösung wird, wie oben bereits beschrieben, mit Natriumchlorid und Isopropanol gefällt, zentrifugiert und getrocknet. Daraufhin wird das Pellet in Wasser aufgenommen und gegen 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,6 dialysiert. Nach dem Trocknen der Probe kann diese dann in Deuteriumoxid oder einem Wasser/Deuteriumoxid Gemisch im Verhältnis 9:1 aufgenommen werden. Da die RNA

während des Reinigungsprozesses aggregiert, wird sie einem *Annealing* unterzogen. Dazu wird die Probe für zwei Minuten auf  $80^{\circ}\text{C}$  erhitzt und anschließend 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

### 9.2.1.2 Biochemische Synthese des *Hammerhead*-Ribozyms für das lariatformenden Ribozym

Das HH-Ribozym wird für die Herstellung des lariatbildenden Ribozyms benötigt, um ein homogenes 3'-Ende des Konstrukts zu ermöglichen. Die Synthese des HH-Ribozyms erfolgt mit unmarkierten Nukleotiden für 4 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  aus einem DNA-Plasmid, dessen Sequenz in Abbildung 9.3 dargestellt ist. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 9.2 aufgeführt.

```

5' AATTCTAATACGACTCACTATAGGCAGACCTGATGAGCTGAGGCTTGCCCTCAGCGAAACCAGGACTGCAGA 3'
3' GATTATGCTGAGTGATATCCGTCTGGACTACTCGACTCCGAACGGAGTCGCTTTGGTCCTGACGTC TTCGA 5'

```

**Abbildung 9.3:** Sequenz des DNA-Plasmids für das HH-Ribozym: EcoRI Restriktionsenzym (lila), Hind-III Restriktionsenzym (türkis), PstI Restriktionsenzym (rot), Promotor der T7-RNAP (grün), Ribozym-Sequenz (schwarz).

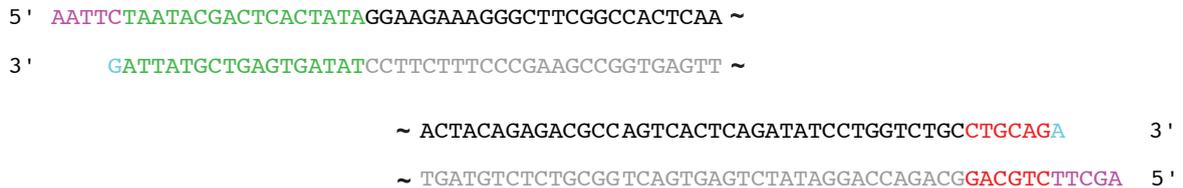
**Tabelle 9.2:** Ansatz für eine 20 mL Transkription des HH-Ribozyms aus einem DNA-Plasmid.

| Edukte                    | Menge                           |
|---------------------------|---------------------------------|
| Plasmid                   | 2,1 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ |
| 10x Transkriptions-Puffer | 2 mL                            |
| MgCl <sub>2</sub>         | 10 mM                           |
| DTT                       | 5 mM                            |
| PEG 8000                  | 32 $\mu\text{L}$                |
| IPP                       | 40 $\mu\text{L}$                |
| ATP                       | 5 mM                            |
| CTP                       | 5 mM                            |
| GTP                       | 5 mM                            |
| UTP                       | 5 mM                            |
| T7-RNAP                   | 5 mL                            |
| H <sub>2</sub> O          | 11,8 mL                         |

Die Aufreinigung erfolgt analog der Aufreinigung der TAR-RNA in Kapitel 9.2.1.1.

### 9.2.1.3 Biochemische Synthese des lariatformenden Ribozyms

Das lariatbildende Ribozym wird aus einem DNA-Plasmid, dessen Sequenz in Abbildung 9.4 dargestellt ist, synthetisiert.



**Abbildung 9.4:** Sequenz des DNA-Plasmids für das lariatformende Ribozym: EcoRI Restriktionsenzym (rosa), Hind-III Restriktionsenzym (türkis), PstI Restriktionsenzym (rot), Promotor der T7-RNAP (grün), Ribozym-Sequenz (schwarz).

Für die Transkription für 5 h bei 37 °C werden die in Tabelle 9.3 wiedergegebenen Bedingungen verwendet. Anschließend erfolgt die Aufreinigung der RNA, analog der in Kapitel 9.2.1.1 für die TAR-RNA beschriebenen Vorgehensweise.

**Tabelle 9.3:** Ansatz für eine 20 mL Transkription des <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-markierten lariatformenden Ribozyms aus einem DNA-Plasmid.

| Edukte                    | Menge       |
|---------------------------|-------------|
| Plasmid                   | 3,5 µg / µL |
| 10x Transkriptions-Puffer | 2 mL        |
| MgCl <sub>2</sub>         | 10 mM       |
| DTT                       | 5 mM        |
| PEG 8000                  | 32 µL       |
| IPP                       | 80 µL       |
| ATP                       | 4,25 mM     |
| CTP                       | 4,25 mM     |
| GTP                       | 4,25 mM     |
| UTP                       | 4,25 mM     |
| T7-RNAP                   | 4 mL        |
| H <sub>2</sub> O          | 10,4 mL     |

Es ist auf Grund der Größe des lariatformenden Ribozyms nicht möglich, dieses mit der Gelelektrophorese von seinen 3'-heterogenen Nebenprodukten zu trennen. Deshalb wird das Ribozym nach dem ersten Reinigungsschritt mit dem HH-Ribozym prozessiert, um ein homogenes 3'-Ende zu generieren. Im Puffer für die Schneidreaktion wird das HH-Ribozym mit dem lariatbildenden Ribozym in einem Verhältnis von 1,5 : 1 für 3 min auf 85 °C erhitzt und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur belassen. Anschließend werden 100 mM Magnesiumchlorid zugegeben und die Reaktionsmischung für 3 h auf 30 °C erwärmt.

Nach dem Schneiden des lariatformenden Ribozyms mit dem HH-Ribozym wird das Produkt erneut mit der Gelelektrophorese gereinigt.

#### 9.2.1.4 Verwendete RNA-Proben

Für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen und die Kristallisationsansätze wurden folgende RNA synthetisiert. Die in der Auflistung unerwähnten Nukleotide sind jeweils nicht Isotopen markiert.

- 1)  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markiertes Adenosin, Uracil, Cytosin, Guanosin Ribozym (0,67 mM und 0,35 mM)
- 2)  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markiertes Adenosin, Uracil Ribozym (0,7 mM)
- 3)  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markiertes Cytosin Ribozym (0,5 mM)
- 4)  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markiertes Guanosin Ribozym (0,3 mM und 0,3 mM)
- 5)  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markiertes Uracil Ribozym (0,3 mM)
- 6)  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markiertes Adenosin Ribozym (0,4 mM)
- 7)  $^2\text{H}$ - H3',H4', H5'H5"-markiertes Ribozym (0,2 mM)
- 8) nicht Isotopen markiertes Ribozym (0,3 mM)
  
- 9)  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierte Adenosin, Uracil, Cytosin, Guanosin TAR-RNA (1,5 mM)
- 10)  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierte Guanosin TAR-RNA (1,2 mM)
- 11)  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierte Uracil TAR-RNA (0,8 mM)

## 9.2.2 NMR-Experimente

In der NMR wird die Wechselwirkung der Atomkerne mit Radiowellen ausgenutzt, nachdem sich die Kerne in einem äußeren magnetischen Feld  $B_0$  ausgerichtet haben. Dabei kommt es zu einer Interaktion zwischen dem magnetischen Moment der Kerne und den eingestrahlten Wellen. Die Magnetisierung der Kerne kann quantenmechanisch mit Hilfe des Produktoperatorformalismus beschrieben werden [193]. Dieses mathematische Instrument hilft, die experimentellen Ergebnisse zu verstehen.

Die für diese Arbeit ausschlaggebenden Experimente werden nun im Folgenden beschrieben. Dazu gehören das 3D  $^{13}\text{C}$ -editierte  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -gefilterte NOESY, 3D HCCH-COSY TOCSY, HCCH-E.COSY, PH-ct-COSY und das HCN der Ribose.

### 9.2.2.1 Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy

Das NOESY ist ein Experiment, in dem in zwei Dimensionen die chemischen Verschiebungen der durch NOE wechselwirkenden Spins dargestellt werden [52]. Der NOE spiegelt sich in der Änderung der Intensität des NMR-Signals eines Spins I durch die Wechselwirkung mit einem anderen Spin S wieder. Diese Wechselwirkung spielt sich über den Raum ab, die beiden Spins müssen nicht aneinander gebunden sein. Die beiden Spins können dabei bis zu 5 Å voneinander entfernt sein. Daten basierend auf NOESY-Spektren stellen deshalb bei großen Molekülen die einzige direkte Information über Atomabstände dar [173]. Die Pulssequenz für ein NOESY-Experiment ist in Abbildung 9.5 dargestellt.

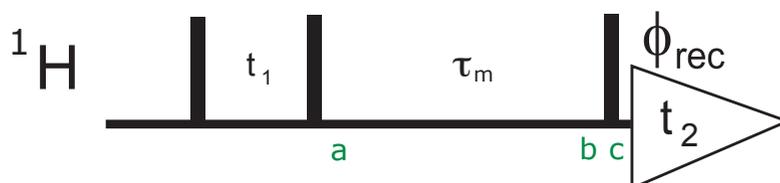


Abbildung 9.5: Die Pulssequenz des NOESY-Experiments.

Die Magnetisierung liegt nach den ersten beiden  $90^\circ$ -Pulsen in der Form (a)

$$H_z \rightarrow -H_z \cos(\Omega t_1) + H_x \sin(\Omega t_1) \quad (9.1)$$

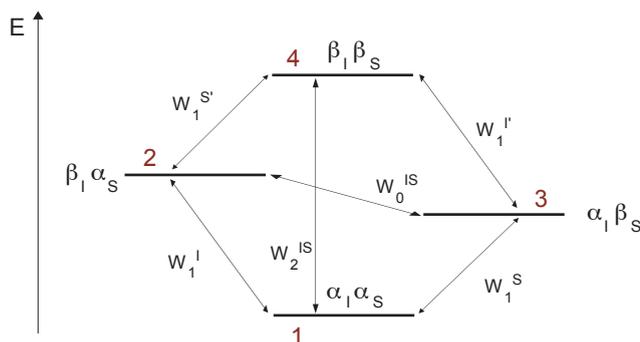
vor, wobei die transversale Magnetisierung  $H_x \sin(\Omega t_1)$  durch einen Phasenzyklus oder einen Gradienten eliminiert werden kann. In der Mischzeit  $\tau_m$  wird durch Rela-

xation über eine dipolare Kopplung Magnetisierung auf die anderen Kerne S transferiert (b).

$$-H_z \cos(\Omega t_1) \rightarrow -H_z \cos(\Omega t_1) a_{II}(\tau_m) - S_z \cos(\Omega t_1) a_{IS}(\tau_m) \quad (9.2)$$

Der letzte  $90^\circ$ -Puls generiert wieder transversale, detektierbare Magnetisierung (c).

Der Magnetisierungsübertrag durch die dipolare Kopplung ist wie folgt erklärbar: Zwei Spins H und S können vier unterschiedliche Energieniveaus eingehen, wie in Abbildung 9.6 gezeigt. Durch Relaxation kommt es zu Übergängen zwischen allen vier Niveaus; auch Übergänge zwischen Energieniveaus können stattfinden, die normalerweise verboten sind. Die quantenmechanisch erlaubten Energieübergänge sind in Abbildung 9.6 als  $W_1^I$  und  $W_1^S$  dargestellt. Bei diesen Übergängen handelt es sich um Einquantenübergänge; die in der Abbildung mit  $W_0^{IS}$  und  $W_2^{IS}$  bezeichneten Übergänge sind Nullquanten- und Doppelquantenübergänge.



**Abbildung 9.6:** Energieschema für zwei Spins I und S mit  $I=1/2$ .

Die Übergänge zwischen den verschiedenen Energieniveaus können statistisch mit der Salomon-Gleichung behandelt werden. Die I-Magnetisierung entspricht dabei der Differenz der Populationen der Übergänge 1-2 und 3-4 im Energieschema.

$$I_z = n_1 - n_2 + n_3 - n_4 \quad (9.3)$$

Für die S-Magnetisierung gilt analog:

$$S_z = n_1 - n_3 + n_2 - n_4 \quad (9.4)$$

Bei den beiden oben beschriebenen Kohärenzen handelt es sich um Einquanten-Übergänge. Ähnlich können die Null- und Doppelquantenkohärenzen mit der Mischmagnetisierung  $2I_z S_z$  beschrieben werden.

$$2I_z S_z = n_1 - n_4 + n_3 - n_2 \quad (9.5)$$

Die Populationen der Energieniveaus werden nicht absolut behandelt. Vielmehr wird nur die Abweichung vom Gleichgewichtszustand betrachtet. Dies führt zu drei zeitabhängigen Gleichungen. In Formel 9.6 ist der zeitliche Verlauf der I-Magnetisierung aufgeführt. Analog sehen die Gleichungen für die anderen Magnetisierungen aus.

$$\frac{dI_z}{dt} = \frac{d(n_1 - n_2)}{dt} + \frac{d(n_3 - n_4)}{dt} \quad (9.6)$$

Diese drei Differentialgleichungen sind lösbar. Für die  $I_z$ -Magnetisierung sieht die Gleichung wie folgt aus:

$$\begin{aligned} \frac{d(I_z - I_z^0)}{dt} &= -(W_1^I + W_1^{I'} + W_2^{IS} + W_0^{IS}) (I_z - I_z^0) \\ &\quad - (W_2^{IS} - W_0^{IS}) (S_z - S_z^0) \\ &\quad - (W_1^I - W_1^{I'}) \quad 2I_z S_z \end{aligned} \quad (9.7)$$

$I_z^0$  und  $S_z^0$  stellen die Magnetisierung im Gleichgewichtszustand dar,  $W_x^y$  die Übergangswahrscheinlichkeit, die zwischen den unterschiedlichen Energieniveaus auftreten können. Die Gleichung zeigt, dass die Population von  $I_z$  nicht nur von den Übergängen  $I_z - I_z^0$  abhängt, sondern auch von  $S_z - S_z^0$  und  $2I_z S_z$ . Die beiden Magnetisierungen I und S sind dadurch voneinander abhängig; ändert sich die Population von  $I_z$ , ändert sich auch die Population von  $S_z$ . Dieses Phänomen wird als Kreuzrelaxation bezeichnet. Der erste Term der Gleichung 9.7 stellt die Relaxation von Spin I unabhängig von Spin S dar. Diese Relaxation tritt auch auf, wenn keine Null- und Doppelquantenübergänge möglich sind. Der zweite Term der Gleichung 9.7 gibt die Kreuzrelaxation zwischen Spin I und Spin S wieder. Auf diesem Term beruht der NOE, führt doch die Änderung der Population von Spin I zu einer Änderung der Zustandsdichte von Spin S. Der Faktor  $(W_2^{IS} - W_0^{IS})$  wird auch als Kreuzrelaxationskonstante  $\sigma_{IS}$  bezeichnet. In den Operatoren der Kreuzrelaxation ist der Abstand der beiden Spins in der Form  $r^{-6}$  enthalten. Der dritte Term beschreibt den Transfer von  $I_z S_z$ -Magnetisierung in reine Magnetisierung des Spins I. Nur wenn die Raten der Übergänge  $W_1^I$  und  $W_1^{I'}$  ungleich sind, findet ein Energieübergang statt. Dies tritt nur auf, wenn Kreuzkorrelation zwischen verschiedenen Relaxationsmechanismen stattfindet.

Der NOE führt zum Auftreten von Kreuzsignalen von Spins, die nicht mehr als 5 Å von einander entfernt sind, wobei die Signalintensität von der Entfernung der beiden Spins abhängt.



Durch zwei  $90^\circ$ -Pulse auf Protonen und Kohlenstoff wird nun  $-2H_y C_z \cos(\Omega t_1)$  Magnetisierung generiert. Die Protonen evolvieren in der nun folgenden *semi-constant-time* Periode (*semi-ct*) [195]  $t_2$  (c):

$$-2H_y C_z \cos(\Omega t_1) \rightarrow H_x \cos(\Omega t_1) \cos(\Omega t_2) + H_y \cos(\Omega t_1) \sin(\Omega t_2) \quad (9.9)$$

Die durch einen  $90^\circ$ -Puls auf Protonen vorliegende longitudinale Magnetisierung kreuzrelaxiert in der Mischzeit  $\tau_m$  zu  $H_{1z} a_{H1H2} \tau_m + H_{2z} a_{H1H2} \tau_m$  (d). Darauf hin folgt der  $^{13}\text{C}$ - (A) oder  $^{12}\text{C}$ -Filter (B). Die  $^{13}\text{C}$ -Magnetisierung wird in dem Filter durch einen WURST-Puls (Pulse Gamma  $\Gamma$  und Xi  $\Xi$ ) abhängig von der chemischen Verschiebung des Kohlenstoffs und der Rate, mit der der adiabatische Puls durch den Frequenzbereich fährt, invertiert [196, 197]. Nach dem WURST-Puls ist die Magnetisierung der  $^{13}\text{C}$ -gebundenen Protonen Antiphase und der  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen Inphase. Der Gradient G6 im  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY (A) dephasiert daraufhin die Magnetisierung von  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen. Im  $^{13}\text{C}$ -editierten  $^{12}\text{C}$ -gefilterten NOESY liegt die  $^{13}\text{C}$ -Magnetisierung durch den  $90^\circ$ (y)-Puls in (B) transversal vor und dephasiert durch den Gradient G6. In einem weiteren, durch einen WURST-Puls auf Kohlenstoff  $^{13}\text{C}$  modifizierten INEPT-Schritt wird die Magnetisierung zurück auf Protonen übertragen und detektiert (e).

### Experimentelle Daten: 3D $^{13}\text{C}$ -editiertes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -gefiltertes NOESY

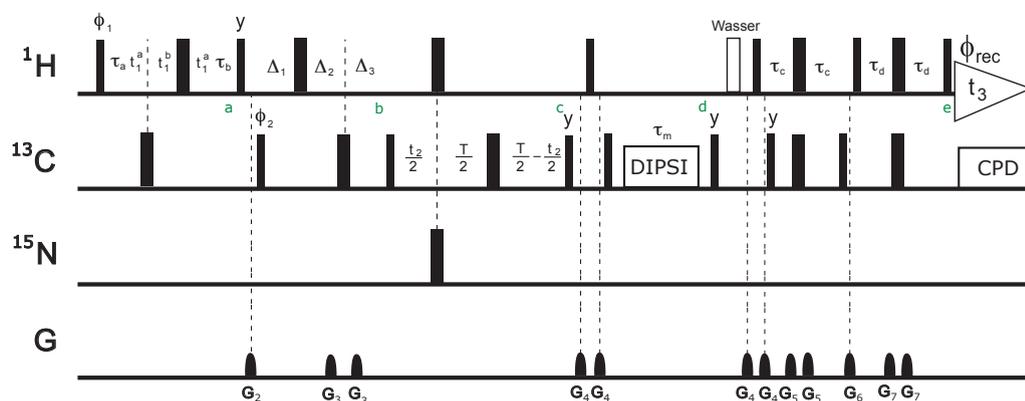
Es werden  $2k$  ( $t_3$ ) x  $118$  ( $t_2$ ) x  $170$  ( $t_1$ ) Datenpunkte aufgenommen. Die Anzahl der *Scans* beträgt 8. Die Relaxationszeit nach jedem *Scan* wird auf 1,2 s gesetzt. Bei der Messung entspricht die Trägerfrequenzen o1p der Frequenz des Wassers, o2p( $^{13}\text{C}$ ) = 114,0 ppm und o3p( $^{15}\text{N}$ ) = 165,0 ppm. Die Spektrale Weite SW wird in  $\omega_3 = 10,0$  ppm,  $\omega_2 = 7,7$  ppm und  $\omega_1 = 54,0$  ppm gesetzt. Die NOESY-Mischzeit  $\tau_m$  beträgt 150 ms und 300 ms. Die adiabatische Stickstoff-Entkopplung mit einem *chirp*-Puls hat eine Feldstärke von 400 Hz bei einer Protonenfrequenz von 800 MHz. Die adiabatische Kohlenstoff-Entkopplung mit einem *chirp*-Puls besitzt eine Feldstärke von 2 kHz. Die Wurst-Pulse des  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Filters weisen eine Länge von  $\Gamma = 1859$  ns und  $\Xi = 2358$  ns mit einer Bandbreite von 80 kHz und einem *offset* von -12 kHz auf. Die Gradienten haben eine Feldstärke von  $G_1^z = 7,5$  G/cm,  $G_2^z = 5$  G/cm,  $G_3^z = 15$  G/cm,  $G_4^z = 20$  G/cm,  $G_5^z = 5$  G/cm,  $G_6^z = 17,5$  G/cm,  $G_7^z = 25$  G/cm und  $G_8^z = 15$  G/cm.

## Experimentelle Daten: 3D $^{13}\text{C}$ -editiertes NOESY

Es werden  $2k(t_3) \times 140(t_2) \times 140(t_1)$  Datenpunkte aufgenommen. Die Anzahl der *Scans* beträgt 8. Die Relaxationszeit nach jedem *Scan* wird auf 1,7 s gesetzt. Bei der Messung entspricht die Trägerfrequenzen 01p der Frequenz des Wassers, 02p( $^{13}\text{C}$ ) = 114,0 ppm und 03p( $^{15}\text{N}$ ) = 165,0 ppm. Die Spektrale Weite SW wird in  $\omega_3 = 12,0 \text{ ppm}$ ,  $\omega_2 = 7,7 \text{ ppm}$  und  $\omega_1 = 54,0 \text{ ppm}$  gesetzt. Die NOESY-Mischzeit  $\tau_m$  beträgt 150 ms. Die adiabatische Stickstoff-Entkopplung mit einem *chirp*-Puls weist eine Feldstärke von 400 Hz bei einer Protonenfrequenz von 800 MHz auf, die adiabatische Kohlenstoff-Entkopplung mit einem *chirp*-Puls besitzt eine Feldstärke von 650 Hz. Die Gradienten haben eine Feldstärke von  $G_1^z = 15 \text{ G/cm}$ ,  $G_2^z = 10 \text{ G/cm}$ ,  $G_3^z = 25 \text{ G/cm}$ ,  $G_4^z = 30 \text{ G/cm}$ ,  $G_5^z = -7,5 \text{ G/cm}$  und  $G_8^z = 27,5 \text{ G/cm}$ .

### 9.2.2.3 Das 3D HCCH-COSY TOCSY

Für die Zuordnung der Resonanzen in der Ribose bietet sich das 3D HCCH-COSY TOCSY an [85], das auf dem HCCH-TOCSY [198, 199] und HCCH-COSY basiert [200, 201]. Mit diesem Spektrum ist es, wie bereits in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben, möglich, alle Kohlenstoff- und Wasserstoffresonanzen in der Ribose der RNA zu zuordnen. Dazu kann ein sequentieller Lauf durch das Spinsystem in der Ribose von den Protonen zu den Kohlenstoffatomen durchgeführt werden.



**Abbildung 9.8:** Pulssequenz des HCCH-COSY TOCSY. Der Phasenzyklus lautet  $\phi_1 = x, -x$ ;  $\phi_2 = 2(x), 2(-x)$ ;  $\phi_{rec} = x, 2(-x), x$ . Die Perioden betragen  $T = 6,4 \text{ ms}$ ,  $\Delta_1 = 1,0 \text{ ms}$ ,  $\Delta_2 = 2,2 \text{ ms}$ ,  $\Delta_3 = 3,2 \text{ ms}$ ,  $\tau_a = \tau_b = 1,5 \text{ ms}$ ,  $\tau_c = 1,0 \text{ ms}$ ,  $\tau_d = 1,6 \text{ ms}$ .

Zunächst wird die Magnetisierung der Protonen  $H_{1'z}$  mit einem  $90^\circ$ -Puls in die transversale Ebene gebracht. Anschließend evolviert deren chemische Verschiebung in der semi-ct Periode  $t_1$  und die Kopplung zu den Kohlenstoffatomen für  $\tau_a$  und  $\tau_b$  in einem INEPT mit (a)

$$-H_{1'y} \rightarrow 2H_{1'x}C_{1'z} \cos(\Omega t_1) + 2H_{1'y}C_{1'z} \sin(\Omega t_1) \quad (9.10)$$

Anschließend wird in einem COSY-Schritt die Magnetisierung auf die benachbarten Kohlenstoffatome übertragen (b).

$$-2H_{1'z}C_{1'y} \cos(\Omega t_1) \rightarrow C_{1'x} \cos(\Omega t_1) \cos(\pi J \Delta) \quad (9.11a)$$

$$+ C_{1'y}C_{2'z} \cos(\Omega t_1) \sin(\pi J \Delta) \quad (9.11b)$$

Die Kopplung zu den Protonen  $J_{CH}$  evolviert für  $\Delta_1 - \Delta_2 + \Delta_3 = 2$  ms. Damit evolviert die Magnetisierung in Form der Kopplung für ca.  $\frac{1}{4J_{CH}}$ . Dadurch wird die  $J_{CH}$ -Kopplung refokussiert. Die Kopplung zwischen den Kohlenstoffatomen  $J_{C1'C2'}$  evolviert für  $\Delta_1 + \Delta_2 + \Delta_3 = 6,4$  ms. Dies führt zu den COSY-Kreuzsignalen zwischen den Kohlenstoffatomen. Daraufhin folgt nach einem  $90^\circ(x)$ -Puls die ct-Evolution der chemischen Verschiebung des Kohlenstoffs. Die Magnetisierung liegt nun in der Form (c)

$$-C_{1'z}C_{2'y} \cos(\Omega t_1) \sin(\pi J \Delta) \rightarrow C_{2'x} \cos(\Omega t_1) \sin(\pi J \Delta) \cos(\Omega t_2) \quad (9.12a)$$

$$+ C_{2'y} \cos(\Omega t_1) \sin(\pi J \Delta) \sin(\Omega t_2) \quad (9.12b)$$

vor. In der ct-Evolution wird die homonukleare  $J_{C1'C2'}$ -Kopplung für 6,4 ms evolviert und dadurch der  $C_{1'z}$ -Operator eliminiert. Nun folgt die TOCSY-Mischzeit  $\tau_m$  mit einer DIPSI-2 Sequenz [202]. Diese Mischsequenz besteht aus einer Reihe von Pulsen abwechselnder Phase (y, -y). Durch diese Pulse wird die energetische Differenz zwischen den verschiedenen Spins eliminiert, die aus der chemischen Verschiebung resultiert und die Energieniveaus gleichen sich an. Es kommt zum Kohärenztransfer zwischen den Kohlenstoffatomen in der Ribose, der nur von der Kopplung der Spins abhängig ist (d).

$$C_{2'x} \cos(\Omega t_1) \sin(\pi J \Delta) \cos(\Omega t_2) \rightarrow \sum_{k=1} C_{2'y_k} C_{3'/4'/5'y_k} a_k \tau_m \quad (9.13a)$$

$$\cos(\Omega t_1) \sin(\pi J \Delta) \cos(\Omega t_2) \quad (9.13b)$$

$a_k$  ist ein Skalierungsfaktor für den TOCSY-Transfer. In erster Näherung sollte er bei einem effektiven Transfer  $\sum_{k=1} a_k = 1$  betragen. Eine transversale Relaxation

wäre in diesem Fall vernachlässigt. Die Gradienten G4 vor und nach der Mischzeit zerstören die aus der  $ct$ -Evolutionsperiode stammenden Antiphase-Terme, die zu einem gezielten TOCSY-Transfer führen könnten [203]. Nach der Mischzeit  $\tau_m$  wird in einem INEPT-Schritt die Magnetisierung zurück auf die Protonen transferiert und detektiert (e). Während der Aquisition wird mit einer GARP-Sequenz der Kohlenstoff entkoppelt [204].

Im Spektrum sind in der direkten  $^1H$ -Ebene die TOCSY-Signale und in der indirekten  $^1H$ -Ebene die COSY-Signale zu sehen. Über die  $^{13}C$ -chemischen Verschiebungen können dann die Resonanzen für die ganze Ribose zugeordnet werden.

### Experimentelle Daten: HCCH-COSY TOCSY

Es werden  $2k (t_3) \times 66 (t_2) \times 114 (t_1)$  Datenpunkte aufgenommen. Die Anzahl der *Scans* beträgt 16. Die Relaxationszeit nach jedem *Scan* wird auf 1,8 s gesetzt. Bei der Messung entspricht die Trägerfrequenzen  $\omega_1$  der Frequenz des Wassers,  $\omega_2$  ( $^{13}C$ ) = 79,0 ppm und  $\omega_3$  ( $^{15}N$ ) = 158,0 ppm. Die Spektrale Weite SW wird in  $\omega_3 = 5,0 \text{ ppm}$ ,  $\omega_2 = 27,0 \text{ ppm}$  und  $\omega_1 = 4,0 \text{ ppm}$  gesetzt. Die Länge des COSY beträgt 3,2 ms. Das DIPSI-2 weist eine Feldstärke von 31 kHz mit einer Mischzeit von 8 ms oder 22 ms auf. Die GARP-Entkopplung besitzt eine Feldstärke von 7,1 kHz. Die Gradienten haben eine Feldstärke von  $G_2^z = 25 \text{ G/cm}$ ,  $G_3^z = 5 \text{ G/cm}$ ,  $G_4^z = 15 \text{ G/cm}$ ,  $G_5^z = 12,5 \text{ G/cm}$ ,  $G_6^z = 30 \text{ G/cm}$  und  $G_7^z = 9 \text{ G/cm}$ .

#### 9.2.2.4 Experimente zur Bestimmung des *sugar pucker*: das HCCH-E.COSY

Die Konformation des Zuckerpuckers kann über diverse homo- und heteronukleare Kopplungen bestimmt werden [205]. Dazu gehören die  $^3J_{H1'H2'}$ ,  $^3J_{H3'H4'}$ ,  $^3J_{H3'C1'}$  und  $^3J_{H2'C4'}$ -Kopplungen sowie die  $^2J_{H2'C1'}$ ,  $^2J_{H2'C3'}$ ,  $^2J_{H3'C2'}$  und  $^2J_{H3'C4'}$ -Kopplungen. Auch die  $^1J_{H2'C2'}$ - und  $^1J_{H3'C3'}$ -Kopplungen spiegeln die Konformation der Ribose wieder.

Die heteronuklearen  $^3J_{H3'C1'}$ - und  $^3J_{H2'C4'}$ -Kopplungen hängen von der Konformation des Zuckers ab, während die  $^3J_{H1'C3'}$ - und  $^3J_{H4'C2'}$ -Kopplungen nur wenig vom *sugar pucker* der Ribose beeinflusst werden. In der C2'-endo-Konformation beträgt die  $^3J$ -Kopplung zwischen dem H3'- und dem C1'-Atom ca. 6,5 Hz, während sie in der C3'-endo-Konformation ca. 2 Hz beträgt. Die  $^3J$ -Kopplung zwischen dem H2'- und C4'-Atom beträgt in der C2'-endo-Konformation ca. 0,5 Hz, in der C3'-endo-

Konformation 4,2 Hz. Die  ${}^3J_{H1'H2'}$ -Kopplungen sind in der C3'-endo-Konformation klein; in der C2'-endo-Konformation groß. Die  ${}^3J_{H3'H4'}$ -Kopplungen sind im Gegensatz dazu in der C3'-endo-Konformation groß und klein in der C2'-endo-Konformation [205].

Der Übergang der Ribose von der C3'-endo- in die C2'-endo-Konformation spiegelt sich in einem Wechsel des Vorzeichens der  ${}^2J_{H2'C1'}$ -,  ${}^2J_{H2'C3'}$ -,  ${}^2J_{H3'C2'}$ - und  ${}^2J_{H3'C4'}$ -Kopplungen wider. Steht das Hx'-Atom in der Konformation trans zu einem elektronegativen Y-Atom, ist das Vorzeichen der Kopplung positiv (C3'-endo-Konformation); stehen beide Atome in einer gauche-Konformation, ist das Vorzeichen negativ (C2'-endo-Konformation). Der Vorzeichenwechsel kommt durch die elektronegativen Substituenten der Ribose, sei es das O4'- oder das N1- beziehungsweise N9-Atom der Base. In der C3'-endo-Konformation steht so das stark elektronegative O4'-Atom trans zum H2', während das weniger elektronegative N1- beziehungsweise N9-Atom gauche zum H2'-Atom steht. Das Vorzeichen basiert also auf der Wechselwirkung mit den beiden Substituenten und führt zu dem positiven Vorzeichen der Kopplung auf Grund des stärkeren Effekts des O4'-Atoms.

Die  ${}^1J_{C'H'}$ -Kopplungen sind von der Konformation der Ribose und dem Winkel  $\chi$  zwischen Base und Zucker, der in Abbildung 9.9 dargestellt ist, abhängig. In der C2'-endo-Konformation beträgt die  ${}^1J_{C2'H2'}$ -Kopplung ca. 149 Hz, in der C3'-endo-Konformation ca. 159 Hz. Die  ${}^1J_{C3'H3'}$ -Kopplung beträgt in der C2'-endo-Konformation ca. 159 Hz, in der C3'-endo-Konformation 149 Hz.

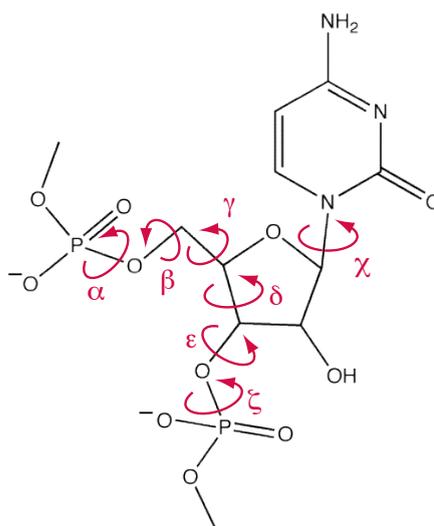
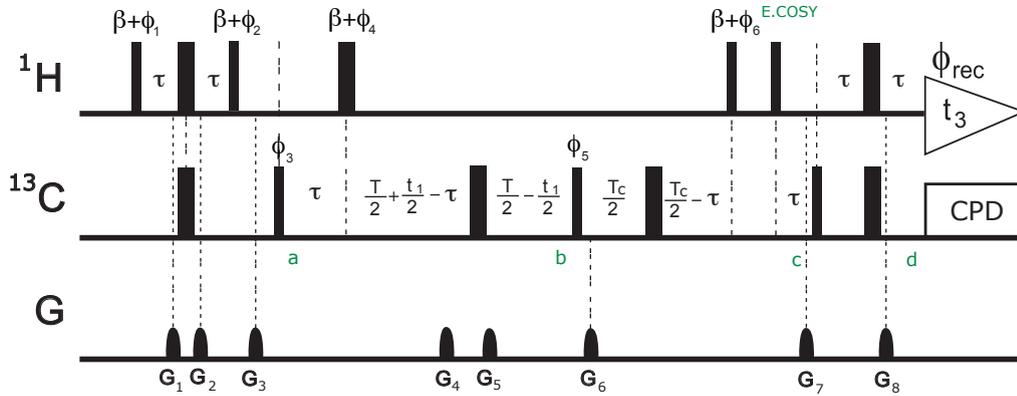


Abbildung 9.9: Nomenklatur der Winkel in der RNA.



**Abbildung 9.10:** Pulssequenz des HCCH-E. COSY. Der Phasenzyklus lautet  $\phi_1=7(-y)$ ,  $6(y+360^\circ)$ ,  $-y+360^\circ$ ;  $\phi_2=6(-y)$ ,  $y+360^\circ$ ;  $\phi_3=14(x)$ ,  $14(-x)$ ,  $\phi_4=6(y)$ ,  $-y$ ;  $\phi_5=28(x)$ ,  $28(-x)$ ;  $\phi_6=6(y)$ ,  $-y$ ;  $\phi_{rec}=7(x)$ ,  $14(-x)$ ,  $7(x)$  mit  $\beta=8$ .  $\tau$  beträgt 1,5 ms,  $T$  15 ms,  $T_c$  12 ms.

In dieser Arbeit beschränkt sich die Untersuchung der Konformation der Ribose auf die Interpretation von  ${}^3J_{H_1'H_2'}$ -Kopplungen. Für die Bestimmung der  ${}^3J$ -Kopplungen wird ein HCCH-E.COSY eingesetzt.

Das HCCH-E.COSY dient der Messung von  ${}^3J$ -Kopplungen zwischen Protonen in der Ribose [101, 102]. In der  $\omega_2$ -Dimension der Protonen können homonukleare Kopplungen aus der Aufspaltung der Signale extrahiert werden, die in der  $\omega_1$ -Dimension des Kohlenstoffs durch die  ${}^1J_{HC}$ -Kopplung getrennt sind. Die Pulssequenz ist in Abbildung 9.10 dargestellt.

Mit Hilfe eines INEPT-Schrittes wird die Magnetisierung von den Protonen auf den Kohlenstoff übertragen (a). Sie liegt nun in der Form  $2H_zC_y$  vor. In der nun folgenden Evolution entwickelt sich die chemische Verschiebung der Kohlenstoffatome für  $\frac{t_1}{2} + \frac{T}{2} - (\frac{T}{2} - \frac{t_1}{2}) = t_1$ . Die heteronukleare Kopplung zwischen den Spins C und H evolviert für  $\tau - \frac{T}{2} + \tau - \frac{t_1}{2} + (\frac{T}{2} - \frac{t_1}{2}) = -t_1 + 2\tau$ . Die Kopplung führt in der Evolution  $t_1$  zur In-Phase Aufspaltung der Resonanzen in der  $\omega_1$ -Dimension. Da das Zeitintervall  $2\tau = \frac{1}{2J_{HC}}$  gesetzt wird, evolviert die Magnetisierung mit der Kopplung  $J_{HC}$  in der Form:

$$2H_zC_y \rightarrow -C_x \quad (9.14)$$

Die homonukleare Kopplung zwischen den Spins C evolviert für die Zeit T (b).

$$-C_x \rightarrow -2C_{1y}C_{2z} \sin(\pi J_{C_1C_2}T) \quad (9.15)$$

Da das Zeitintervall T konstant ist, beeinflusst es die Amplitude des Signals. Eine Beeinträchtigung der Intensitäten der Resonanzen wird verhindert, indem  $T = \frac{1}{2J_{CC}}$  gesetzt wird.

Durch den nun folgenden 90°-Puls wird die Magnetisierung von  $C_2$  in die transversale Ebene gebracht (c).

$$-2C_{1y}C_{2z} \rightarrow -2C_{1z}C_{2y} \tag{9.16}$$

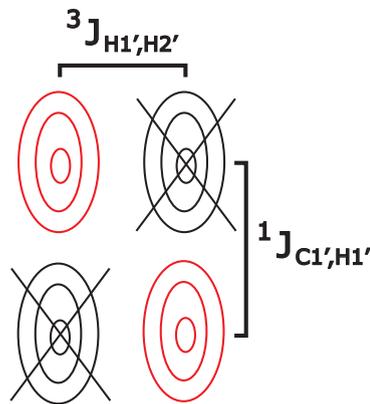
In der Zeit  $2\tau$  entwickelt sich für  $2\tau = \frac{1}{2J_{HC}}$  die heteronukleare Kopplung zwischen Spin H und Spin C.

$$2C_{1z}C_{2y} \rightarrow 4C_{1z}C_{2x}H_{2z} \tag{9.17}$$

Die homonukleare Kopplung  $J_{CC}$  entwickelt sich für  $T_c$ .

$$4C_{1z}C_{2x}H_{2z} \rightarrow 2C_{2y}H_{2z} \sin(\pi J_{CC}T_c) \tag{9.18}$$

Das Zeitintervall  $T_c$  wird dabei  $\frac{1}{4J_{CC}}$  gesetzt. Dies ist das ideale Zeitintervall für



**Abbildung 9.11:** Aufspaltung der Resonanzen eines HCCH-E. COSY. Aus der Aufspaltung in der  $\omega_2$ -Dimension der Protonen ist die  ${}^3J_{H1',H2'}$ -Kopplung der Protonen extrahierbar.

Kohlenstoffatome mit zwei koppelnden Partnern, damit die Kopplung die Signalintensität nicht beeinträchtigt. Nach dem E.COSY Element wird die Magnetisierung in einem INEPT-Schritt zurück auf den Spin H übertragen und anschließend detektiert (e).

Das E.COSY Prinzip garantiert, dass die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Spinzustände des  $H_1$  nach der Evolutionszeit  $t_1$  nicht gemischt werden. Es basiert auf einer Extraktion der Kopplung zwischen dem Spin  $H1'$  und  $H2'$  aus dem relativen Abstand der einzelnen Komponenten eines Kreuzsignals zwischen Spin  $H1'$  und  $C1'$ . In einer Dimension enthält das Kreuzsignal die Kopplung  $J_{H1',H2'}$  und in der anderen Dimension die Kopplung  $J_{H1',C1'}$ . Um die Kopplung der beiden Spins  $H1'$  und  $H2'$  mit dieser Methode messen zu können, wird also ein dritter Spin  $C1'$  benötigt, der eine gut aufgelöste Kopplung mit dem Spin  $H2'$  besitzt. Außerdem muss die Magnetisierung von Spin  $H1'$  auf Spin

C1' transferierbar sein, ohne die Spinpolarisation von Spin H2' zu beeinträchtigen. In Abbildung 9.11 ist die Aufspaltung der Signale eines HCCH-E.COSY dargestellt. Aus der Aufspaltung in der  $\omega_2$ -Dimension kann die homonukleare  $J_{H1,H2}$ -Kopplung extrahiert werden. Durch das E.COSY besitzen zwei Signale die volle Intensität und die beiden anderen Signale nur eine geringe Intensität, so dass sie kaum sichtbar sind. Die Aufspaltung der Resonanzen in der  $\omega_1$ -Dimension erleichtert die Auswertung kleiner Kopplungen in  $\omega_2$ , weil diese durch die Linienbreiten der Signale nicht überdeckt werden.

### Experimentelle Daten: HCCH-E.COSY

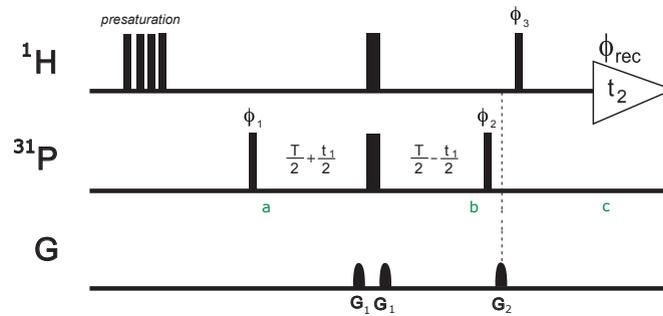
Es werden  $2k(t_2) \times 128(t_1)$  Datenpunkte aufgenommen. Die Anzahl der *Scans* beträgt 840. Die Relaxationszeit nach jedem *Scan* wird auf 1,8 s gesetzt. Bei der Messung entspricht die Trägerfrequenzen 01p der Frequenz des Wassers und 02p( $^{13}C$ ) = 79,0 ppm. Die Spektrale Weite SW wird in  $\omega_2 = 11,0 \text{ ppm}$  und  $\omega_1 = 31,5 \text{ ppm}$  gesetzt. Die Länge des COSY beträgt 7,5 ms. Die Gradienten haben eine Feldstärke von  $G_0^z = 12,5 \text{ G/cm}$ ,  $G_1^z = 5 \text{ G/cm}$ ,  $G_2^z = 12,5 \text{ G/cm}$ ,  $G_3^z = 2,5 \text{ G/cm}$  und  $G_4^z = 15 \text{ G/cm}$ .

#### 9.2.2.5 Das PH-ct-COSY

Die Struktur der RNA wird vor allem durch die Basenpaarung und das Phosphatrückgrat beeinflusst. In der NMR-Spektroskopie können die Dihedralwinkel des Phosphatrückgrats  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ , dargestellt in Abbildung 9.9, durch homo- und heteronukleare Kopplungen  $J_{HH}$ ,  $J_{PH}$ ,  $J_{CP}$  und  $J_{CH}$  bestimmt werden [206, 207]. Jedoch ist die Messung der  $^3J_{PH}$ -Kopplung problematisch, da die chemischen Verschiebungen  $\delta$  sehr ähnlich sind und somit die passiven  $J_{HH}$ -Kopplungen in der Ribose nicht selektiv refokussiert werden können. Mit Hilfe eines PH-ct-COSY können die  $^3J_{P,H3'}$ - und  $^3J_{P,H5'}$ -Kopplungen gemessen werden [106].

Die Pulssequenz ist in Abbildung 9.12 dargestellt. Die Magnetisierung des Phosphors wird mit einem  $90^\circ$ -Puls in die transversale Ebene gebracht und liegt dann in der Form  $-P_y$  vor (a). Während der darauf folgenden ct-Evolutionsperiode entwickelt sich die Magnetisierung unter der  $J_{PH}$ -Kopplung und liegt anschließend in der Form (b)

$$2P_x H_{1z} \sin(\pi J_{H1P} T) \Pi_k \cos(\pi J_{HkP} T) e^{-R_2^* T} \quad (9.19)$$



**Abbildung 9.12:** Pulssequenz des PH-ct-COSY. Die Phasen der Pulse lauten  $\phi_1=x, -x$ ;  $\phi_2=2(y), 2(-y)$ ;  $\phi_3=4(x), 4(-x)$ ;  $\phi_{rec}=x, 2(-x), x, -x, 2(x), -x$ . Die totale Evolutionszeit  $T$  beträgt 30 ms.

vor. Durch die zwei  $90^\circ$ -Pulse auf Phosphor und Protonen wird die Magnetisierung in die observierbare Form (c)

$$2P_z H_{1y} \sin(\pi J_{H_1 P} T) \Pi_k \cos(\pi J_{H_k P} T) e^{-R_2^* T} \quad (9.20)$$

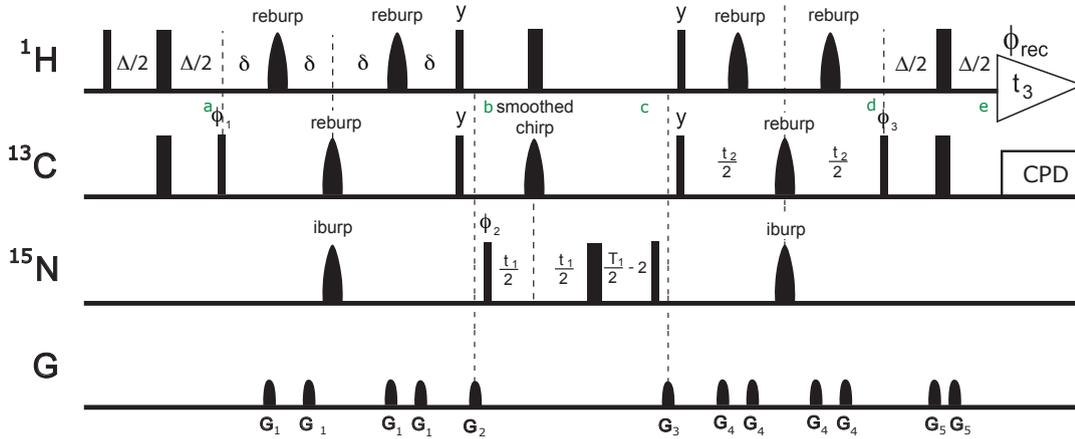
gebracht und detektiert. Das Signal ist dispersiv und in Antiphase hinsichtlich der  ${}^3J_{PH}$ -Kopplung.  $H_1$  ist in den Formeln die in  $t_2$  detektierte Magnetisierung,  $H_k$  sind passiv mit dem Phosphor koppelnde Protonen und  $R_2^*$  ist die Relaxationsrate der transversalen Phosphormagnetisierung. Die Kopplung der H3'-Atome mit dem Phosphor des RNA-Rückgrats kann aus Experimenten mit unterschiedlichen ct-Perioden  $T$  extrahiert werden.

### Experimentelle Daten: PH-ct-COSY

Es werden  $2k(t_2) \times 120(t_1)$  Datenpunkte aufgenommen. Die Anzahl der *Scans* beträgt 536. Die Relaxationszeit nach jedem *Scan* wird auf 1,4 s gesetzt. Bei der Messung entspricht die Trägerfrequenzen o1p der Frequenz des Wassers und o3p( ${}^{31}P$ ) = 0,0 ppm. Die Spektrale Weite SW wird in  $\omega_2 = 11,0 \text{ ppm}$  und  $\omega_1 = 8,0 \text{ ppm}$  gesetzt. Die Länge des COSY beträgt 30 ms. Die Gradienten haben eine Feldstärke von  $G_1^z = 20 \text{ G/cm}$  und  $G_2^z = 30 \text{ G/cm}$ .

#### 9.2.2.6 Die HCNs und das H(C)N(C)H

Für die Korrelation der C1'H1'-Resonanzen der Ribose zu den C6H6- beziehungsweise C8H8-Resonanzen der Base wird das HCN der Ribose und Base [87, 88] sowie das H(C)N(C)H verwendet [87]. Exemplarisch wird in diesem Kapitel nur die Pulssequenz des HCN der Ribose, das in Abbildung 9.13 dargestellt ist, besprochen.



**Abbildung 9.13:** Pulssequenz des HCN der Ribose. Der Phasenzyklus lautet  $\phi_1=x, -x$ ;  $\phi_2=2(x), 2(-x)$ ;  $\phi_3=4(x), 4(-x)$ ;  $\phi_{\text{rec}}=x, 2(-x), x, -x, 2(x), -x$ . Die Intervalle  $\Delta$  betragen 3 ms,  $t_2=30$  ms und  $\delta=7,5$  ms.

Die longitudinale Magnetisierung der Protonen wird in einem INEPT-Schritt auf die Kohlenstoffatome übertragen  $H_x C_z$  (a). In dem darauf folgenden Abschnitt wird die Magnetisierung von den Kohlenstoffatomen auf die Stickstoffatome übertragen. Dazu wird die Magnetisierung der Protonen und  $^{13}\text{C}$ -Atome mit *reburp*-Pulsen refokussiert und die Magnetisierung des  $^{15}\text{N}$  mit einem *iburp*-Puls invertiert [208], so dass die Kopplung zwischen Stickstoff und Kohlenstoff von 11–12 Hz für  $\Delta = \frac{1}{4J}$  evolviert. Auf Grund der  $J_{CN}$ -Kopplung von 11–12 Hz sollte theoretisch eine Evolutionszeit von 42 ms bis 45 ms verwendet werden. Durch die Spin-Spin-Relaxation wird allerdings nur ein Intervall von 30 ms benutzt. Die selektiven *reburp*-Pulse werden eingesetzt, um ausschließlich die Magnetisierung der  $\text{C}1'$ - und  $\text{H}1'$ -Atome zu refokussieren. Damit kann sich in der Ribose keine Kopplung zu anderen Protonen und Kohlenstoffatomen entwickeln. Anschließend wird die transversale Magnetisierung der Protonen mit einem  $90^\circ$ -Puls wieder longitudinal. Durch die Multiquantenterme während des  $M_C \rightarrow M_N$ -Transfers wird die Relaxation durch die dipolare Interaktion zwischen dem  $H1'_z$  und  $\text{C}1'_y$  verhindert [95, 209]. Die Evolution der chemischen Verschiebung der Protonen wird durch die *reburp*-Pulse ebenfalls verhindert. Die Magnetisierung liegt nun in der Form  $4H_z C_z N_y$  (b) vor. In der Evolutionszeit  $t_1$  entwickelt sich nun die chemische Verschiebung des  $^{15}\text{N}$  (c):

$$4H_z C_z N_y \rightarrow 4H_z C_z N_y \cos \Omega t_1 - 4H_z C_z N_x \sin \Omega t_1 \quad (9.21)$$

Anschließend wird die Magnetisierung zurück auf den Kohlenstoff übertragen und die chemische Verschiebung des  $^{13}\text{C}$  evolviert in einer *constant-time* Periode  $t_2$ , um homonukleare Kopplungen zwischen dem C1'- und C2'-Atom zu refokussieren (d).

$$4H_x C_x N_z \cos \Omega t_1 \rightarrow 4H_x C_x \cos \Omega t_1 \cos \Omega t_2 + 4H_x C_y \cos \Omega t_1 \sin \Omega t_2 \quad (9.22)$$

Nun wird die Magnetisierung in einem INEPT-Schritt zurück auf die Protonen transferiert und detektiert  $H_x \cos \Omega t_1 \cos \Omega t_2$  (e). Der Kohlenstoff wird während der Acquisition mit einer *garp*-Sequenz entkoppelt [204].

### Experimentelle Daten: HCN(Ribose)

Es werden  $2k(t_3) \times 72(t_2) \times 128(t_1)$  Datenpunkte aufgenommen. Die Anzahl der *Scans* beträgt 16. Die Relaxationszeit nach jedem *Scan* wird auf 1,7 s gesetzt. Bei der Messung entsprechen die Trägerfrequenzen  $\text{o1p}(^1\text{H}) = 5,7 \text{ ppm}$ ,  $\text{o2p}(^{13}\text{C}) = 90 \text{ ppm}$  und  $\text{o3p}(^{15}\text{N}) = 158 \text{ ppm}$ . Die Spektrale Weite SW wird  $\omega_3 = 12,0 \text{ ppm}$ ,  $\omega_2 = 16,0 \text{ ppm}$  und  $\omega_1 = 30,0 \text{ ppm}$  gesetzt. Der *reburp*-Puls auf  $^1\text{H}$  hat eine Länge von 4 ms bei einer Protonenfrequenz von 600 MHz, der *reburp*-Puls auf  $^{13}\text{C}$  hat eine Länge von 3 ms und der *iburp*-Puls auf  $^{15}\text{N}$  hat eine Länge von 1,6 ms. Die Feldstärke der *garp*-Entkopplung auf  $^{13}\text{C}$  beträgt 4,2 kHz. Die Gradienten haben eine Feldstärke von  $G_1^z = 7 \text{ G/cm}$ ,  $G_2^z = 35 \text{ G/cm}$ ,  $G_3^z = 22,5 \text{ G/cm}$ ,  $G_4^z = 7,5 \text{ G/cm}$  und  $G_5^z = 10 \text{ G/cm}$ . Die angegebenen Parameter gelten für ein HCN(Ribose) des vollmarkierten Ribozyms; für die Ribozyme mit nur einem markierten Nukleotid müssen die Parameter angeglichen werden.

### Experimentelle Daten: HCN(Base)

Es werden  $2k(t_3) \times 70(t_2) \times 128(t_1)$  Datenpunkte aufgenommen. Die Anzahl der *Scans* beträgt 16. Die Relaxationszeit nach jedem *Scan* wird auf 1,7 s gesetzt. Bei der Messung entsprechen die Trägerfrequenzen  $\text{o1p}$  der Frequenz des Wassers,  $\text{o2p}(^{13}\text{C}) = 138 \text{ ppm}$  und  $\text{o3p}(^{15}\text{N}) = 158 \text{ ppm}$ . Die Spektrale Weite SW wird  $\omega_3 = 12,0 \text{ ppm}$ ,  $\omega_2 = 16,0 \text{ ppm}$  und  $\omega_1 = 30,0 \text{ ppm}$  gesetzt. Der *reburp*-Puls auf  $^{13}\text{C}$  hat eine Länge von 2,5 ms bei einer Protonenfrequenz von 600 MHz. Die Feldstärke der *garp*-Entkopplung auf  $^{13}\text{C}$  beträgt 4,2 kHz. Die Gradienten haben eine Feldstärke von  $G_1^z = 10 \text{ G/cm}$ ,  $G_2^z = 40 \text{ G/cm}$ ,  $G_3^z = 12,5 \text{ G/cm}$ ,  $G_4^z = 7,5 \text{ G/cm}$ ,  $G_5^z = 17,5 \text{ G/cm}$  und  $G_6^z = -30 \text{ G/cm}$ . Die angegebenen Parameter gelten für ein

HCN(Base) des vollmarkierten Ribozyms; für die Ribozyme mit nur einem markierten Nukleotid müssen die Parameter angeglichen werden.

### Experimentelle Daten: H(C)N(C)H

Es werden  $2k(t_3) \times 66(t_2) \times 48(t_1)$  Datenpunkte aufgenommen. Die Anzahl der *Scans* beträgt 64. Die Relaxationszeit nach jedem *Scan* wird auf 1,7 s gesetzt. Bei der Messung entsprechen die Trägerfrequenzen  $\omega_1$  der Frequenz des Wassers,  $\omega_2(^{13}C) = 88$  ppm und  $\omega_3(^{15}N) = 158$  ppm. Die Spektrale Weite SW wird  $\omega_3 = 10,0$  ppm,  $\omega_2 = 30,0$  ppm und  $\omega_1 = 1,7$  ppm gesetzt. Der *reburp*-Puls auf  $^1H$  hat eine Länge von 3,3 ms bei einer Protonenfrequenz von 600 MHz, der *reburp*-Puls auf  $^{13}C$  besitzt eine Länge von 3 ms, der *iburp*-Puls 2 auf  $^{13}C$  weist eine Länge von 2,3 ms auf und der *iburp*-Puls 2 auf  $^{15}N$  hat eine Länge von 1,6 ms. Die Feldstärke der *garp*-Entkopplung auf  $^{13}C$  beträgt 5 kHz; die Feldstärke der *garp*-Entkopplung auf  $^{15}N$  entspricht 4,4 kHz. Die Gradienten haben eine Feldstärke von  $G_1^z = 10$  G/cm,  $G_2^z = 25$  G/cm,  $G_3^z = 30$  G/cm,  $G_4^z = 40$  G/cm,  $G_5^z = 6$  G/cm und  $G_6^z = 7,5$  G/cm. Die angegebenen Parameter gelten für ein H(C)N(C)H des vollmarkierten Ribozyms; für die Ribozyme mit nur einem markierten Nukleotid müssen die Parameter angeglichen werden.

### 9.2.3 Kristallisation

Mit der linearen Form des lariatbildenden Ribozyms wurden für die Röntgenstrukturaufklärung Kristallisationsversuche unternommen. Bei der hier verwendeten Verdampfungsdiffusion am sitzenden Tropfen stehen dabei in einem abgeschlossenen System eine 5  $\mu\text{L}$  Lösung aus der zu kristallisierenden RNA und einem Reagenz über den Dampfdruck in einem Gleichgewicht mit einem 500  $\mu\text{L}$  Reservoir, das nur aus der Reagenz besteht [115]. Durch den Dampfdruck geht das Lösungsmittel Wasser von dem Tropfen in das Reservoir über, bis sich ein Konzentrations-Gleichgewicht eingestellt hat. Dies führt zu einer Zunahme der RNA-Konzentration im Tropfen. Durch die erhöhte Konzentration kann die RNA auskristallisieren.

Mit Hilfe eines Pipettier-Roboters wurden auf Platten 0,1  $\mu\text{L}$  einer 0,3 mM Lösung des linearen Ribozyms in 10 mM Natriumcacodylat pH=6,5 zu 4,9  $\mu\text{L}$  Reagenz über einem Reservoir von 500  $\mu\text{L}$  Reagenz gegeben. Es wurden 624 Reagenzien verwendet, die in Anhang B aufgelistet sind. Dabei handelt es sich um die Standard-Kristallisationssätze der Firma Qiagen: *Classics Suite*, *MPD Suite* (2-Methyl-2,4-pentandiol), *Nucleix Suite*, *PEG/Ion Suite* (Polyethylenglykol) und *Sparse Matrix II Suite*.

Die Kristallisationsansätze wurden jeweils bei Raumtemperatur und 4°C verwahrt und nach 24 h, 72 h, 7 Tagen, 14 Tagen, 1 Monat und 3 Monaten auf Kristalle untersucht. Das lineare lariatbildende Ribozym zeigt zu keiner Zeit Ansätze zur Kristallentstehung.



# Kapitel 10

## Zusammenfassung

In Eukaryonten findet der Prozess des Spleißens im Spleißosom, einer sich permanent reorganisierenden, molekularen Maschine, statt. In diesem Prozess werden die kodierenden Sequenzen, die Exons, von den nichtkodierenden Sequenzen, den Introns, getrennt und zusammengefügt [4]. Es ist mittlerweile bekannt, welche RNAs und Proteine an Interaktionen in den verschiedenen Schritten des Prozesses beteiligt sind [48, 58]. Es war bisher durch die Dynamik des Prozesses nicht möglich, die dreidimensionale Struktur der unterschiedlichen Komplexe in einer hohen Auflösung zu bestimmen. Tuschl et al. haben 2001 ein Ribozym entwickelt [1], das durch den Angriff einer 2'-Hydroxylgruppe eines Adenosins auf das Phosphatrückgrat eines Guanosins über eine Umesterungsreaktion eine Lariatbildung einleitet. Diese Reaktion ist vergleichbar mit dem ersten Schritt der Spleißreaktion. Das Ribozym weist einige strukturelle Analogien zu den snRNAs auf, die an den Komplexen B\* und C beteiligt sind. Damit ist das Ribozym ein ideales Modellsystem, um Einblicke in das katalytische Zentrum des Spleißosoms zu erhalten, da die Struktur des vollständigen Komplexes aus snRNAs auf Grund der Größe und Dynamik mit den heute zur Verfügung stehenden Mitteln nicht ermittelt werden kann.

In dieser Arbeit wurde das Ribozym vor der Ausbildung der Lariatstruktur charakterisiert. Da die lineare Form des Ribozyms nicht kristallisiert, ist die NMR-Spektroskopie die einzige Möglichkeit, eine hoch aufgelöste Struktur dieses Moleküls zu erhalten. Die NMR-Spektroskopie wurde durch Mutationsstudien ergänzt.

Eine Voraussetzung zur Strukturaufklärung mit NMR ist die Zuordnung der Resonanzen zu den einzelnen Kernen. Die Zuordnung zeigte, dass die lineare Form des Ribozyms ab c30 in zwei Konformationen vorliegt. Hier findet ein langsamer konformationeller Austausch statt, der die Resonanzüberlagerung erhöht und damit die Zuordnung der Signale erschwert. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Isoto-

pen markierte Proben für die Zuordnung verwendet. NMR-spektroskopisch erwiesen sich vor allem Experimente, die auf dem NOE basieren, als ein hervorragendes Werkzeug. Hier können unterschiedliche Editierungs- und Filterungstechniken eingesetzt werden, um die Resonanzüberlagerung in den Spektren zu reduzieren. Mit den unterschiedlichen NMR-Techniken konnten die Resonanzen der Nukleotide zugeordnet werden.

Zur Verifizierung der Sekundärstruktur wurden neben NMR-Experimenten Mutationsstudien am Ribozym eingesetzt. Über Basenaustauschexperimente konnten die Basenpaarungen bestätigt werden, die in NMR-Spektren sichtbar waren.

Das Ribozym bildet zwischen g1 und c27 eine Helix, die eine Auswölbung und einen UUCG-*Tetraloop* enthält. Die Helix weist neben kanonischen Basenpaarungen auch nicht kanonische Adenosin-Adenosin Basenpaarungen sowie eine Adenosin-Guanosin Basenpaarung auf. Die Guanosine am Anfang der Helix interagieren mit Nukleotiden in 3'-Position des *branchpoint* Adenosins. Dadurch befindet sich das *branchpoint* Adenosin a48 nahe dem g1. Zwischen diesen beiden Nukleotiden findet die Umesterungsreaktion statt, in der die 2'-Hydroxylgruppe das Phosphatrückgrat des g1 angreift, ein Lariat bildet und ein Diphosphat abspaltet. Durch die Interaktion wird somit die Lariatbildung erst möglich.

Die Ribose des *branchpoint* Adenosins weist einen *sugar pucker* im Bereich der O1'-exo-, C1'-endo- oder C2'-exo-Konformation auf. Im Vergleich mit anderen Adenosinen in Auswölbungen ist diese Konformation ungewöhnlich, kann aber für den ersten Schritt der Spleißreaktion sowohl im Ribozym als auch im Spleißosom essentiell sein [119, 120].

Nach der Lariatbildung sind in den NMR Spektren nur noch die Resonanzen der kurzen Helices P1 und P2 zu beobachten. Die anderen Resonanzen unterliegen einem Austausch auf einer Mikro- bis Millisekundenzeitskala. Die Struktur des Ribozyms verändert sich also nach der Lariatbildung beträchtlich. Im Lariat weist die verlängerte Helix zwischen g1 und c27 keine vergleichbare Stabilität zur linearen Form auf.

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die Nukleotide g1 bis c27 des linearen Ribozyms eine stabile Helix eingehen, während für die restlichen Nukleotide erste strukturelle Einblicke gewonnen werden konnten. Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit bieten eine Grundlage für die vollständige strukturelle Charakterisierung sowohl der linearen Form als auch des Lariats des Spleißosom basierten Ribozyms.

In der Spleißreaktion, aber auch in anderen katalytischen Prozessen besitzt die 2'-Hydroxylgruppe der RNA eine essentielle Funktion [210]. Auch die wesentlichen strukturellen Unterschiede zwischen der RNA und DNA sind auf die 2'-Hydroxylgruppe zurückzuführen [138]. Bislang liegen jedoch nur moleküldynamische Berechnungen und NMR-spektroskopische Untersuchungen an einzelnen Nukleotiden vor, die sich mit der Konformation der 2'-Hydroxylgruppe beschäftigen [139, 142, 143]. Durch einen schnellen Austausch mit dem Wasser kann die Resonanz des 2'-Hydroxylprotons bei Raumtemperatur nicht detektiert werden. Bei einer Temperatur von 5 °C verlangsamt sich der Protonenaustausch, so dass die Hydroxylgruppe mit der NMR untersucht werden kann [176].

In dieser Arbeit wurden erstmals die Konformationen der 2'-Hydroxylgruppen einer dreißig Nukleotide umfassenden RNA, der TAR-RNA, die eine wichtige Funktion bei der Regulation der Transkription von HIV-II spielt, mit Hilfe der NMR ermittelt. Dazu wurden die  $^2J$ - und  $^3J$ -Kopplungen sowie NOEs der 2'-Hydroxylgruppen bei einer Temperatur von 5 °C in Wasser bestimmt. Diese Parameter können zur Konformationsanalyse verwendet werden, da sie Informationen über die Dihedralwinkel (H2'-C2'-O2'-2'OH) der Hydroxylgruppen beinhalten.

Mit den dazugehörigen Karplus-Beziehungen können die  $^3J$ -Kopplungen in die Bindungswinkel der Hydroxylgruppen übersetzt werden. Mit Hilfe von ab initio Kalkulationen wurden die Karplus-Kurven der  $^2J_{2'OH,C2'}$ - und der drei  $^3J_{2'OH,C1'/C3'/H2'}$ -Kopplungen ermittelt und die  $^3J$ -Kopplungen interpretiert. Für die Auswertung der NOE-Daten der 2'-Hydroxylgruppen wurden diese Daten simuliert, um den Effekt der Spin-Diffusion und Konformation der Ribose auf die NOEs vorhersagen zu können. Die Spin-Diffusion und Konformation der Ribose wirkt sich auf die NOEs der Hydroxylgruppe aus. Der Einfluss ist jedoch so gering, dass die experimentell ermittelten NOEs mit den theoretisch ermittelten NOEs ausgewertet werden können.

Die Konformationsanalyse mit den  $^3J$ -Kopplungen und NOEs ergibt, dass die 2'-Hydroxylgruppen mit der Ribose in der C3'-endo-Konformation in einem konformationellen Gleichgewicht zwischen der O3'- und der Basen-Domäne vorliegen. In der O3'-Domäne gehen die Hydroxylgruppen elektrostatische Wechselwirkungen mit dem O3'-Atom der Ribose ein, während in der Basen-Domäne Hydroxylgruppen mit dem O2- beziehungsweise N3-Atom der Base wechselwirken.

Erstmals konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Konformationen der 2'-Hydroxylgruppen ein Netzwerks aus Wassermolekülen unterstützen, in dem zwei Wassermoleküle die große Furche der RNA Helix überspannen [140]. Die Wasser-

moleküle werden dabei durch die freien Elektronenpaare des O2'-Atoms koordiniert. Durch den Wechsel der 2'-Hydroxylgruppen zwischen der O3'- und Basen-Domäne unterliegt das Netzwerk einer stetigen Reorganisation, welche auch durch die Basenpaarungen der RNA beeinflusst wird, die sich in der Helix zeitweise öffnen [179]. Es ist auch möglich, dass diese Öffnungen der Basenpaarungen auf der Reorganisation des Wassernetzwerks in der großen Furche beruhen.

Mit der in dieser Arbeit vorgestellten Verfahrensweise steht ein Instrument bereit, die Orientierung der 2'-Hydroxylgruppe in katalytischer RNA wie dem bereits beschriebenen lariatbildenden Ribozym oder dem *Hammerhead*-Ribozym zu verfolgen. Auch wenn es erwiesen ist, dass die 2'-Hydroxylgruppe in diesen Prozessen eine wichtige Rolle spielt, so konnte der strukturelle Verlauf der Hydroxylgruppe während der Katalyse bisher nicht verfolgt werden.

# Kapitel 11

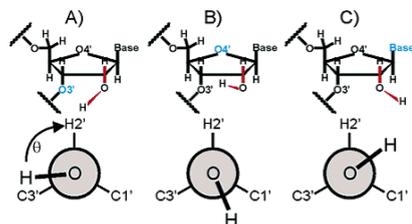
## Publikationen

Mirko Hennig, Jörg Fohrer und Teresa Carlomagno: Journal of the American Chemical Society (2005), **127**, 2028-2029 ..... Seite 142

Jörg Fohrer, Mirko Hennig und Teresa Carlomagno: Journal of Molecular Biology (2006), **356**, 280-287..... Seite 144

Jörg Fohrer, Uwe Reinscheid, Mirko Hennig und Teresa Carlomagno: Angewandte Chemie International Edition (2006), **45**, 7033-7036..... Seite 152





**Figure 2.** Energetically favored orientations of the 2'-OH hydroxyl group and corresponding Newman projections showing the torsion angle  $\theta$  (H2'-C2'-O2'-H) when the ribose is in the C3'-endo conformation: (A) O3' domain, torsion angle  $\theta = 50-140^\circ$ , (B) O4' domain, torsion angle  $\theta = 175-230^\circ$ , and (C) base domain, torsion angle  $\theta = 270-345^\circ$ .<sup>13</sup>

With the exception of C19 and G28 (Figure 1), the chemical shift dispersion of the 2'-OH hydroxyl protons is rather limited, with resonance frequencies clustering between 6.75 and 7.00 ppm, which is in good agreement with chemical shift ranges reported previously.<sup>1,5,8,16</sup>

Molecular dynamics (MD) simulations of an RNA hairpin show that the conformation of the 2'-OH group depends on the sugar pucker.<sup>13</sup> Three orientations are accessible to the 2'-OH hydroxyl group when the ribose is in the typical RNA C3'-endo conformation (Figure 2): (A) toward the O3' stabilized by attractive electrostatic interaction with the phosphate backbone, (B) toward the O4' stabilized by favorable intra-ribose electrostatic interactions, and (C) toward the base stabilized by electrostatic interaction with the N3 or O2 atom of the attached base. The  $^3J(2'-\text{OH}, \text{H}2')$  coupling can adopt values higher than 4 Hz in all three domains, so that the detection of a 2'-OH-H2' cross-peak in TOCSY spectra is not indicative of a specific domain.<sup>8</sup>

However, the theoretical through-space NOE correlations differ substantially for the distinct domains. In particular, NOE correlations between the 2'-OH and aromatic H6 or H8 protons of the following nucleotide are only compatible with the 2'-OH proton in either the base or a small region of the O3' domain (torsion angle  $\theta \approx 60^\circ$ ). Such NOEs can be observed for 13 of the assigned 2'-OH hydroxyl protons (G17, C18, C19, U23, G26, G28, G36, C37, C39, U40, U42, G44, C45). Theoretically, the two orientations with observable 2'-OH(*i*)-H6/H8(*i*+1) NOEs can be distinguished by inspection of the intrareidual 2'-OH(*i*)-H1'(*i*) peak, which is predicted to be much weaker in the O3' domain. A quantitative analysis of the NOE is not possible due to spectral overlap. Our semiquantitative inspection of the cross-peak intensities for C18, C19, U23, G28, U42, G44, and C45 revealed 2'-OH-H1' NOEs of medium intensity in a short mixing time NOESY ( $\tau_m = 50$  ms), which are more intense than the 2'-OH(*i*)-H6/H8(*i*+1) but less intense than the corresponding intrareidual 2'-OH-H2' NOEs. These results are in qualitative agreement with the 2'-OH proton in the base domain orientation, where the  $\theta$  torsion angle is approximately  $300^\circ$ . The 2'-OH-H1' NOE intensities for G26, C39, and U40 could not be analyzed because of overlap with interfering cross-peaks stemming from cytidine amino protons, while G17 and C37 show weak 2'-OH-H1' NOE correlations, suggesting a 2'-OH orientation pointing away from the H1' in the O3' domain (torsion angle  $\theta \approx 60^\circ$ ). No 2'-OH(*i*)-H6/H8(*i*+1) NOE could be observed for the remaining six nucleotides (G21, U25, A27, C29,

U31, and C41). Again, the 2'-OH-H1' are weaker than the corresponding 2'-OH-H2' NOE correlations, indicative of a populated O3' domain with a torsion angle  $\theta \geq 60^\circ$ . Our data do not show evidence for 2'-OH protons in the O4' domain, where the 2'-OH-H1' NOE is expected to be more intense than the 2'-OH-H2' NOE.

It has been commonly accepted that the 2'-OH hydroxyl points toward the phosphate backbone and away from the ribose H1' proton. This picture has been supported by MD simulation of an RNA hairpin,<sup>14</sup> which provided evidence for a strongly preferred orientation toward the O3', and by the NMR data available to date,<sup>15</sup> where only very weak 2'-OH-H1' NOE cross-peaks could be detected. However, more recent MD simulations describe three energetically favored orientations for the 2'-OH hydroxyl proton.<sup>13</sup> The 2'-OH-H1' NOEs of medium intensity observed for the HIV-2 TAR RNA contradict the paradigm that the 2'-OH hydroxyl typically points away from the ribose H1' proton. The presence of many detectable NOE correlations involving aromatic H6/H8(*i*+1) protons suggest that the orientation toward the base might be more common than currently appreciated. This interpretation is in agreement with the hydration model proposed for an RNA duplex on the basis of a high-resolution crystal structure.<sup>2</sup> The described dense network of hydrogen bonds snakes down the minor groove and involves two water molecules (or the phosphate O2P oxygen), the N3/O2 atoms of purine/pyrimidine bases, and the 2'-OH hydroxyl groups of adjacent nucleotides in base pair steps. This ordered network requires 2'-OH hydroxyl protons to be in the base or O3' domain, where 2'-OH hydroxyls are able to participate in H-bonding interactions with water. A more quantitative conformational analysis of the 2'-OH hydroxyl group using vicinal homo- and heteronuclear  $^3J$ -couplings is being currently carried out in our laboratories.

**Acknowledgment.** M.H. thanks James R. Williamson for continuous support and encouragement. This work was supported by the MPG.

**Supporting Information Available:** Table of chemical shift assignments; figure showing H6/H8(*i*+1) and intrareidual ribose to 2'-OH(*i*) NOEs. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## References

- (1) Gyi, J. L.; Lane, A. N.; Conn, G. L.; Brown, T. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3104-3110.
- (2) Egli, M.; Portmann, S.; Usman, N. *Biochemistry* **1996**, *35*, 8489-8494.
- (3) Gesteland, R. F.; Chech, T. In *The RNA World*; Gesteland, R. F., Chech, T., Atkins, J. F., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 1998.
- (4) Eckstein, F.; Lilley, D. M. J. In *Catalytic RNA*; Eckstein, F., Lilley, D. M. J., Eds.; Springer: Berlin, 1997.
- (5) Lynch, S. R.; Pelton, J. G.; Tinoco, L., Jr. *Magn. Reson. Chem.* **1996**, *34*, S11-S17.
- (6) Williams, D. J.; Boots, J. L.; Hall, K. B. *RNA* **2001**, *7*, 44-53.
- (7) Giedroc, D. P.; Cornish, P. V.; Hennig, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4676-4677.
- (8) Acharya, P.; Chattopadhyaya, J. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1852-1865.
- (9) Brodsky, A. S.; Williamson, J. R. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 624-639.
- (10) Cavanagh, J.; Rance, M. *J. Magn. Reson.* **1992**, *96*, 670-678.
- (11) Lippens, G.; Dhalluin, C.; Wieruszkeski, J.-M. *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 327-331.
- (12) Hwang, T.-L.; Shaka, A. J. *J. Magn. Reson.* **1995**, *A112*, 275-279.
- (13) Auffinger, P.; Westhof, E. *J. Mol. Biol.* **1997**, *274*, 54-63.
- (14) Singh, S. B.; Kollman, P. A. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 1940-1948.
- (15) Conte, M. R.; Conn, G. L.; Brown, T.; Lane, A. N. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3693-3699.

JA0433900

**JMB**

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®



COMMUNICATION

## Influence of the 2'-Hydroxyl Group Conformation on the Stability of A-form Helices in RNA

Jörg Fohrer<sup>1</sup>, Mirko Hennig<sup>2\*</sup> and Teresa Carlomagno<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of NMR Based Structural Biology, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Am Fassberg 11 D-37077 Göttingen, Germany

<sup>2</sup>Department of Molecular Biology, The Scripps Research Institute, MB33, 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla CA 92037, USA

The 2'-hydroxyl group plays fundamental roles in both the structure and the function of RNA, and is the major determinant of the conformational and thermodynamic differences between RNA and DNA. Here, we report a conformational analysis of 2'-OH groups of the HIV-2 TAR RNA by means of NMR scalar coupling measurements in solution.

Our analysis supports the existence of a network of water molecules spanning the minor groove of an RNA A-form helix, as has been suggested on the basis of a high-resolution X-ray study of an RNA duplex. The 2'-OH protons of the lower stem nucleotides of the TAR RNA project either towards the O3' or towards the base, where the 2'-OH group can favorably participate in H-bonding interactions with a water molecule situated in the nucleotide base plane. We observe that the  $k_{ex}$  rate of the 2'-OH proton with the bulk solvent anti-correlates with the base-pair stability, confirming the involvement of the 2'-OH group in a collective network of H-bonds, which requires the presence of canonical helical secondary structure.

The methodology and conformational analysis presented here are broadly applicable and facilitate future studies aimed to correlate the conformation of the 2'-OH group with both the structure and the function of RNA and RNA–ligand complexes.

Keywords: RNA structure; 2'-hydroxyl group; conformational analysis; A-form helix stability; scalar coupling

\*Corresponding authors

The 2'-hydroxyl group is a major determinant for both the structure and the function of RNA, where the sugars are all ribose.<sup>1</sup> The presence of the ribose 2'-hydroxyl group in RNA engenders a preference for the C3'-endo pucker, thereby providing the decisive factor for the differences in conformation, hydration and thermodynamic stability between canonical RNA and DNA helices.<sup>2</sup> A high-resolution crystal structure of an RNA duplex revealed the existence of a complex hydration network in the minor groove of the A-form helix,<sup>3</sup> which is supported by the specific distribution of the 2'-hydroxyl groups. The presence of water molecules in the RNA minor groove, anchored by electrostatic interactions to

both the ribose and the base, provides an enthalpic contribution to A-form helix stability and, additionally, offers a basis for the entropic regulation of ligand binding to the minor groove. Non-canonical RNA structural elements, such as tetraloops and pseudoknots, can be stabilized by H-bonds involving the 2'-hydroxyl group as well.<sup>4–10</sup> Moreover, the 2'-hydroxyl group has an established role in RNA catalysis. Numerous examples of the role of the 2'-hydroxyl group in catalytic RNAs are documented for self-splicing viral ribozymes, type II introns and the pre-mRNA processing machinery.<sup>11–14</sup> Despite the importance of the 2'-hydroxyl group in RNA structure stabilization and function, only limited structural data is available for the 2'-OH proton of RNA.<sup>2,7,15,16</sup>

Hydrogen atoms are not directly observable in crystal structures; in aqueous solution the rapid exchange of the hydroxyl proton with the solvent typically prevents its observation in RNA at room temperature by NMR. Consequently, in the absence of structural information on the 2'-OH proton, the torsion angle  $\varphi$  (H2'-C2'-O2'-H)

Abbreviations used: HIV, human immunodeficiency virus; Tat, transcription activator; TAR, transactivation response element; NOE, nuclear Overhauser effect; NOESY, NOE spectroscopy; HSQC, heteronuclear single quantum coherence.

E-mail addresses of the corresponding authors: [mirko@scripps.edu](mailto:mirko@scripps.edu); [taco@nmr.mpibpc.mpg.de](mailto:taco@nmr.mpibpc.mpg.de)

remains undetermined. Molecular dynamics (MD) simulations of an RNA hairpin identified three energetically preferred orientations that the 2'-OH proton can assume if a ribose sugar adopts a C3'-endo pucker (as is the case in canonical RNA A-form helix, Figure 1):<sup>17</sup> (A) toward the O3', stabilized by attractive electrostatic interaction with the phosphate backbone (O3' domain), (B) toward the O4', stabilized by favorable intra-ribose electrostatic interactions (O4' domain), and (C) toward the base, stabilized by electrostatic interaction with the N3 or O2 atom of the attached base (base domain).

Recently, we have reported almost complete resonance assignments of the 2'-hydroxyl protons of the 30mer human immunodeficiency virus (HIV)-2 transactivation response element (TAR) RNA in aqueous solution at low temperature.<sup>18</sup> The HIV transcription activator (Tat)-TAR complex formation provides an essential transcription regulatory function for HIV. The lentiviral protein Tat binds the TAR hairpin located at the 5'-end of nascent viral transcripts and thereby enhances the inefficient elongation of transcription complexes initiated at the HIV promoter. The cellular RNA-polymerase II (RNA P II) is able to transcribe the entire viral RNA only when Tat is bound to TAR.<sup>19</sup>

The NMR resonance assignment has been obtained using two-dimensional homonuclear total correlated spectroscopy (TOCSY)<sup>20</sup> and nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY)<sup>21</sup> experiments at 5°C. A semi-quantitative analysis of the NOESY cross-peak intensities revealed several NOEs of medium intensity between the 2'-OH and the H1' protons, in contrast to previous studies,<sup>15</sup> which reported mostly weak 2'-OH to H1' proton NOEs in an RNA duplex. Most notably, we readily observed several 2'-OH(i)-H6/H8(iC1) cross-peaks of weak intensity, which are compatible with the 2'-OH proton either in the base domain

or in a small region of the O3' domain (H2'-C2'-O2'-H torsion angle  $\theta = 60^\circ$ ).

Experimental determination of the 2'-hydroxyl proton location in RNA structures is essential to verify the role of the 2'-hydroxyl group in the stabilization of RNA folding motifs. Here, we present a conformational analysis of the torsion angle H2'-C2'-O2'-H in the HIV-2 TAR RNA based on the measurement of the three scalar couplings between the 2'-OH proton and the H2', C2' or C3' ribose nuclei ( $^3J_{\text{H2}'\text{-}2'\text{OH}}$ ,  $^3J_{\text{C1}'\text{-}2'\text{OH}}$  and  $^3J_{\text{C3}'\text{-}2'\text{OH}}$ ). To the best of our knowledge, this work represents the first thorough conformational analysis of the 2'-hydroxyl group in a medium-sized RNA; all previous conformational studies on the H2'-C2'-O2'-H torsion angle via scalar couplings were conducted on either single nucleotides in DMSO<sup>22,23</sup> or targeted a single 2'-hydroxyl group stabilizing a UUCG-tetraloop.<sup>7</sup> The NMR techniques presented here provide a uniformly applicable way to study the orientation of the 2'-OH group in RNA in solution, thereby allowing association of the 2'-hydroxyl group conformation with specific RNA functions, such as RNA catalysis.

The homonuclear and heteronuclear  $^3J_{\text{H2}'\text{-}2'\text{OH}}$ ,  $^3J_{\text{C1}'\text{-}2'\text{OH}}$  and  $^3J_{\text{C3}'\text{-}2'\text{OH}}$  scalar couplings of the HIV-2 TAR RNA have been measured in specifically tailored two-dimensional NMR experiments using the quantitative J approach.<sup>24</sup> Briefly, the  $^3J_{\text{H2}'\text{-}2'\text{OH}}$  couplings were measured in a H2'-H<sub>base</sub> NOESY correlation experiment (Figure 2(a)). We chose this correlation for its highly efficient NOESY transfer and adequate resolution. It should be mentioned that this experiment benefited from the use of a 0.7 mM HIV-2 TAR RNA sample consisting of d4-nucleotides lacking all but H1' and H2' ribose protons.<sup>25</sup> This specific deuteration pattern allows for selective detection of the H2'-H<sub>base</sub> NOEs with high sensitivity, while circumventing overlap with other H<sub>ribose</sub>-H<sub>base</sub> NOEs. In the absence of a selectively deuterated sample, a three-dimensional <sup>13</sup>C-edited NOESY correlation is necessary to achieve the desired resolution of the H2'-H<sub>base</sub> peaks. The  $^3J_{\text{C1}'\text{-}2'\text{OH}}$  and  $^3J_{\text{C3}'\text{-}2'\text{OH}}$  scalar couplings were measured in constant-time C1'-H1' (Figure 2(b)) and C3'-H3' HSQC correlations, respectively.

The  $^3J_{\text{H2}'\text{-}2'\text{OH}}$  couplings measured for the HIV-2 TAR RNA at 5°C are shown in Figure 3(a). In general, the  $^3J_{\text{H2}'\text{-}2'\text{OH}}$  couplings cluster between 3 Hz and 4.5 Hz and, except for C18, no value exceeds 5.5 Hz. Chemical exchange of the 2'-OH proton with the solvent can potentially reduce apparent  $^3J_{\text{H2}'\text{-}2'\text{OH}}$  coupling values. We determined the exchange rate constant  $k_{\text{ex}}$  of the 2'-OH protons with bulk water for C19 from the intensity of the exchange cross-peak in NOESY spectra at 1°C, 5°C and 10°C. The measured  $k_{\text{ex}}$  value for C19 of approximately 15 Hz at 5°C is in good agreement with the value reported by Gyi et al. for an RNA and an RNA-DNA duplex.<sup>2</sup> Unfortunately, severe overlap of the remaining 2'-OH proton resonances impeded the accurate determination of the  $k_{\text{ex}}$  values for the other nucleotides.

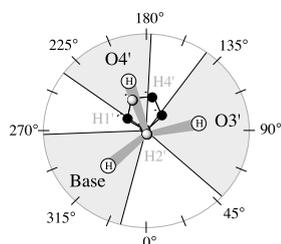


Figure 1. Energetically favored orientations of the 2'-hydroxyl group when the ribose is in the C3'-endo conformation. The ribose sugar ring is schematically shown in the middle with oxygen atoms in grey and carbon atoms in black. According to MD simulations,<sup>17</sup> the torsion angle (H2'-C2'-O2'-H) can populate three regions, highlighted in grey: the O3' domain, torsion angle 50°-140°; the O4' domain, torsion angle 175°-230°; the base domain, torsion angle 270°-345°.

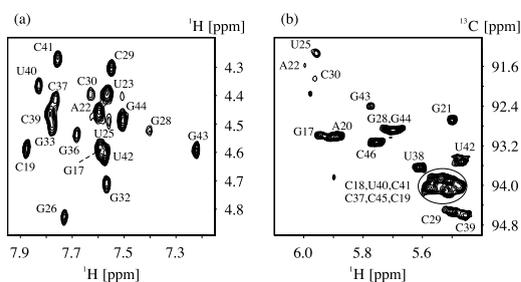


Figure 2. Spectra were recorded on 0.6 mM 3',4',5',5'-d4-HIV-2 TAR RNA, where all ribose protons but the H1' and H2' were replaced by deuterons. The sample buffer contained 10 mM phosphate (pH 6.4), 50 mM sodium chloride, and 0.1 mM EDTA in 500 ml of 90% H<sub>2</sub>O/10% <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O. The spectra were recorded on a Bruker 800 MHz spectrometer equipped with a z-gradient triple-resonance probe, processed with the NMRPipe program and analyzed using FELIX 2000 (MSI, San Diego, USA).

(a) Cross experiment of the H2' (i)-H6/8 (iC 1) NOESY correlation for the measurement of the <sup>3</sup>J<sub>H2'-2'-OH</sub> couplings. In the cross experiment, we employed a constant time delay of 40 ms, during which the H2' proton magnetization is transversal and subjected to J-dephasing effects, which results in measurable attenuation of the observed H2'-H<sub>base</sub> cross-peaks. In the reference experiment, the evolution of the vicinal <sup>3</sup>J<sub>H2'-2'-OH</sub> coupling is refocused by use of a REBURP pulse<sup>36</sup> of duration 4 ms centered at 4.16 ppm. This pulse selectively refocuses the H2' protons at a proton resonance frequency of 800 MHz, without affecting the 2'-OH and the H1' resonances (excitation bandwidth, G 550 Hz; transition region, 250 Hz). In contrast, the <sup>3</sup>J<sub>H2'-2'-OH</sub> coupling is active during the cross experiment by simultaneous application of the H2' REBURP pulse and of a 4 ms IBURP pulse<sup>36</sup> centered in the 2'-OH region at 6.97 ppm in the center of the constant time period. The IBURP pulse selectively inverts the 2'-OH protons leaving the resonances of the H1' protons unaffected on an 800 MHz spectrometer (excitation bandwidth, G 550 Hz; transition region, 250 Hz). (b) Expansion of the cross spectrum of the C1'-H1' CT-HSQC for the measurement of the heteronuclear <sup>3</sup>J<sub>C1'-2'-OH</sub>. Analogously, a C3'-H3' CT-HSQC was used for the measurement of the <sup>3</sup>J<sub>C3'-2'-OH</sub>. Evolution of the <sup>3</sup>J<sub>C1'-2'-OH</sub> and <sup>3</sup>J<sub>C3'-2'-OH</sub> scalar couplings during the constant time of the cross experiment was achieved by simultaneous application of a carbon pulse and a 4 ms IBURP pulse centered in the 2'-OH region at 7.3 ppm. A constant time period of 25 ms was used to achieve optimal sensitivity and resolution for both the C1'-H1' and the C3'-H3' correlations. The J-coupling constants were extracted from the intensity ratio of peaks in the cross and reference experiments, according to equation (1):<sup>24</sup>

$$\frac{I_{\text{cross}}}{I_{\text{ref}}} = \cos \rho J T \quad (1)$$

where T is the length of the constant time period. It should be noted that the effective J-evolution periods employed in the calculations are compensated for the evolution of the couplings during the IBURP pulses, which resulted in constant times of 34.76 ms, 22.05 ms, 22.05 ms for the three <sup>3</sup>J<sub>H2'-2'-OH</sub>, <sup>3</sup>J<sub>C1'-2'-OH</sub> and <sup>3</sup>J<sub>C3'-2'-OH</sub> scalar couplings, respectively. (c) Secondary structure of the HIV-2 TAR RNA.

When a substantially larger  $k_{\text{ex}} \geq 25$  Hz is assumed, the apparent <sup>3</sup>J<sub>H2'-2'-OH</sub> coupling measured over a 40 ms long constant time is approximately 85% of the actual <sup>3</sup>J<sub>H2'-2'-OH</sub> coupling. For the majority of nucleotides, however, this 15% tolerance would be well within the limits of the experimental error. Thus, for  $k_{\text{ex}}$  up to 25 Hz, we could consider the effective J-coupling scaling factor from solvent exchange to be negligible.

The stability of RNA structures can fluctuate locally. Consequently, in order to locate secondary structural elements within the TAR RNA structure (Figure 2(c)), where <sup>3</sup>J<sub>H2'-2'-OH</sub> couplings are considerably influenced by solvent exchange, we carefully compared the <sup>3</sup>J<sub>H2'-2'-OH</sub> coupling values obtained at 5°C and 1°C. Substantial differences in the <sup>3</sup>J<sub>H2'-2'-OH</sub> couplings at 5°C and 1°C are expected for nucleotides with  $k_{\text{ex}} \propto 1/T$  (T being the length of the constant time period). No significant modulation is expected for nucleotides with  $k_{\text{ex}} \propto 1/T$ .

The results from this comparison are striking. The <sup>3</sup>J<sub>H2'-2'-OH</sub> coupling values of canonical Watson-Crick C-G or G-C base-pairs of the lower stem remain the same at 5°C and 1°C within exper-

imental error. Coupling values of nucleotides A20, U40, and U42, of all nucleotides located in the shorter upper stem, and of the loop nucleotide C30 experience increases ranging from 30% to 50% when the temperature is decreased from 5°C to 1°C. Surprisingly, the <sup>3</sup>J<sub>H2'-2'-OH</sub> couplings of bulged nucleotides U23 and U25 do not change as a function of temperature. This clearly indicates that the  $k_{\text{ex}}$  rate of these nucleotides is similar to the  $k_{\text{ex}}$  rate of canonical CG base-pairs.

Taken together, our results strongly suggest a correlation between 2'-OH proton solvent exchange rates  $k_{\text{ex}}$  and base-pair opening rates (probed by imino proton exchange) in canonical A-form helical structures. The exchange process of H-bonded imino protons with solvent can be qualitatively explained on the basis of a two-state model involving open and closed states of Watson-Crick pairs. If it is assumed that the closed A-form geometry is stabilized by an ordered series of hydrogen bonds involving the ribose 2'-hydroxyl group, the functional groups within the bases, and water molecules bound in the minor groove, we speculate that the transient opening of the base-pair favors the exchange of bound water with the bulk solvent,

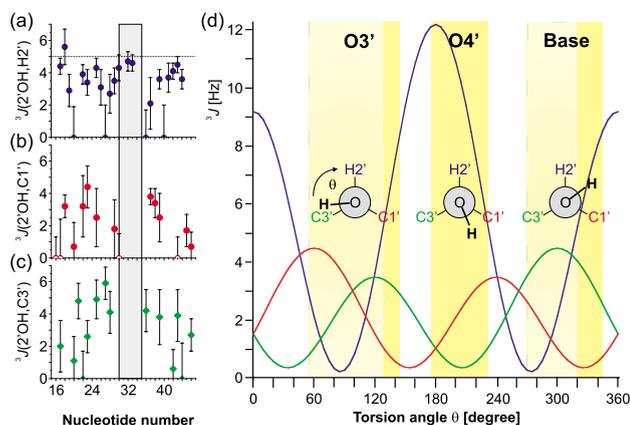


Figure 3. (a)  $^3J_{\text{H}2'-2'\text{OH}}$  couplings measured at 5°C employing the quantitative-J ( $\text{H}2'_{i-1}-\text{H}6/8_{i-1}$ ) CT-NOESY experiment. The dotted line indicates  $^3J_{\text{H}2'-2'\text{OH}} \approx 5.0$  Hz. (b)  $^3J_{\text{C}1'-2'\text{OH}}$  couplings obtained at 5°C using the quantitative-J ( $\text{C}1'_{i-1}-\text{H}1'_{i-1}$ ) CT-HSQC experiment. (c)  $^3J_{\text{C}3'-2'\text{OH}}$  couplings obtained at 5°C from the quantitative-J ( $\text{C}3'_{i-1}-\text{H}1'_{i-1}$ ) CT-HSQC experiment. Apical hexanucleotide regions are shaded in grey. (d) Karplus-like dependence of the homonuclear  $^3J_{\text{H}2'-2'\text{OH}}$  coupling (blue line) on the torsion angle  $\theta$  ( $\text{H}2'-\text{C}2'-\text{O}2'-\text{H}$ ) according to Fraser et al.<sup>30</sup> No Karplus parameterization is available for the heteronuclear  $^3J_{\text{C}1'-2'\text{OH}}$  and the  $^3J_{\text{C}3'-2'\text{OH}}$  couplings. The red and green lines for the  $^3J_{\text{C}1'-2'\text{OH}}$  and the  $^3J_{\text{C}3'-2'\text{OH}}$  couplings, respectively, represent approximated Karplus curves derived by scaling the coefficients of the  $^3J_{\text{C-H}}$  Karplus-relation in alkenes ( $^3J_{\text{C-H}} = 3.6 \cos 2\phi - 1.0 \cos \phi + 4.3$ ) to reflect the averaged value of the  $^3J_{\text{C-OH}}$  coupling in ethanol (2.9 Hz).<sup>31</sup> We assume equal populations of the trans, gauche+ and gauche- conformations for ethanol. Neither the difference in the substituents of the  $\text{C}1'$  and  $\text{C}3'$  nuclei nor the fact that these nuclei are part of a conformational restricted ring system are considered in this approximation; therefore the Karplus-relations for the  $^3J_{\text{C}1'-2'\text{OH}}$  or the  $^3J_{\text{C}3'-2'\text{OH}}$  couplings represent crude approximations. Boxed yellow areas correspond to the energetically favored orientational domains ( $\text{O}3'$ ,  $\text{O}4'$  and base, respectively) of the 2'-hydroxyl group, according to Auffinger and Westhof (see also Figure 1).<sup>17</sup> The pale yellow delimits the regions of these domains where the  $^3J_{\text{H}2'-2'\text{OH}}$  coupling is less than 5.0 Hz.

thereby directly influencing the  $k_{\text{ex}}$  rate of the 2'-OH proton. Imino protons can only exchange with bulk water from transiently opened conformations through acid-base reactions catalyzed by proton acceptors; they are protected when engaged in a closed base-pair.<sup>26,27</sup> Base-pair opening events can occur via two pathways as revealed by MD simulations.<sup>28,29</sup> Both major and minor groove opening are feasible with the major groove pathway being energetically slightly more favorable.

Our hypothesis of correlated imino and 2'-OH proton exchange is supported by the fact that the base-pair lifetimes of RNA A-U base-pairs in the A-form helix geometry are substantially shorter than those of G-C base-pairs.<sup>26,27</sup> Subsequently, only the cytidine and guanosine residues of the lower stem and the two bulged uridine residues were further considered in the quantitative evaluation of the  $^3J_{\text{H}2'-2'\text{OH}}$ ,  $^3J_{\text{C}1'-2'\text{OH}}$  and  $^3J_{\text{C}3'-2'\text{OH}}$  scalar couplings.

A Karplus curve showing the dependence of the  $^3J_{\text{H}2'-2'\text{OH}}$  on the intervening torsion angle  $\text{H}2'-\text{C}2'-\text{O}2'-2'\text{OH}$  is shown in Figure 3(d) (blue line).<sup>30</sup> The upper limit of 5.5 Hz observed for the nucleotides of the lower stem excludes the possibility that any of these 2'-OH groups occupy the  $\text{O}4'$  domain. This observation indicates that the 2'-OH is not involved in intra-ribose 2'-OH- $\text{O}4'$  electrostatic interactions, but rather contacts either the base (2'-OH conformation in the base domain) or the phosphate backbone ( $\text{O}3'$  domain). The absence of 2'-OH protons in the  $\text{O}4'$  domain in canonical A-form helical structure of the lower stem in the TAR RNA is consistent with our semi-quantitative analysis of

detectable NOE cross-peaks in a short mixing time 2D NOESY experiment ( $t_{\text{m}} \approx 50$  ms).<sup>18</sup> Even at 1°C, only the  $^3J_{\text{H}2'-2'\text{OH}}$  of residue C30 reaches 7 Hz, while larger values ( $> 8$  Hz) of the  $^3J_{\text{H}2'-2'\text{OH}}$ , associated with a significant portion of the  $\text{O}4'$  domain, are never observed.

The heteronuclear  $^3J_{\text{C}1'-2'\text{OH}}$  couplings proved to be difficult to measure due to the limited resolution of the  $\text{C}1'-\text{H}1'$  correlation in canonical A-form geometry (Figure 3(b)). Moreover, eight out of 29 carbon atoms (G26, A27, U31, G32, G33, G34, A35 and G36) are not observed at 5°C, which can be attributed to interconverting  $\text{C}2'$ -endo and  $\text{C}3'$ -endo sugar puckers. Those nucleotides are located predominantly in the apical hexanucleotide loop and assume averaged  $^3J_{\text{H}1'-\text{H}2'}$  coupling values at elevated temperatures (25°C), indicative of fast exchange between  $\text{C}2'$ -endo and  $\text{C}3'$ -endo sugar puckers. With the exception of residue U23, all measurable heteronuclear  $^3J_{\text{C}1'-2'\text{OH}}$  couplings are smaller than 4 Hz, with nucleotides in the lower stem exhibiting particularly small values ( $^3J_{\text{C}1'-2'\text{OH}} \approx 3$  Hz). Due to their small size, the achievable precision for the  $^3J_{\text{C}1'-2'\text{OH}}$  coupling measurements is limited, as evident from inspecting the relatively high error bars.

Similarly, resonance overlap and the absolute coupling size affect the measurement of the heteronuclear  $^3J_{\text{C}3'-2'\text{OH}}$  couplings (Figure 3(c)) using the  $\text{C}3'-\text{H}3'$  correlation. The observed  $^3J_{\text{C}3'-2'\text{OH}}$  couplings are, on average, larger than the corresponding  $^3J_{\text{C}1'-2'\text{OH}}$  couplings. Again, the smallest values are observed for the nucleotides in

the lower stem. Interestingly, the C3'–H3' cross-peaks of the apical hexaloop nucleotides do not disappear due to the conformational exchange of the ribose but considerably decrease in intensity. Therefore, the loop nucleotide  $^3J_{C3'-2'OH}$  couplings are characterized by large errors and are not reported here.

Unfortunately, no Karplus parameterization is available for either one of the heteronuclear J-couplings,  $^3J_{C1'-2'OH}$  or  $^3J_{C3'-2'OH}$ . However, an approximated Karplus curve for the  $^3J_{C1'-2'OH}$  and the  $^3J_{C3'-2'OH}$  coupling can be obtained (Figure 3(d), red and green lines) by scaling the coefficients for  $^3J_{C-H}$  couplings in alkenes ( $^3J_{C-H} = 3.6 \cos 2\phi - 1.0 \cos \phi$ , C 4.3) such that they are consistent with the averaged value of the  $^3J_{C-OH}$  coupling observed in ethanol (2.9 Hz).<sup>31</sup> Evidently, neither the difference in the substituents of the C1' and C3' nuclei nor the fact that these nuclei are part of a conformationally restricted ribose ring is considered in this crude estimate; therefore, this approximated Karplus relation as shown in Figure 3(d) should not be used to quantitatively interpret the  $^3J_{C1'-2'OH}$  or the  $^3J_{C3'-2'OH}$  couplings. A qualitative inspection of the approximated Karplus curves nevertheless permits us to assume that  $^3J_{C1'-2'OH}$  and  $^3J_{C3'-2'OH}$  in the base domain and in the region of the O3' domain where  $\theta = 90^\circ$ , whereas  $^3J_{C3'-2'OH}$  and  $^3J_{C1'-2'OH}$  in the region of the O3' domain with  $\theta = 90^\circ$ .

Subsequently, we performed a detailed conformational analysis of the q(H2'–C2'–O2'–H) torsion angle for the cytidine and guanosine residues located in the lower stem of the TAR RNA and of bulged uridine residues using a combination of three  $^3J_{H2'-2'OH}$ ,  $^3J_{C1'-2'OH}$  and  $^3J_{C3'-2'OH}$  scalar couplings and the NOE data. The nucleotides located in the upper stem and the AU base-pairs of the lower stem were not included in the analysis because the aforementioned rapid exchange of the 2'-OH with the solvent renders those J-coupling values meaningless. The nucleotides of the hexanucleotide loop were not considered either due to the apparent intermediate conformational exchange between the C2'-end and the C3'-end of the ribose.

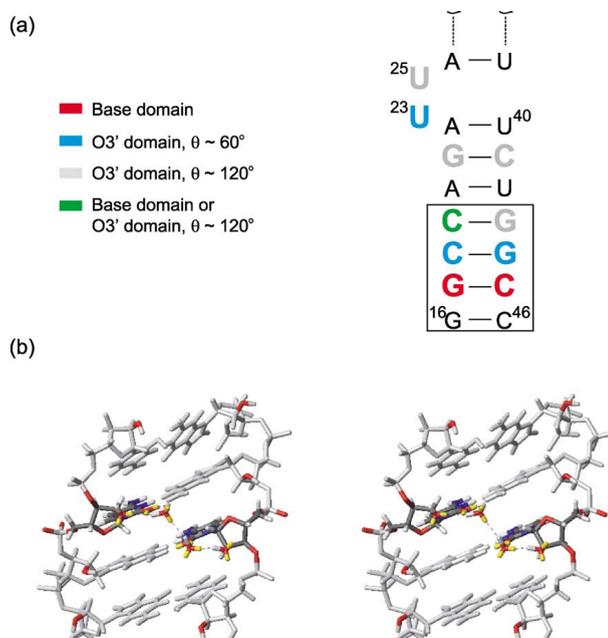
Our conformational analysis is based on the following criteria: (1) quantitative interpretation of the homonuclear  $^3J_{H2'-2'OH}$  scalar coupling according to the available Karplus parametrization;<sup>30</sup> (2) semi-quantitative interpretation of the relative magnitude of the heteronuclear  $^3J_{C1'-2'OH}$  and  $^3J_{C3'-2'OH}$  scalar couplings; (3) existence of the 2'-OH(i)–H6/H8(iC1) NOE cross-peak restricting the conformational space of the 2'-OH proton to the base domain or to a small region of the O3' domain ( $q = 60^\circ$ ).

For example, residue G17 shows a weak 2'-OH(i)–H6/H8(iC1) NOE cross-peak, which, taken together with the value of the  $^3J_{H2'-2'OH}$  coupling, permits the intervening torsion angle  $q$  to be either  $\theta = 45^\circ$  or  $\theta = 315^\circ$ ; a final comparison of the  $^3J_{C1'-2'OH}$  and  $^3J_{C3'-2'OH}$  scalar coupling magnitudes allows us to discriminate between the two

alternative solutions and rotates the torsion angle  $\theta$  of G17 into the base domain ( $\theta = 315^\circ$ ).

A schematic representation of the results obtained from this analysis for the nucleotides of the lower stem of the TAR–RNA is shown in Figure 4(a). The conformation of the 2'-OH groups of G17 and C45 is found in the base domain, as indicated by the presence of the 2'-OH(i)–H6/H8(iC1) NOE and by the relatively small value of the  $^3J_{C1'-2'OH}$  coupling. The 2'-OH groups of C18, U23, and G44 adopt an orientation within the O3' domain with the torsion angle  $\theta = 60^\circ$ , corroborated by the presence of the 2'-OH(i)–H6/H8(iC1) NOE, the high value of the  $^3J_{C1'-2'OH}$  coupling, and/or the small  $^3J_{C3'-2'OH}$  coupling. G21, U25, C41 and G43 project the 2'-OH group towards the O3' oxygen atom with  $q \approx 120^\circ$  as indicated by the absence of the 2'-OH(i)–H6/H8(iC1) NOE, a small value of the  $^3J_{C1'-2'OH}$  coupling, and/or a large value of the  $^3J_{C3'-2'OH}$  coupling. Finally, the conformation of the 2'-OH proton of C19 can only be restricted by the presence of the 2'-OH(i)–H6/H8(iC1) NOE, because the heteronuclear  $^3J_{C1'-2'OH}$  and  $^3J_{C3'-2'OH}$  couplings could not be measured reliably for this nucleotide. In summary, our analysis reveals that the H2'–C2'–O2'–H torsion angles of the canonical A-form lower stem nucleotides of the TAR–RNA populate both the base and the O3' domain, while the  $\theta$  torsion angles of the bulged uridine residues show a clear preference for the O3' domain.

A network of water-mediated hydrogen bonds anchored by the 2'-hydroxyl group has been proposed to stabilize the A-form RNA duplex.<sup>3</sup> The results of our study are in excellent agreement with this model. The 2'-hydroxyl group in the base domain donates an H-bond to a water molecule in the base plane, while the 2'-hydroxyl group projecting towards the O3' oxygen atom can accept an H-bond from a water molecule in the same base plane (Figure 4(b)). In contrast, if the 2'-OH group adopted a conformation within the O4' domain, the lone pair electrons of the O2' oxygen atom would occupy an unfavorable orientation for their participation in an H-bonding network involving water molecules located in the base plane. Consequently, the 2'-OH groups in the canonical A-form lower stem of the TAR–RNA never project into the O4' domain. Furthermore, we observe an alternating pattern of  $q$  torsion angles in the base and in the O3' domain for 3' and 5'-strand nucleotides in consecutive Watson–Crick G–C base-pair steps (5'-nucleotides 17–19 and 3'-nucleotides 43–45, respectively). Despite the limited statistical significance of this observation, such an alternating pattern with the H2'–C2'–O2'–H torsion angle adopting base and O3' domain conformations is required to fully support the network of hydrogen bonds described in the crystal structures of the RNA duplex.<sup>3</sup> In the crystal, the two water molecules spanning the minor groove share an H-bond with each other and function as H-bond donors to the functional N3/O2 groups within the base moiety. To complete an uninterrupted chain of H-bonds in the minor



The second water molecule is located in the plane of C45, where it participates as proton donor in an H-bond with the O2 of the base and in an H-bond with the 2'-OH (conformation in the base domain).

groove, one of the two water molecules must accept and one must donate an H-bond to the 2'-hydroxyl groups of nucleotides of opposite strands in consecutive base-pair steps (Figure 4(b)). The 2'-hydroxyl group can function as an H-bond donor to a water molecule in the base plane when  $\theta$  is in the base domain and, conversely, is able to accept a proton from the same water molecule when  $\theta$  is in the O3' domain. The ideal network of H-bond spanning the minor groove, postulated on the basis of the crystal structure of an RNA duplex, therefore requires that the  $H2'-C2'-O2'-H$  torsion angles of two nucleotides belonging to opposite strands in base-pair steps assume alternating base and O3' domain conformations.

Interestingly, the solvent exchange rates of the 2'-OH protons of the bulge nucleotides U23 and U25 are similar to those of the cytidine and guanosine bases in the lower stem. The scalar coupling data for the 2'-hydroxyl groups of U23 and U25 can be interpreted assuming a single conformation where the proton points towards the phosphate backbone in the O3' domain. The TAR RNA bulge region is intimately involved in ligand binding events. The bulged nucleotides, which are relatively flexible in the free TAR RNA, assume a well-defined, rigid conformation upon argininamide or magnesium binding.<sup>32-34</sup> The NMR experiments described here

were conducted in the absence of any ligands and thus may indicate pre-organized local conformation of the riboses of U23 and U25. It should be noted that the phosphate group between U23 and A22 located at the junction of the bulge and lower stem is important for Tat binding in the major groove of TAR.<sup>35</sup> Further studies that address the role of the 2'-hydroxyl group of uridine residues U23 and U25 in the specific recognition of positively charged ligands are ongoing.

Here, we present the first conformational analysis of the  $H2'-C2'-O2'-H$  torsion angle in a medium-sized RNA using a combination of scalar  $J$ -coupling and NOE data. The results obtained here are in good agreement with both molecular dynamics calculations<sup>17</sup> and X-ray studies<sup>3</sup> and confirm the fundamental role of the 2'-hydroxyl group in building a network of hydrogen bonds in the minor groove, which stabilizes the preferred canonical A-form geometry of RNA. These data have important implications for the future understanding of high-affinity recognition and discrimination of A-form-like geometries over canonical B-form or other helices in RNA-protein complexes. The methodology and experiments developed here are of general relevance to structural studies of RNAs and allow for an accurate determination of the location of the 2'-hydroxyl proton, which will

Figure 4. (a) Summary of the conformational preferences of the  $H2'-C2'-O2'-H$  torsion angle  $\theta$  of the cytidine and guanosine residues of the lower stem and bulged uridine residues of the HIV-2 TAR RNA. Both the base and the O3' domain are populated in an alternating manner, the bulged uridine residues show a clear preference for the O3' domain. Not a single  $H2'-C2'-O2'-H$  torsion angle in the O4' domain was observed. The boxed four closing base-pairs of the lower stem are shown in (b). (b) Network of water molecules bridging the nucleotides C18 and C45 in the minor groove of the lower stem of the HIV-2 TAR RNA, modeled in an ideal A-form helix. Functionally important groups are colored: C18 and C45 base nitrogen atoms are shown in blue; O2 base, O3' backbone, and ribose O2' oxygen atoms are shown in red; lone pairs of water, O2 base, and ribose O2' oxygen atoms are colored yellow. One water molecule is situated in the base plane of C18, where it participates in an H-bond as proton donor with the O2 of the base and in an H-bond as proton acceptor with the 2'-OH (conformation in the O3' domain).

help elucidate the fundamental role of the 2'-hydroxyl group in RNA function, ligand binding, and catalysis.

### Acknowledgements

We thank D. Treiber for helpful comments on the manuscript. This work was supported by the Max Planck Gesellschaft, the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB416, to T.C.) and the National Institutes of Health (AI040187, to M.H.).

### Supplementary Data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jmb.2005.11.043

### References

- Saenger, W. (1984). *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer Advanced Texts in Chemistry, Springer, New York.
- Gyi, J. I., Lane, A. N., Conn, G. L. & Brown, T. (1998). The orientation and dynamics of the C2'-OH and hydration of RNA and DNA-RNA hybrids. *Nucl. Acids Res.* 26, 3104-3110.
- Egli, M., Portmann, S. & Usman, N. (1996). RNA hydration: a detailed look. *Biochemistry* 35, 8489-8494.
- Cheong, C., Varani, G. & Tinoco, I., Jr (1990). Solution structure of an unusually stable RNA hairpin, 5'-GGAC(UUCG)GUCC. *Nature* 346, 680-682.
- Williams, D. J., Boots, J. L. & Hall, K. B. (2001). Thermodynamics of 2'-ribose substitutions in UUCG tetraloops. *RNA*, 7, 44-53.
- Chastain, M. & Tinoco, I. (1993). Nucleoside triples from the group-I intron. *Biochemistry* 32, 14220-14228.
- Lynch, S. R., Pelton, J. G. & Tinoco, I. (1996). NMR assignment of a 2'-hydroxyl proton from the UUCG tetraloop through long-range correlations with C-13. *Magn. Reson. Chem.* 34, S11-S17.
- Doherty, E. A., Batey, R. T., Masquida, B. & Doudna, J. A. (2001). A universal mode of helix packing in RNA. *Nature Struct. Biol.* 8, 339-343.
- Nixon, P. L., Rangan, A., Kim, Y. G., Rich, A., Hoffman, D. W., Hennig, M. & Giedroc, D. P. (2002). Solution structure of a luteoviral P1-P2 frameshifting mRNA pseudoknot. *J. Mol. Biol.* 322, 621-633.
- Theimer, C. A., Blois, C. A. & Feigon, J. (2005). Structure of the human telomerase RNA pseudoknot reveals conserved tertiary interactions essential for function. *Mol. Cell.* 17, 671-682.
- Eckstein, F. & Lilley, D. M. J. (1996). *Nucleic acids and molecular biology*. In *Catalytic RNA* (Eckstein, F. & Lilley, D. M. J., eds), vol. 10, Springer, Berlin.
- Gesteland, R. F., Cech, T. & Atkins, J. F. (1999). *The RNA World: The Nature of Modern RNA Suggests a Prebiotic RNA*. Cold Spring Harbor monograph series, monograph 37, 2nd edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Doherty, E. A. & Doudna, J. A. (2000). Ribozyme structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 597-615.
- Gordon, P. M., Fong, R., Deb, S. K., Li, N. S., Schwans, J. P., Ye, J. D. & Piccirilli, J. A. (2004). New strategies for exploring RNA's 2'-OH expose the importance of solvent during group II intron catalysis. *Chem. Biol.* 11, 237-246.
- Conte, M. R., Conn, G. L., Brown, T. & Lane, A. N. (1996). Hydration of the RNA duplex r(CGCAAAUUUGCG)<sub>2</sub> determined by NMR. *Nucl. Acids Res.* 24, 3693-3699.
- Giedroc, D. P., Cornish, P. V. & Hennig, M. (2003). Detection of scalar couplings involving 2'-hydroxyl protons across hydrogen bonds in a frameshifting mRNA pseudoknot. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 4676-4677.
- Auffinger, P. & Westhof, E. (1997). Rules governing the orientation of the 2'-hydroxyl group in RNA. *J. Mol. Biol.* 274, 54-63.
- Hennig, M., Fohrer, J. & Carlomagno, T. (2005). Assignment and NOE analysis of 2'-hydroxyl protons in RNA: implications for stabilization of RNA A-form duplexes. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 2028-2029.
- Seelamgari, A., Maddukuri, A., Berro, R., de la Fuente, C., Kehn, K., Deng, L. W. et al. (2004). Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front. Biosci.* 9, 2388-2413.
- Cavanagh, J. & Rance, M. (1992). Suppression of cross-relaxation effects in TOCSY spectra via a modified dipole-dipole mixing sequence. *J. Magn. Reson.* 96, 670-678.
- Lippens, G., Dhalluin, C. & Wieruszkeski, J. M. (1995). Use of a water flip-back pulse in the homonuclear NOESY experiment. *J. Biomol. NMR*, 5, 327-331.
- Acharya, P., Velikyan, I., Acharya, S. & Chattopadhyaya, J. (2001). Molecular modelling of 2'-OH mediated hydrogen bonding in ribonucleos (t)ides by NMR constrained AM1 and MMX calculations. *Nucleos. Nucleot. Nucl.* 20, 1211-1217.
- Acharya, P. & Chattopadhyaya, J. (2002). The hydrogen bonding and hydration of 2'-OH in adenosine and adenosine 3'-ethyl phosphate. *J. Org. Chem.* 67, 1852-1865.
- Vuister, G. W. & Bax, A. (1993). Quantitative J correlation—a new approach for measuring homonuclear 3-bond J(H(N)H(Alpha)) coupling-constants in <sup>15</sup>N-enriched proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 7772-7777.
- Scott, L. G., Tolbert, T. J. & Williamson, J. R. (2000). Preparation of specifically 2H- and <sup>13</sup>C-labeled ribonucleotides. *Methods Enzymol.* 317, 18-38.
- Gueron, M. & Leroy, J. L. (1995). Studies of base pair kinetics by NMR measurement of proton exchange. *Methods Enzymol.* 261, 383-413.
- Snoussi, K. & Leroy, J. L. (2001). Imino proton exchange and base-pair kinetics in RNA duplexes. *Biochemistry* 40, 8898-8904.
- Pan, Y. & MacKerell, A. D., Jr (2003). Altered structural fluctuations in duplex RNA versus DNA: a conformational switch involving base pair opening. *Nucl. Acids Res.* 31, 7131-7140.
- Giudice, E. & Lavery, R. (2003). Nucleic acid base pair dynamics: the impact of sequence and structure using free-energy calculations. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 4998-4999.
- Fraser, R. R., Kaufman, M., Morand, P. & Govil, G. (1969). Stereochemical dependence of vicinal H-C-O-H coupling constants. *Can. J. Chem.* 47, 403-409.
- Kalinowski, H.-O., Berger, S. & Braun, S. (1988). *Carbon 13 NMR Spectroscopy* Wiley, New York.
- Zacharias, M. & Hagerman, P. J. (1995). The bend in RNA created by the trans-activation response element

- bulge of human immunodeficiency virus is straightened by arginine and by Tat-derived peptide. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 92, 6052–6056.
33. Brodsky, A. S. & Williamson, J. R. (1997). Solution structure of the HIV-2 TAR-argininamide complex. *J. Mol. Biol.* 267, 624–639.
34. Pitt, S. W., Majumdar, A., Serganov, A., Patel, D. J. & Al-Hashimi, H. M. (2004). Argininamide binding arrests global motions in HIV-1 TAR RNA: comparison with Mg<sup>2+</sup>-induced conformational stabilization. *J. Mol. Biol.* 338, 7–16.
35. Hamy, F., Asseline, U., Grasby, J., Iwai, S., Pritchard, C., Slim, G. et al. (1993). Hydrogen-bonding contacts in the major groove are required for human-immunodeficiency-virus type-1 Tat protein recognition of Tar RNA. *J. Mol. Biol.* 230, 111–123.
36. Geen, H. & Freeman, R. (1991). Band-selective radio-frequency pulses. *J. Magn. Reson.* 93, 93–141.

Edited by M. F. Summers

(Received 24 August 2005; received in revised form 9 November 2005; accepted 4 November 2005)  
Available online 1 December 2005

DOI: 10.1002/anie.200602583

**Calculation of the Dependence of Homo- and Heteronuclear  $^3J$  and  $^2J$  Scalar Couplings for the Determination of the 2'-Hydroxy Conformation in RNA\*\***

 Jörg Fohrer, Uwe Reinscheid, Mirko Hennig, and  
Teresa Carlomagno\*

The presence or absence of the 2'-hydroxy group within the pentose sugar accounts for the major difference between RNA and DNA. In canonical environments, the pentose sugars of RNA and DNA adopt C3'-*endo* and C2'-*endo* conformations, respectively, leading to distinct differences in the hydration and structural stability.<sup>[1]</sup> In addition to the conformational preferences imposed by the 2'-OH group, its vital role in RNA catalysis has been studied extensively for self-splicing viral ribozymes, type II introns and spliceosomal RNAs.<sup>[2–4]</sup> Thus, conformational studies of 2'-hydroxy groups provide unique insights into the structural features of RNA and shed light on the structure–activity relationship of RNA catalytic processes.

Recently, we reported the assignments and conformational analysis of the 2'-hydroxy groups in the 30-mer HIV-2 transactivation response element (TAR) RNA<sup>[5]</sup> in solution at low temperature,<sup>[6,7]</sup> while another study from Ying and Bax focuses on the conformational analysis of the 2'-hydroxy groups in the RNA hairpin derived from the helix 35 of the 23S ribosomal RNA.<sup>[8]</sup> Molecular dynamics (MD) simulations of an RNA hairpin previously identified three preferred orientations for the 2'-hydroxy proton when the ribose sugar adopts the C3'-*endo* pucker:<sup>[9]</sup> a) toward O3', stabilized by attractive electrostatic interaction with the phosphate backbone (O3' domain), b) toward O4', stabilized by intra-ribose electrostatic interactions (O4' domain) and c) toward the base, stabilized by interactions with the N3 or O2 atom of the attached base (base domain). In our previous study we reported preferences for the 2'-OH groups of canonical A-

[\*] Dipl.-Chem. J. Fohrer, Dr. U. Reinscheid, Dr. T. Carlomagno  
Abteilung 030  
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie  
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Germany)  
Fax: (+49) 551-201-2202  
E-mail: taco@nmr.mpibpc.mpg.de

Prof. M. Hennig  
Department of Biochemistry and Molecular Biology  
Medical University of South Carolina  
173 Ashley Avenue, P.O. Box 250509  
Charleston, SC 29425 (USA)

[\*\*] J.F. thanks C. Boehme for help with the Gaussian program and C. Schwiegk for technical assistance. This work was supported by the MPG, the DFG (SFB416 to T.C.), and the National Institutes of Health (AI040187, to M.H.).

 Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.angewandte.org> or from the author.

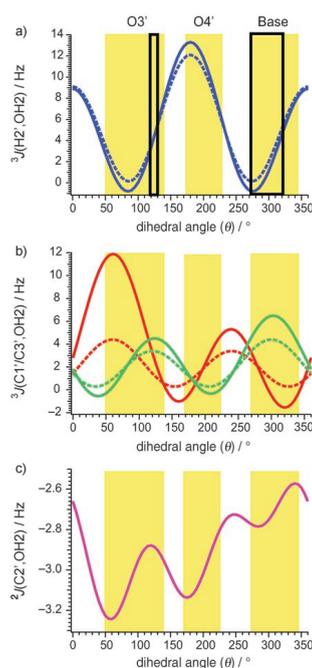
## Communications

form helical regions to occupy the O3' or base domains,<sup>[7]</sup> while the work of Ying and Bax places all 2'-OH groups of the hairpin RNA in the base domain.<sup>[8]</sup> Both findings support a stabilizing network of hydrogen bonds that spans the minor groove of the RNA helix and includes two water molecules in the base plane of nucleotides belonging to opposite strands in a base pair step. Such network of hydrogen bonds has been proposed in a high-resolution X-ray study of an RNA duplex.<sup>[10]</sup> Although  $^3J(\text{C1}',\text{OH2})$  and  $^3J(\text{C3}',\text{OH2})$  couplings could be obtained for several residues of the RNAs under investigation at low temperature, thus far the absence of a Karplus-like parametrization of the heteronuclear couplings impeded the quantitative analysis of the  $^3J(\text{C1}',\text{OH2})$  and  $^3J(\text{C3}',\text{OH2})$ .

Here we present *ab initio* calculations, using density functional theory (DFT), to derive the Karplus-like relations for the heteronuclear and homonuclear  $^3J(\text{C1}'/\text{C3}'/\text{H2}',\text{OH2})$  and  $^2J(\text{C2}',\text{OH2})$  couplings involving the 2'-hydroxy group. Establishing the dependence of the  $^3J(\text{C1}'/\text{C3}'/\text{H2}',\text{OH2})$  on the intervening dihedral angle  $\text{H2}'\text{-C2}'\text{-O2}'\text{-OH}$  is essential for a quantitative analysis of the measured scalar couplings and thus allows the accurate determination of the 2'-hydroxy group conformation.

The DFT calculations of the  $^3J(\text{C1}'/\text{C3}'/\text{H2}',\text{OH2})$  and  $^2J(\text{C2}',\text{OH2})$  couplings were performed using Gaussian 03 Revision C.02<sup>[11]</sup> on a ribose molecule bearing an amino group at C1' along with a phosphodiester attached to the 3'-hydroxy group. A geometry optimization was carried out with the ribose in the C3'-*endo* conformation using a b3Lyp/6-31g(d) basis set as implemented in Gaussian.<sup>[12,13]</sup> The dihedral angles of the ribose ring remained within the typical ranges for the C3'-*endo* sugar pucker during the geometry optimization. The  $^3J$  and  $^2J$  couplings related to the orientation of the 2'-hydroxy group were calculated using a b3Lyp/6-311g(2df, 2pd) basis set. The dependence of the three vicinal  $^3J(\text{C1}'/\text{C3}'/\text{H2}',\text{OH2})$  and the two-bond  $^2J(\text{C2}',\text{OH2})$  scalar couplings on the intervening  $\text{H2}'\text{-C2}'\text{-O2}'\text{-OH}$  dihedral angle  $\theta$  is shown in Figure 1 (see also Table S1 in the Supporting Information for the theoretical coupling values at each angle  $\theta$ ).

The calculated Karplus-like curve for the homonuclear  $^3J(\text{H2}',\text{OH2})$  coupling compares well to the Karplus-like curve determined from experimental data on model compounds reported by Fraser et al.<sup>[14]</sup> and confirms the good quality of the model system used in the DFT calculations. The two curves for the heteronuclear  $^3J(\text{C1}'/\text{C3}',\text{OH2})$  couplings are asymmetric and differ substantially from each other. In Figure 1 we compare the dependence of the  $^3J(\text{C1}'/\text{C3}',\text{OH2})$  couplings on the  $\text{H2}'\text{-C2}'\text{-O2}'\text{-OH}$  dihedral angle calculated here (continuous lines) with a crude approximation of the Karplus-like curves used in our previous work.<sup>[7]</sup> This approximated dependence was obtained by scaling the coefficients of the  $^3J(\text{C,H})$  Karplus relation in alkenes to reflect the averaged value of the  $^3J(\text{C,OH})$  coupling in ethanol (dashed lines). In the theoretically calculated curve, the  $^3J(\text{C3}',\text{OH2})$  coupling reaches a maximum of 6.5 Hz at  $\theta = 302^\circ$  (Figure 1b, green continuous line). The averaged coupling, assuming equal populations of the *gauche* +, *gauche* -, and *trans* conformations, is 2.3 Hz, in good qualitative agreement with the average coupling of 2.9 Hz



**Figure 1.** a) DFT-derived Karplus relations for the dependence of the  $^3J(\text{H2}',\text{OH2})$  coupling on the dihedral angle  $\text{H2}'\text{-C2}'\text{-O2}'\text{-OH}$ ,  $\theta$ . The Karplus-like curve  $^3J(\text{H2}',\text{OH2}) = 11.8 \cos^2 \theta - 2.2 \cos \theta - 0.7$  derived by the DFT calculations is represented by the blue continuous line, while the Karplus-like curve determined by Fraser et al.<sup>[14]</sup> using two experimental values for 3 $\beta$ -acetoxy-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -oxidocholestan-19-ol, is shown by the dashed blue line for comparison. b) DFT-derived Karplus relations for the dependence of the  $^3J(\text{C1}',\text{OH2})$  and  $^3J(\text{C3}',\text{OH2})$  couplings on the dihedral angle  $\text{H2}'\text{-C2}'\text{-O2}'\text{-OH}$ .  $^3J(\text{C1}',\text{OH2}) = 9.6 \sin^2(\theta + 30) + 3.3 \sin(\theta + 25.3) - 1.0$  (in red) and  $^3J(\text{C3}',\text{OH2}) = 5.9 \sin^2(\theta - 33.2) - 1.0 \sin(\theta - 27.0) - 0.4$  (in green). The dashed lines represent the crude approximations derived in Reference [7] by scaling the coefficients of the  $^3J(\text{C,H})$  Karplus relation in alkenes to reflect the averaged value of the  $^3J(\text{C,OH})$  coupling in ethanol. c) DFT-derived relation for the dependence of the  $^2J(\text{C2}',\text{OH2})$  coupling on the dihedral angle  $\text{H2}'\text{-C2}'\text{-O2}'\text{-OH}$ :  $^2J(\text{C2}',\text{OH2}) = 0.6 \cos^3(\theta + 5.9) - 0.2 \cos^2(\theta - 46.1) - 0.4 \cos(\theta - 21.2) - 2.8$ . Preferred conformational regions for the 2'-hydroxy proton identified by MD simulations are in yellow.<sup>[8]</sup> The black rectangles show the conformational regions in agreement with averaged and maximum scalar coupling values.

observed for the  $^3J(\text{C,OH})$  coupling in ethanol.<sup>[15]</sup> On the other hand, the  $^3J(\text{C1}',\text{OH2})$  coupling adopts the maximum value of 11.6 Hz at  $\theta = 62^\circ$  (Figure 1b, red continuous line), which largely deviates from the crude approximation used previously (Figure 1b, red dashed line).<sup>[7]</sup> The  $^2J(\text{C2}',\text{OH2})$  coupling assumes quite uniform values ranging from  $-3.3$  to  $-2.6$  Hz and shows only a moderate dependence on  $\theta$ . These values are in very good agreement with those measured by Ying and Bax.<sup>[8]</sup>

To understand the reasons for the strong asymmetry of the two  $^3J(\text{C1}'/\text{C3}',\text{OH2})$  couplings, we performed DFT calculations to obtain the  $^3J(\text{C1}'/\text{C3}',\text{OH})$  value for the linear 1-(dimethylamino)-2-hydroxy-1-methoxybutane-3-methylphosphate at dihedral angles  $\theta(\text{H-C-O-H})=60^\circ$  and  $300^\circ$  (Table S1 in the Supporting Information). The very similar values obtained for the  $^3J(\text{C1}',\text{OH2})$  and the  $^3J(\text{C3}',\text{OH2})$  couplings at  $\theta=60^\circ$  and  $300^\circ$ , respectively, indicate that the strong asymmetry of the couplings in the ribose results from the cyclic structure of the sugar. Additionally, we verified the possibility that the high value observed at  $62^\circ$  for the  $^3J(\text{C1}',\text{OH2})$  coupling could be significantly reduced by the involvement of the 2'-OH in a hydrogen bond either as a proton donor or acceptor. However, the presence of a water molecule that forms a hydrogen bond with the 2'-OH reduces the maximum value of the  $^3J(\text{C1}',\text{OH2})$  coupling by 0.8 Hz only.

The effect of the ribose conformation on the Karplus-like relationship of the  $^3J(\text{C1}'/\text{C3}'/\text{H2}',\text{OH2})$  couplings was verified by calculating the three couplings at the diagnostic  $\theta$  angles of  $60^\circ$  and  $300^\circ$  for a ribose assuming the C2'-endo conformation. The values of the  $^3J(\text{C1}',\text{OH2})$  and the  $^3J(\text{H2}',\text{OH2})$  couplings are not significantly affected by the ribose conformation ( $< 0.5$  Hz), while the  $^3J(\text{C3}',\text{OH2})$  and the  $^3J(\text{C2}',\text{OH2})$  couplings increase at  $\theta=300^\circ$  by 1.6 Hz and  $-0.8$  Hz, respectively.

The pronounced difference of both the  $^3J(\text{C1}',\text{OH2})$  and the  $^3J(\text{H2}',\text{OH2})$  couplings associated with the three distinct, preferred conformational regions (Figure 1) readily allows for distinguishing the conformational preferences around the dihedral angle  $\text{H2}'\text{-C2}'\text{-O2}'\text{-OH}$  when these couplings are available. In our previous work we found that the  $^3J(\text{H2}',\text{OH2})$  and the  $^3J(\text{C1}',\text{OH2})$  couplings did not exceed 5.5 and 4.0 Hz, respectively, for each RNA residue, while Ying and Bax measure uniform values of the  $^3J(\text{C1}',\text{OH2})$  couplings of the order of 1.5 Hz.<sup>[8]</sup> Furthermore, in both studies the  $^3J(\text{C3}',\text{OH2})$  coupling is found to be on average larger than the  $^3J(\text{C1}',\text{OH2})$  coupling. These observations, in combination with the Karplus-like dependence calculated here, limit the conformational space accessible to the 2'-hydroxy group to a very small region of the O3' domain ( $\theta=120\text{--}130^\circ$ ) or to a large portion of the base domain ( $\theta=270\text{--}320^\circ$ ; Figure 1). However, the observation that the H4',OH2 NOE is always smaller than the H1',OH2 NOE, as reported by Ying and Bax<sup>[8]</sup> for the RNA hairpin derived from the helix 35 of the 23S ribosomal RNA and measured by us for the G nucleotides in the helical regions of the TAR-RNA (Table S3 in the Supporting Information) seems to rule out population of the O3' domain with  $\theta > 90^\circ$  (Figure S2 in the Supporting Information). In contrast, the approximated version of the Karplus dependence for the  $^3J(\text{C1}'/\text{C3}',\text{OH2})$  couplings used in our previous work together with the measured heteronuclear couplings allowed for population of a large portion of the O3' domain.

Thus far, the values of the  $^3J(\text{C1}'/\text{C3}'/\text{H2}',\text{OH2})$  scalar couplings have been interpreted assuming one single conformation of the 2'-OH group. However, the ratio of the NOEs involving the 2'-OH reported by Ying and Bax<sup>[8]</sup> and measured here for the G nucleotides of the TAR-RNA

(Table S3 in the Supporting Information) do not fully reconcile with the 2'-hydroxy groups occupying the base domain. While the H4',OH2 NOE is always smaller than the H1',OH2 NOE in the base domain, population of this domain exclusively would imply that the H4',OH2:H1',OH2 NOE ratio is approximately 0.1 while the H2',OH2:H1',OH2 NOE ratio is less than 2 or that the H4',OH2:H1',OH2 NOE ratio is greater than 0.1 while the H2',OH2:H1',OH2 NOE ratio is greater than 2 for a ribose molecule with  $\tau_c=5$  ns and in the presence of spin diffusion effects. The average ratios of 0.24 for the H4',OH2:H1',OH2 NOEs and of 1.25 for the H2',OH2:H1',OH2 NOEs suggest that conformational averaging is in effect. The absence of high values for all the measured couplings together with the mean values of each coupling and of the NOE ratios would reconcile with conformational averaging of the 2'-OH group between the O3' domain with  $\theta$  close to  $120^\circ$  and the base domain. This picture would still support the involvement of the 2'-OH in a network of hydrogen bonds spanning the minor groove.<sup>[7,10]</sup> The 2'-hydroxy group of one of the two nucleotides would switch between the O3' domain, where it can accept a hydrogen bond from a water molecule, and the base domain, where it can function as a proton donor in a hydrogen bond with a water molecule, while the second nucleotide would remain in the base domain. Both situations, where the two 2'-hydroxy groups of opposite nucleotides in base pair steps are either alternatively in the O3' and base domain or both in the base domain, support the hydration model of the minor groove proposed by Egli et al.<sup>[10]</sup> Conformational averaging between the O3' domain and base domain for one of the two nucleotides would imply that one 2'-hydroxy and one water molecule concertedly switch their acceptor-donor roles.

The hypothesis of a two-state model for the conformation of the 2'-hydroxy group has to be verified by a quantitative interpretation of precisely measured  $^3J(\text{C1}'/\text{C3}'/\text{H2}',\text{OH2})$  couplings together with diagnostic NOEs between the 2'-OH and the ribose protons. The Karplus parametrization reported here is an essential tool for this analysis and thus for an accurate understanding of the structural and functional role of the 2'-hydroxy group in RNA.

### Experimental Section

The  $^2J$  and the  $^3J$  couplings involving the 2'-hydroxy groups were calculated using the DFT approach as implemented in Gaussian 03 Revision C.02.<sup>[11]</sup> The total nuclear spin-spin coupling was determined using the b3Lyp/6-311g(2df,2pd) basis set calculating the contributing Fermi contact (FC), spin dipolar (SD), paramagnetic spin orbit (PSO), and diamagnetic spin orbit (DSO) terms. The NOEs of the 2'-OH groups were measured in a  $^{13}\text{C}$ -edited HSQC NOESY spectrum with a mixing time of 50 ms for a 1.5 mM sample of  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  G-labeled TAR-RNA dissolved in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (90:10) at pH 6.4 (10 mM phosphate buffer, 50 mM sodium chloride).

Received: June 28, 2006

Published online: September 27, 2006

**Keywords:** ab initio calculations · Karplus relationship · NMR spectroscopy · RNA

**Communications**

- 
- [1] J. I. Gyi, A. N. Lane, G. L. Conn, T. Brown, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3104–3110.
  - [2] R. F. Gesteland, T. Chech in *The RNA World* (Eds.: R. F. Gesteland, T. Chech, J. F. Atkins), Cold Spring Harbor, New York, **1998**.
  - [3] E. A. Doherty, J. A. Doudna, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 597–615.
  - [4] F. Eckstein, D. M. J. Lilley in *Catalytic RNA* (Eds.: F. Eckstein, D. M. J. Lilley), Springer, Berlin, **1997**.
  - [5] A. S. Brodsky, J. R. Williamson, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 624–639.
  - [6] M. Hennig, J. Fohrer, T. Carlomagno, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2028–2029.
  - [7] J. Fohrer, M. Hennig, T. Carlomagno, *J. Mol. Biol.* **2006**, *356*, 280–287.
  - [8] J. Ying, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8372–8373.
  - [9] P. Auffinger, E. Westhof, *J. Mol. Biol.* **1997**, *274*, 54–63.
  - [10] M. Egli, S. Portmann, N. Usman, *Biochemistry* **1996**, *35*, 8489–8494.
  - [11] M. J. Frisch et al. Gaussian Inc. Wallingford CT, **2004**.
  - [12] A. D. Becke, *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098–3100.
  - [13] A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
  - [14] R. R. Fraser, M. Kaufman, P. Morand, G. Govil, *Can. J. Chem.* **1969**, *47*, 403–409.
  - [15] H. O. Kalinowski, S. Berger, S. Braun in *Carbon <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy*, Wiley, Chichester, **1984**.



# Literaturverzeichnis

- [1] T. Tuschl, P. A. Sharp, and D. P. Bartel. A ribozyme selected from variants of u6 snrna promotes 2',5'-branch formation. *RNA*, 7(3):496–496, 2001.
- [2] A. E. McKee and P. A. Silver. Systems perspectives on mrna processing. *Cell Research*, 17(7):581–590, 2007.
- [3] M. G. Gu and C. D. Lima. Processing the message: structural insights into capping and decapping mrna. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(1):99–106, 2005.
- [4] S. Valadlkhan. The spliceosome: a ribozyme at heart? *Biological Chemistry*, 388(7):693–697, 2007.
- [5] M. R. Stahley and S. A. Strobel. Rna splicing: group i intron crystal structures reveal the basis of splice site selection and metal ion catalysis. *Current Opinion in Structural Biology*, 16(3):319–326, 2006.
- [6] K. Lehmann and U. Schmidt. Group ii introns: Structure and catalytic versatility of large natural ribozymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 38(3):249–303, 2003.
- [7] P. A. Sharp. The discovery of split genes and rna splicing. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(6):279–281, 2005.
- [8] S. Altman. A view of rnase p. *Molecular Biosystems*, 3(9):604–607, 2007.
- [9] P. A. Sharp. Split genes and rna splicing. *Cell*, 77(6):805–815, 1994.
- [10] F. Saida and B. Odaert. Rna recognition and cleavage by sequence-specific endoribonucleases. *Protein and Peptide Letters*, 14(2):103–111, 2007.
- [11] N. Jarrous and R. Reiner. Human rnase p: a trna-processing enzyme and transcription factor. *Nucleic Acids Research*, 35(11):3519–3524, 2007.

- [12] E. Brody and J. Abelson. The spliceosome - yeast pre-messenger rna associates with a 40s complex in a splicing-dependent reaction. *Science*, 228(4702):963–967, 1985.
- [13] H. D. Madhani and C. Guthrie. Dynamic rna-rna interactions in the spliceosome. *Annual Review of Genetics*, 28:1–26, 1994.
- [14] C. Guthrie and B. Patterson. Spliceosomal snrnas. *Annual Reviews of Genetics*, 22:387–419, 1988.
- [15] S. R. Schmid and P. Linder. D-e-a-d protein family of putative rna helicases. *Molecular Microbiology*, 6(3):283–292, 1992.
- [16] S. W. Ruby, T. H. Chang, and J. Abelson. 4 yeast spliceosomal proteins (prp5, prp9, prp11, and prp21) interact to promote u2 snrnp binding to pre-messenger rna. *Genes Development*, 7(10):1909–1925, 1993.
- [17] H. D. Madhani and C. Guthrie. Genetic interactions between the yeast rna helicase homolog prp16 and spliceosomal snrnas identify candidate ligands for the prp16 rna-dependent atpase. *Genetics*, 137(3):677–687, 1994.
- [18] S. R. Price, P. R. Evens, and K. Nagai. Crystal structure of the spliceosomal u2b ”-u2a ’ protein complex bound to a fragment of u2 small nuclear rna. *Nature*, 394(6694):645–650, 1998.
- [19] R. J. Grainger and J. D. Beggs. Prp8 protein: At the heart of the spliceosome. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 11(5):533–557, 2005.
- [20] H. L. Murray and K. A. Jarrell. Flipping the switch to an active spliceosome. *Cell*, 96(5):599–602, 1999.
- [21] B. B. Konforti, M. J. Koziolkiewicz, and M. M. Konarska. Disruption of base-pairing between the 5’ splice-site and the 5’ end of u1 snrna is required for spliceosome assembly. *Cell*, 75(5):863–873, 1993.
- [22] M. J. Moore and P. A. Sharp. Site-specific modification of pre-messenger-rna - the 2’-hydroxyl groups at the splice sites. *Science*, 256(5059):992–997, 1992.
- [23] T. R. Cech. The chemistry of self-splicing rna and rna enzymes. *Science*, 236(4808):1532–1539, 1987.

- [24] R. F. Gesteland, T. R. Cech, and J. F. Atkins. *The RNA World, Second Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York USA, 1999.
- [25] A. A. Patel and J. A. Steitz. Splicind double: Insights from the second spliceosome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(0):960–970, 2003.
- [26] H. Domdey, B. Apostol, R. J. Lin, A. Newman, E. Brody, and J. Abelson. Lariat structures are invivo intermediates in yeast pre-messenger rna splicing. *Cell*, 39(3):611–621, 1984.
- [27] B. Ruskin, A. R. Krainer, T. Maniatis, and M. R. Green. Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-messenger rna splicing invitro. *Cell*, 38(1):317–331, 1984.
- [28] R. Vanderveen, A. C. Arnberg, G. Vanderhorst, L. Bonen, H. F. Tabak, and L. A. Grivell. Excised group-ii introns in yeast mitochondria are lariats and can be formed by self-splicing invitro. *Cell*, 44(2):225–234, 1986.
- [29] C. L. Peebles, P. S. Perlman, K. L. Mecklenburg, M. L. Petrillo, J. H. Tabor, K. A. Jarrell, and H. L. Cheng. A self-splicing rna excises an intron lariat. *Cell*, 44(2):213–223, 1986.
- [30] S. Valadkhan and J. L. Manley. A tertiary interaction detested in a human u2-u6 snrna complex assembled in vitro resembles a genetically proven interaction in yeast. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 6(2):206–219, 2000.
- [31] S. Valadkhan and J. L. Manley. Splicing-related catalysis by protein-free snrnas. *Nature*, 413(6857):701–707, 2001.
- [32] A. Newman and C. Norman. Mutations in yeast u5 snrna alter the specificity of 5' splice-site cleavage. *Cell*, 65(1):115–123, 1991.
- [33] A. J. Newman and C. Norman. U5 snrna interacts with exon sequences at 5' and 3' splice sites. *Cell*, 68(4):743–754, 1992.
- [34] J. R. Wyatt, E. J. Sontheimer, and J. A. Steitz. Site-specific cross-linking of mammalian u5 snrnp to the 5' splice site before the 1st step of premessenger rna splicing. *Genes Development*, 6(12B):2542–2553, 1992.

- [35] J. J. Cortes, E. J. Sontheimer, S. D. Seiwert, and J. A. Steitz. Mutations in the conserved loop of human u5 snrna generate use of novel cryptic 5' splice sites in-vivo. *Embo Journal*, 12(13):5181–5189, 1993.
- [36] E. J. Sontheimer and J. A. Steitz. The u5 and u6 small nuclear rnas as active-site components of the spliceosome. *Science*, 262(5142):1989–1996, 1993.
- [37] J. D. Watson and F. H. C. Crick. Molecular structure of nucleic acids - a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356):737–738, 1953.
- [38] D. L. Black, B. Chabot, and J. A. Steitz. U2 as well as u1 small nuclear ribonucleoproteins are involved in pre-messenger rna splicing. *Cell*, 42(3):737–750, 1985.
- [39] H. Sawa and Y. Shimura. Association of u6 snrna with the 5'-splice site region of pre-messenger-rna in the spliceosome. *Genes Development*, 6(2):244–254, 1992.
- [40] H. Sawa and J. Abelson. Evidence for a base-pairing interaction between u6 small nuclear-rna and the 5' splice site during the splicing reaction in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(23):11269–11273, 1992.
- [41] D. A. Wassarman and J. A. Steitz. Interactions of small nuclear rnas with precursor messenger-rna during invitro splicing. *Science*, 257(5078):1918–1925, 1992.
- [42] S. Kandelslewis and B. Seraphin. Role of u6 snrna in 5' splice-site selection. *Science*, 262(5142):2035–2039, 1993.
- [43] C. F. Lesser and C. Guthrie. Mutations in u6 snrna that alter splice-site specificity - implications for the active-site. *Science*, 262(5142):1982–1988, 1993.
- [44] R. G. Pearson. Hard and soft acids and bases. *Journal of the American Chemical Society*, 85(22):3533–, 1963.
- [45] S. L. Yean, G. Wuenschell, J. Termini, and R. J. Lin. Metal-ion coordination by u6 small nuclear rna contributes to catalysis in the spliceosome. *Nature*, 408(6814):881–884, 2000.

- [46] C. C. Query, M. J. Moore, and P. A. Sharp. Branch nucleophile selection in pre-messenger-rna splicing - evidence for the bulged duplex model. *Genes Development*, 8(5):587–597, 1994.
- [47] M. I. Zavanelli and M. Ares. Efficient association of u2 snrnps with pre-messenger-rna requires an essential u2 rna structural element. *Genes Development*, 5(12B):2521–2533, 1991.
- [48] S. Liu, P. Li, O. Dybkov, S. Nottrott, K. Hartmuth, R. Luhrmann, T. Carlomagno, and M. C. Wahl. Binding of the human prp31 nop domain to a composite rna-protein platform in u4 snrnp. *Science*, 316(5821):115–120, 2007.
- [49] H. D. Madhani and C. Guthrie. A novel base-pairing interaction between u2 and u6 snrnas suggests a mechanism for the catalytic activation of the spliceosome. *Cell*, 71(5):803–817, 1992.
- [50] T. Wolff, R. Menssen, J. Hammel, and A. Bindereif. Splicing function of mammalian u6 small nuclear-rna - conserved positions in central domain and helix-i are essential during the 1st and 2nd step of premessenger rna splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(3):903–907, 1994.
- [51] D. G. Sashital, G. Cornilescu, and S. E. Butcher. U2-u6 rna folding reveals a group ii intron-like domain and a four-helix junction. *Nature Structural Molecular Biology*, 11(12):1237–1242, 2004.
- [52] A. Kumar, R. R. Ernst, and K. Wuthrich. A two-dimensional nuclear overhauser enhancement (2d noe) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 95(1):1–6, 1980.
- [53] M. Hennig and J. R. Williamson. Detection of n-h center dot center dot center dot n hydrogen bonding in rna via scalar couplings in the absence of observable imino proton resonances. *Nucleic Acids Research*, 28(7):1585–1593, 2000.
- [54] P. B. Rupert and A. R. Ferre-D’Amare. Crystal structure of a hairpin ribozyme-inhibitor complex with implications for catalysis. *Nature*, 410(6830):780–786, 2001.
- [55] J. S. Sun and J. L. Manley. A novel u2-u6 snrna structure is necessary for mammalian messenger-rna splicing. *Genes Development*, 9(7):843–854, 1995.

- [56] D. E. Ryan and J. Abelson. The conserved central domain of yeast u6 snrna: Importance of u2-u6 helix i-a in spliceosome assembly. *RNA*, 8(8):997–1010, 2002.
- [57] A. K. Hilliker and J. P. Staley. Multiple functions for the invariant agc triad of u6 snrna. *RNA*, 10(6):921–928, 2004.
- [58] B. M. Rhode, K. Hartmuth, E. Westhof, and R. Luhrmann. Proximity of conserved u6 and u2 snrna elements to the 5' splice site region in activated spliceosomes. *Embo Journal*, 25(11):2475–2486, 2006.
- [59] S. Joseph and H. F. Noller. Directed hydroxyl radical probing using iron(ii) tethered to rna. *Rna-Ligand Interactions, Part B*, 318:175–190, 2000.
- [60] S. P. Chan, D. I. Kao, W. Y. Tsai, and S. C. Cheng. The prp19p-associated complex in spliceosome activation. *Science*, 302(5643):279–282, 2003.
- [61] T. A. Steitz and J. A. Steitz. A general 2-metal-ion mechanism for catalytic rna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(14):6498–6502, 1993.
- [62] T. W. Nilsen. Rna splicing - the case for an rna enzyme. *Nature*, 408(6814):782–783, 2000.
- [63] F. Q. Yuan, L. Griffin, L. J. Phelps, V. Buschmann, K. Weston, and N. L. Greenbaum. Use of a novel forster resonance energy transfer method to identify locations of site-bound metal ions in the u2-u6 snrna complex. *Nucleic Acids Research*, 35(9):2833–2845, 2007.
- [64] M. M. Konarska, J. Vilardell, and C. C. Query. Repositioning of the reaction intermediate within the catalytic center of the spliceosome. *Molecular Cell*, 21(4):543–553, 2006.
- [65] J. G. Umen and C. Guthrie. The second catalytic step of pre-mrna splicing. *RNA*, 1(9):869–885, 1995.
- [66] B. Schwer and C. H. Gross. Prp22, a dexh-box rna helicase, plays two distinct roles in yeast pre-mrna splicing. *Embo Journal*, 17(7):2086–2094, 1998.
- [67] T. Tuschl, P. A. Sharp, and D. P. Bartel. Selection in vitro of novel ribozymes from a partially randomized u2 and u6 snrna library. *Embo Journal*, 17(9):2637–2650, 1998.

- [68] O. Fedorova and N. Zingler. Group ii introns: structure, folding and splicing mechanism. *Biological Chemistry*, 388(7):665–678, 2007.
- [69] P. A. Sharp and C. B. Burge. Classification of introns: U2-type or u12-type. *Cell*, 91(7):875–879, 1997.
- [70] M. Morl, I. Niemer, and C. Schmeizer. New reactions catalyzed by a group-ii intron ribozyme with rna and dna substrates. *Cell*, 70(5):803–810, 1992.
- [71] D. Herschlag, J. A. Piccirilli, and T. R. Cech. Ribozyme-catalyzed and nonenzymatic reactions of phosphate diesters - rate effects upon substitution of sulfur for a nonbridging phosphoryl oxygen atom. *Biochemistry*, 30(20):4844–4854, 1991.
- [72] I. Wong, S. S. Patel, and K. A. Johnson. An induced-fit kinetic mechanism for dna-replication fidelity - direct measurement by single-turnover kinetics. *Biochemistry*, 30(2):526–537, 1991.
- [73] C. Tuerk, P. Gauss, C. Thermes, D. R. Groebe, M. Gayle, N. Guild, G. Stormo, Y. Daubentoncarafa, O. C. Uhlenbeck, I. Tinoco, E. N. Brody, and L. Gold. Cuucgg hairpins - extraordinarily stable rna secondary structures associated with various biochemical processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(5):1364–1368, 1988.
- [74] G. Varani, C. J. Cheong, and I. Tinoco. Structure of an unusually stable rna hairpin. *Biochemistry*, 30(13):3280–3289, 1991.
- [75] R. T. Batey, R. P. Rambo, and J. A. Doudna. Tertiary motifs in rna structure and folding. *Angewandte Chemie-International Edition*, 38(16):2327–2343, 1999.
- [76] L. Mueller, P. Legault, and A. Pardi. Improved rna structure determination by detection of noe contacts to exchange-broadened amino protons. *Journal of the American Chemical Society*, 117(45):11043–11048, 1995.
- [77] B. Furtig, C. Richter, J. Wohnert, and H. Schwalbe. Nmr spectroscopy of rna. *Chembiochem*, 4(10):936–962, 2003.
- [78] J. R. Tolman, J. M. Flanagan, M. A. Kennedy, and J. H. Prestegard. Nuclear magnetic dipole interactions in field-oriented proteins - information for

- structure determination in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20):9279–9283, 1995.
- [79] H. M. Al-Hashimi, A. Majumdar, A. Gorin, A. Kettani, E. Skripkin, and D. J. Patel. Field- and phage-induced dipolar couplings in a homodimeric dna quadruplex, relative orientation of g center dot(c-a) triad and g-tetrad motifs and direct determination of c2 symmetry axis orientation. *Journal of the American Chemical Society*, 123(4):633–640, 2001.
- [80] N. Yathindra and M. Sundaralingam. Conformational correlation between sugar pucker and internucleotide p-o bonds in polynucleotides. *Biophysical Journal*, 15(2):A87–A87, 1975.
- [81] G. Bodenhausen and D. J. Ruben. Natural abundance n-15 nmr by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, 69(1):185–189, 1980.
- [82] S. Talluri and G. Wagner. An optimized 3d noesy-hsqc. *Journal of Magnetic Resonance Series B*, 112(2):200–205, 1996.
- [83] C. Zwahlen, P. Legault, S. J. F. Vincent, J. Greenblatt, R. Konrat, and L. E. Kay. Methods for measurement of intermolecular noes by multinuclear nmr spectroscopy: Application to a bacteriophage lambda n-peptide/boxb rna complex. *Journal of the American Chemical Society*, 119(29):6711–6721, 1997.
- [84] B. Brutscher, J. Boisbouvier, E. Kupce, C. Tisne, F. Dardel, D. Marion, and J. P. Simorre. Base-type-selective high-resolution c-13 edited noesy for sequential assignment of large rnas. *Journal of Biomolecular Nmr*, 19(2):141–151, 2001.
- [85] W. D. Hu, L. T. Kakalis, L. C. Jiang, F. Jiang, X. M. Ye, and A. Majumdar. 3d hcch-cosy-tocsy experiment for the assignment of ribose and amino acid side chains in c-13 labeled rna and protein. *Journal of Biomolecular Nmr*, 12(4):559–564, 1998.
- [86] K. Gehring and I. Ekiel. H(c)ch-cosy and (h)cch-cosy experiments for c-13-labeled proteins in h2o solution. *Journal of Magnetic Resonance*, 135(1):185–193, 1998.
- [87] R. Fiala, F. Jiang, and V. Sklenai. Sensitivity optimized hcn and hcnch experiments for c-13/n-15 labeled oligonucleotides. *Journal of Biomolecular Nmr*, 12(3):373–383, 1998.

- [88] H. Van Melckebeke, A. Pardi, J. Boisbouvier, J. P. Simorre, and B. Brutscher. Resolution-enhanced base-type-edited hcn experiment for rna. *Journal of Biomolecular Nmr*, 32(4):263–271, 2005.
- [89] B. Simon, K. Zanier, and M. Sattler. A trosy relayed hcch-cosy experiment for correlating adenine h2/h8 resonances in uniformly c-13-labeled rna molecules. *Journal of Biomolecular Nmr*, 20(2):173–176, 2001.
- [90] P. Rossi and G. S. Harbison. Calculation of c-13 chemical shifts in rna nucleosides: Structure-c-13 chemical shift relationships. *Journal of Magnetic Resonance*, 151(1):1–8, 2001.
- [91] G. Varani, F. Aboulela, and F. H. T. Allain. Nmr investigation of rna structure. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 29:51–127, 1996.
- [92] K. J. Baeyens, H. L. DeBondt, A. Pardi, and S. R. Holbrook. A curved rna helix incorporating an internal loop with g center dot a and a center dot a non-watson-crick base pairing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(23):12851–12855, 1996.
- [93] P. Legault, B. T. Farmer, L. Mueller, and A. Pardi. Through-bond correlation of adenine protons in a c-13-labeled ribozyme. *Journal of the American Chemical Society*, 116(5):2203–2204, 1994.
- [94] J. P. Marino, J. H. Prestegard, and D. M. Crothers. Correlation of adenine h2/h8 resonances in uniformly c-13 labeled rnas by 2d hcch-tocsy - a new tool for h-1 assignment. *Journal of the American Chemical Society*, 116(5):2205–2206, 1994.
- [95] R. H. Griffey and A. G. Redfield. Proton-detected heteronuclear edited and correlated nuclear-magnetic-resonance and nuclear overhauser effect in solution. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 19(1-2):51–82, 1987.
- [96] S. Grzesiek and A. BAX. Spin-locked multiple-quantum coherence for signal enhancement in heteronuclear multidimensional nmr experiments. *Journal of Biomolecular Nmr*, 6(3):335–339, 1995.
- [97] S. S. Wijmenga and B. N. M. van Buuren. The use of nmr methods for conformational studies of nucleic acids. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 32:287–387, 1998.

- [98] L. G. Scott, T. J. Tolbert, and J. R. Williamson. Preparation of specifically h-2- and c-13-labeled ribonucleotides. *Rna-Ligand Interactions Pt A*, 317:18–38, 2000.
- [99] W Saenger. *Principles of Nucleic Acids Structure*. Springer Verlag, Berlin Deutschland, 1984.
- [100] M. Ebrahimi, P. Rossi, C. Rogers, and G. S. Harbison. Dependence of c-13 nmr chemical shifts on conformations of rna nucleosides and nucleotides. *Journal of Magnetic Resonance*, 150(1):1–9, 2001.
- [101] H. Schwalbe, J. P. Marino, G. C. King, R. Wechselberger, W. Bermel, and C. Griesinger. Determination of a complete set of coupling-constants in c-13-labeled oligonucleotides. *Journal of Biomolecular Nmr*, 4(5):631–644, 1994.
- [102] D. P. Zimmer, J. P. Marino, and C. Griesinger. Determination of homo- and heteronuclear coupling constants in uniformly 13c, 15n labeled dna oligonucleotides. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 34:S177–S186, 1996.
- [103] F. A. A. M. Deleeuw and C. Altona. Conformational-analysis of beta-d-ribo-nucleosides, beta-d-deoxyribo-nucleosides, beta-d-arabino-nucleosides, beta-d-xylo-nucleosides, and beta-d-lyxo-nucleosides from proton-proton coupling-constants. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, (3):375–384, 1982.
- [104] C. Altona and Sundaral.M. Conformational-analysis of sugar ring in nucleosides and nucleotides - new description using concept of pseudorotation. *Journal of the American Chemical Society*, 94(23):8205–, 1972.
- [105] D. G. Gorenstein. Conformation and dynamics of dna and protein-dna complexes by p-31 nmr. *Chemical Reviews*, 94(5):1315–1338, 1994.
- [106] T. Carlomagno, M. Hennig, and J. R. Williamson. A novel ph-ct-cosy methodology for measuring j(ph) coupling constants in unlabeled nucleic acids. application to hiv-2 tar rna. *Journal of Biomolecular Nmr*, 22(1):65–81, 2002.
- [107] A. J. Dingley and S. Grzesiek. Direct observation of hydrogen bonds in nucleic acid base pairs by internucleotide (2)j(nn) couplings. *Journal of the American Chemical Society*, 120(33):8293–8297, 1998.

- [108] J. Wohnert, A. J. Dingley, M. Stoldt, M. Gorlach, S. Grzesiek, and L. R. Brown. Direct identification of nh center dot center dot center dot n hydrogen bonds in non-canonical base pairs of rna by nmr spectroscopy. *Nucleic Acids Research*, 27(15):3104–3110, 1999.
- [109] A. Majumdar, A. Kettani, and E. Skripkin. Observation and measurement of internucleotide (2)j(nn) coupling constants between n-15 nuclei with widely separated chemical shifts. *Journal of Biomolecular Nmr*, 14(1):67–70, 1999.
- [110] A. T. Brunger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson, and G. L. Warren. Crystallography nmr system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 54:905–921, 1998.
- [111] S. Kirkpatrick, C. D. Gelatt, and M. P. Vecchi. Optimization by simulated annealing. *Science*, 220(4598):671–680, 1983.
- [112] A. T. Brunger, P. D. Adams, and L. M. Rice. New applications of simulated annealing in x-ray crystallography and solution nmr. *Structure*, 5(3):325–336, 1997.
- [113] J. W. Miao, H. N. Chapman, J. Kirz, D. Sayre, and K. O. Hodgson. Taking x-ray diffraction to the limit: Macromolecular structures from femtosecond x-ray pulses and diffraction microscopy of cells with synchrotron radiation. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 33:157–176, 2004.
- [114] A. Ke and J. A. Doudna. Crystallization of rna and rna-protein complexes. *Methods*, 34(3):408–414, 2004.
- [115] L. J. Delucas, T. L. Bray, L. Nagy, D. McCombs, N. Chernov, D. Hamrick, L. Cosenza, A. Belgovskiy, B. Stoops, and A. Chait. Efficient protein crystallization. *Journal of Structural Biology*, 142(1):188–206, 2003.
- [116] A. R. Ferre-D’Amare, K. H. Zhou, and J. A. Doudna. Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme. *Nature*, 395(6702):567–574, 1998.
- [117] C. A. Theimer, C. A. Blois, and J. Feigon. Structure of the human telomerase rna pseudoknot reveals conserved tertiary interactions essential for function. *Molecular Cell*, 17(5):671–682, 2005.

- [118] C. W. Hilbers, P. J. A. Michiels, and H. A. Heus. New developments in structure determination of pseudoknots. *Biopolymers*, 48(2-3):137–153, 1998.
- [119] J. A. Berglund, M. Rosbash, and S. C. Schultz. Crystal structure of a model branchpoint-u2 snrna duplex containing bulged adenosines. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 7(5):682–691, 2001.
- [120] K. Valegard, J. B. Murray, P. G. Stockley, N. J. Stonehouse, and L. Liljas. Crystal-structure of an bacteriophage-rna coat protein-operator complex. *Nature*, 371(6498):623–626, 1994.
- [121] A. S. Spirin. The ribosome as an rna-based molecular machine. *RNA Biology*, 1(1):3–9, 2004.
- [122] V. A. Bloomfield, D. M. Crothers, and I. Tinoco Jr. *Nucleic Acids - Structures, Properties and Functions*. University Science Books Sausalito, California USA, 1999.
- [123] W. G. Scott, J. B. Murray, J. R. P. Arnold, B. L. Stoddard, and A. Klug. Capturing the structure of a catalytic rna intermediate: The hammerhead ribozyme. *Science*, 274(5295):2065–2069, 1996.
- [124] G. Ast. How did alternative splicing evolve? *Nature Reviews Genetics*, 5(10):773–782, 2004.
- [125] A. Fire, S. Q. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. Potent and specific genetic interference by double-stranded rna in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669):806–811, 1998.
- [126] C. J. Cheong, G. Varani, and I. Tinoco. Solution structure of an unusually stable rna hairpin, 5'ggac(uucg)gucc. *Nature*, 346(6285):680–682, 1990.
- [127] D. J. Williams, J. L. Boots, and K. B. Hall. Thermodynamics of 2'-ribose substitutions in uucg tetraloops. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 7(1):44–53, 2001.
- [128] E. A. Doherty, R. T. Batey, B. Masquida, and J. A. Doudna. A universal mode of helix packing in rna. *Nature Structural Biology*, 8(4):339–343, 2001.
- [129] P. L. Nixon, A. Rangan, Y. G. Kim, A. Rich, D. W. Hoffman, M. Hennig, and D. P. Giedroc. Solution structure of a luteoviral p1-p2 frameshifting mrna pseudoknot. *Journal of Molecular Biology*, 322(3):621–633, 2002.

- [130] A. Newman. Small nuclear rnas and pre-messenger-rna splicing. *Current Opinion in Cell Biology*, 6(3):360–367, 1994.
- [131] F. Eckstein and D. M. J. Lilley. *Catalytic RNA*. Cold Spring Harbor Monograph Series Monograph 37, 2nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York USA, 1996.
- [132] E. A. Doherty and J. A. Doudna. Ribozyme structures and mechanisms. *Annual Review of Biochemistry*, 69:597–615, 2000.
- [133] P. M. Gordon, R. Fong, S. K. Deb, N. S. Li, J. P. Schwans, J. D. Ye, and J. A. Piccirilli. New strategies for exploring rna's 2'-oh expose the importance of solvent during group ii intron catalysis. *Chemistry Biology*, 11(2):237–246, 2004.
- [134] B. W. Pontius, W. B. Lott, and P. H. vonHippel. Observations on catalysis by hammerhead ribozymes are consistent with a two-divalent-metal-ion mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(6):2290–2294, 1997.
- [135] N. Baidya and O. C. Uhlenbeck. The role of 2'-hydroxyl groups in an rna-protein interaction. *Biochemistry*, 34(38):12363–12368, 1995.
- [136] M. Hennig, J. Fohrer, and T. Carlomagno. Assignment and noe analysis of 2'-hydroxyl protons in rna: Implications for stabilization of rna a-form duplexes. *Journal of the American Chemical Society*, 127(7):2028–2029, 2005.
- [137] S. H. Wang and E. T. Kool. Origins of the large differences in stability of dna and rna helices - c-5 methyl and 2'-hydroxyl effects. *Biochemistry*, 34(12):4125–4132, 1995.
- [138] Y. P. Pan and A. D. MacKerell. Altered structural fluctuations in duplex rna versus dna: a conformational switch involving base pair opening. *Nucleic Acids Research*, 31(24):7131–7140, 2003.
- [139] P. Auffinger and E. Westhof. Rules governing the orientation of the 2'-hydroxyl group in rna. *Journal of Molecular Biology*, 274(1):54–63, 1997.
- [140] M. Egli, S. Portmann, and N. Usman. Rna hydration: A detailed look. *Biochemistry*, 35(26):8489–8494, 1996.

- [141] J. Fohrer, M. Hennig, and T. Carlomagno. Influence of the 2'-hydroxyl group conformation on the stability of a-form helices in rna. *Journal of Molecular Biology*, 356(2):280–287, 2006.
- [142] P. Acharya and J. Chattopadhyaya. The hydrogen bonding and hydration of 2' oh in adenosine and adenosine 3'-ethyl phosphate. *Journal of Organic Chemistry*, 67(6):1852–1865, 2002.
- [143] S. R. Lynch, J. G. Pelton, and I. Tinoco Jr. Nmr assignment of a 2'-hydroxyl proton from the uucg tetraloop through long-range correlations with <sup>13</sup>c. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 34(0):S11–S17, 1996.
- [144] H. O. Kalinowski, S. Berger, and S. Braun. *<sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy*. Thieme Verlag, Stuttgart Deutschland, 1984.
- [145] M. L. Munzarova and V. Sklenar. Dft analysis of nmr scalar interactions across the glycosidic bond in dna. *Journal of the American Chemical Society*, 125(12):3649–3658, 2003.
- [146] H. Q. Zhao, Q. F. Pan, W. H. Zhang, I. Carmichael, and A. S. Serianni. Dft and nmr studies of (2)j(coh) (3)j(hcoh), and (3)j(ccoh) spin-couplings in saccharides: C-o torsional bias and h-bonding in aqueous solution. *Journal of Organic Chemistry*, 72(19):7071–7082, 2007.
- [147] R. R. Fraser, M. Kaufman, P. Morand, and G. Govil. Stereochemical dependence of vicinal h-c-o-h coupling constants. *Canadian Journal of Chemistry*, 47(3):403–, 1969.
- [148] M. Kaupp, M. Bühl, and V. G. Malkin. *Calculation of NMR and EPR Parameters*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim Deutschland, 2004.
- [149] N. F. Ramsey. Electron coupled interactions between nuclear spins in molecules. *Physical Review*, 91(2):303–307, 1953.
- [150] T. Helgaker, M. Jaszunski, and K. Ruud. Ab initio methods for the calculation of nmr shielding and indirect spin-spin coupling constants. *Chemical Reviews*, 99(1):293–352, 1999.
- [151] T. Helgaker, M. Watson, and N. C. Handy. Analytical calculation of nuclear magnetic resonance indirect spin-spin coupling constants at the generalized

- gradient approximation and hybrid levels of density-functional theory. *Journal of Chemical Physics*, 113(21):9402–9409, 2000.
- [152] J. A. Pople, J. W. Mciver, and N. S. Ostlund. Self-consistent perturbation theory .i. finiteperturbation methods. *Journal of Chemical Physics*, 49(7):2960–, 1968.
- [153] J. A. Pople, J. W. Mciver, and N. S. Ostlund. Self-consistent perturbation theory .2. nuclear-spin coupling constants. *Journal of Chemical Physics*, 49(7):2965–, 1968.
- [154] O. Chaloin, J. C. Peter, J. P. Briand, B. Masquida, C. Desgranges, S. Muller, and J. Hoebeke. The n-terminus of hiv-1 tat protein is essential for tat-tar rna interaction. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(3):355–361, 2005.
- [155] S. Bannwarth and A. Gatignol. Hiv-1 tar rna: The target of molecular interactions between the virus and its host. *Current Hiv Research*, 3(1):61–71, 2005.
- [156] J. Karn, C. Dingwall, J. T. Finch, S. Heaphy, and M. J. Gait. Rna-binding by the tat and rev proteins of hiv-1. *Biochimie*, 73(1):9–16, 1991.
- [157] J. Karn. Tackling tat. *Journal of Molecular Biology*, 293(2):235–254, 1999.
- [158] G. J. Graham and J. J. Maio. Rna transcripts of the human-immunodeficiency-virus transactivation response element can inhibit action of the viral transactivator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(15):5817–5821, 1990.
- [159] W. G. Gu, W. Powell, J. Mote, and D. Reines. Nascent rna cleavage by arrested rna polymerase-ii does not require upstream translocation of the elongation complex on dna. *Journal of Biological Chemistry*, 268(34):25604–25616, 1993.
- [160] P. D. Bieniasz, T. A. Grdina, H. P. Bogerd, and B. R. Cullen. Recruitment of a protein complex containing tat and cyclin t1 to tar governs the species specificity of hiv-1 tat. *Embo Journal*, 17(23):7056–7065, 1998.
- [161] P. D. Bieniasz, T. A. Grdina, H. P. Bogerd, and B. R. Cullen. Recruitment of cyclin t1/p-tefb to an hiv type i long terminal repeat promoter proximal rna

- target is both necessary and sufficient for full activation of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(14):7791–7796, 1999.
- [162] R. Fenrick, M. H. Malim, J. Hauber, S. Y. Le, J. Maizel, and B. R. Cullen. Functional-analysis of the tat trans-activator of human immunodeficiency virus type-2. *Journal of Virology*, 63(12):5006–5012, 1989.
- [163] H. Rhim and A. P. Rice. Functional-significance of the dinucleotide bulge in stem-loop1 and stem-loop2 of hiv-2 tar rna. *Virology*, 202(1):202–211, 1994.
- [164] J. S. Tao and A. D. Frankel. Specific binding of arginine to tar rna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(7):2723–2726, 1992.
- [165] J. S. Tao and A. D. Frankel. Arginine-binding rnas resembling tar identified by in vitro selection. *Biochemistry*, 35(7):2229–2238, 1996.
- [166] M. J. Churcher, C. Lamont, F. Hamy, C. Dingwall, S. M. Green, A. D. Lowe, P. J. G. Butler, M. J. Gait, and J. Karn. High-affinity binding of tar rna by the human-immunodeficiency-virus type-1 tat protein requires base-pairs in the rna stem and amino-acid-residues flanking the basic region. *Journal of Molecular Biology*, 230(1):90–110, 1993.
- [167] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, and J. A. et al. Montgomery Jr. *Gaussian 03, Revision C.02*. Gaussian Inc. Wallingford CT, 2004.
- [168] J. Fohrer. Messung und interpretation von kopplungen an rna. *Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main*, 2004.
- [169] A. BAX, G. W. Vuister, S. Grzesiek, F. Delaglio, A. C. Wang, R. Tschudin, and G. Zhu. Measurement of homonuclear and heteronuclear j-couplings from quantitative j-correlation. *Nuclear Magnetic Resonance, Pt C*, 239:79–105, 1994.
- [170] J. F. Ying and A. Bax.  $^2$ '-hydroxyl proton positions in helical rna from simultaneously measured heteronuclear scalar couplings and noes. *Journal of the American Chemical Society*, 128(26):8372–8373, 2006.

- [171] A. D. Becke. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic-behavior. *Physical Review A*, 38(6):3098–3100, 1988.
- [172] A. D. Becke. Density-functional thermochemistry .3. the role of exact exchange. *Journal of Chemical Physics*, 98(7):5648–5652, 1993.
- [173] H. Kessler, M. Gehrke, and C. Griesinger. Two-dimensional nmr-spectroscopy - background and overview of the experiments. *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 27(4):490–536, 1988.
- [174] V. M. Sanchez-Pedregal, M. Reese, J. Meiler, M. J. J. Blommers, C. Griesinger, and T. Carlomagno. The inpharma method: Protein-mediated interligand noes for pharmacophore mapping. *Angewandte Chemie-International Edition*, 44(27):4172–4175, 2005.
- [175] M. Reese, V. M. Sanchez-Pedregal, K. Kubicek, J. Meiler, M. J. J. Blommers, C. Griesinger, and T. Carlomagno. Structural basis of the activity of the microtubule-stabilizing agent epothilone a studied by nmr spectroscopy in solution. *Angewandte Chemie-International Edition*, 46(11):1864–1868, 2007.
- [176] J. I. Gyi, A. N. Lane, G. L. Conn, and T. Brown. The orientation and dynamics of the c2 'oh and hydration of rna and dna-rna hybrids. *Nucleic Acids Research*, 26(13):3104–3110, 1998.
- [177] E. Giudice and R. Lavery. Nucleic acid base pair dynamics: The impact of sequence and structure using free-energy calculations. *Journal of the American Chemical Society*, 125(17):4998–4999, 2003.
- [178] M. Gueron and J. L. Leroy. Studies of base pair kinetics by nmr measurement of proton exchange. *Nuclear Magnetic Resonance and Nucleic Acids*, 261:383–413, 1995.
- [179] K. Snoussi and J. L. Leroy. Imino proton exchange and base-pair kinetics in rna duplexes. *Biochemistry*, 40(30):8898–8904, 2001.
- [180] J. W. Keepers and T. L. James. A theoretical-study of distance determinations from nmr - two-dimensional nuclear overhauser effect spectra. *Journal of Magnetic Resonance*, 57(3):404–426, 1984.

- [181] G. M. Clore and A. M. Gronenborn. Assessment of errors involved in the determination of interproton distance ratios and distances by means of one-dimensional and 2-dimensional noe measurements. *Journal of Magnetic Resonance*, 61(1):158–164, 1985.
- [182] S. B. Landy and B. D. N. Rao. Influence of molecular-geometry on uncertainty in distances determined from noe. *Journal of Magnetic Resonance*, 83(1):29–43, 1989.
- [183] R. Konradi, M. Billeter, and K. Wüthrich. Molmol: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics*, 14:51–55, 1996.
- [184] S. S. Sastry and B. M. Ross. Nuclease activity of t7 rna polymerase and the heterogeneity of transcription elongation complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 272(13):8644–8652, 1997.
- [185] K. Burgess and D. Cook. Syntheses of nucleoside triphosphates. *Chemical Reviews*, 100(6):2047–2059, 2000.
- [186] I. M. Lagoja and P. Herdewijn. Chemical synthesis of c-13 and n-15 labeled nucleosides. *Synthesis-Stuttgart*, (3):301–314, 2002.
- [187] T. J. Tolbert and J. R. Williamson. Preparation of specifically deuterated rna for nmr studies using a combination of chemical and enzymatic synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 118(34):7929–7940, 1996.
- [188] J. Cromsigt, J. Schleucher, T. Gustafsson, J. Kihlberg, and S. Wijmenga. Preparation of partially h-2/c-13-labelled rna for nmr studies. stereo-specific deuteration of the h5 " in nucleotides. *Nucleic Acids Research*, 30(7):1639–1645, 2002.
- [189] D. Blechschmidt. Synthese von 13c, 15n markierten dna- und rna-oligonukleotiden - ein biochemischer ansatz. *Doktorarbeit, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main*, 1999.
- [190] S. R. Price, N. Ito, C. Oubridge, J. M. Avis, and K. Nagai. Crystallization of rna-protein complexes .1. methods for the large-scale preparation of rna suitable for crystallographic studies. *Journal of Molecular Biology*, 249(2):398–408, 1995.

- [191] R. H. Symons. Self-cleavage of rna in the replication of small pathogens of plants and animals. *Trends in Biochemical Sciences*, 14(11):445–450, 1989.
- [192] O. C. Uhlenbeck. A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature*, 328(6131):596–600, 1987.
- [193] O. W. Sorensen, G. W. Eich, M. H. Levitt, G. Bodenhausen, and R. R. Ernst. Product operator-formalism for the description of nmr pulse experiments. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 16:163–192, 1983.
- [194] G. A. Morris and R. Freeman. Enhancement of nuclear magnetic-resonance signals by polarization transfer. *Journal of the American Chemical Society*, 101(3):760–762, 1979.
- [195] M. Ottiger and A. Bax. Determination of relative n-h-n n-c  $\gamma$ , c-alpha-c  $\gamma$ , and c(alpha)-h-alpha effective bond lengths in a protein by nmr in a dilute liquid crystalline phase. *Journal of the American Chemical Society*, 120(47):12334–12341, 1998.
- [196] J. M. Bohlen and G. Bodenhausen. Experimental aspects of chirp nmr-spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance Series A*, 102(3):293–301, 1993.
- [197] E. Kupce and R. Freeman. Adiabatic pulses for wide-band inversion and broadband decoupling. *Journal of Magnetic Resonance Series A*, 115(2):273–276, 1995.
- [198] S. W. Fesik, H. L. Eaton, E. T. Olejniczak, E. R. P. Zuiderweg, L. P. McIntosh, and F. W. Dahlquist. 2d and 3d nmr-spectroscopy employing c-13-c-13 magnetization transfer by isotropic mixing - spin system-identification in large proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 112(2):886–888, 1990.
- [199] A. Bax, G. M. Clore, and A. M. Gronenborn. H-1-h-1 correlation via isotropic mixing of c-13 magnetization, a new 3-dimensional approach for assigning h-1 and c-13 spectra of c-13-enriched proteins. *Journal of Magnetic Resonance*, 88(2):425–431, 1990.
- [200] L. E. Kay, M. Ikura, and A. Bax. Proton proton correlation via carbon carbon couplings - a 3-dimensional nmr approach for the assignment of aliphatic resonances in proteins labeled with c-13. *Journal of the American Chemical Society*, 112(2):888–889, 1990.

- [201] A. BAX, G. M. Clore, P. C. Driscoll, A. M. Gronenborn, M. Ikura, and L. E. Kay. Practical aspects of proton carbon carbon proton 3-dimensional correlation spectroscopy of c-13-labeled proteins. *Journal of Magnetic Resonance*, 87(3):620–627, 1990.
- [202] A. J. Shaka, C. J. Lee, and A. Pines. Iterative schemes for bilinear operators - application to spin decoupling. *Journal of Magnetic Resonance*, 77(2):274–293, 1988.
- [203] S. J. Glaser, H. Schwalbe, J. P. Marino, and C. Griesinger. Directed tocsy, a method for selection of directed correlations by optimal combinations of isotropic and longitudinal mixing. *Journal of Magnetic Resonance Series B*, 112(2):160–180, 1996.
- [204] A. J. Shaka and J. Keeler. Broadband spin decoupling in isotropic liquids. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 19:47–129, 1987.
- [205] J. H. Ippel, S. S. Wijmenga, R. de Jong, H. A. Heus, and C. W. Hilbers. Heteronuclear scalar couplings in the bases and sugar rings of nucleic acids. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 34:S156–S176, 1996.
- [206] P. Legault, F. M. Jucker, and A. Pardi. Improved measurement of c-13, p-31 j-coupling-constants in isotopically labeled rna. *Febs Letters*, 362(2):156–160, 1995.
- [207] Z. R. Wu and A. Bax. Measurement of homonuclear proton couplings based on cross-peak nulling in ct-cosy. *Journal of Magnetic Resonance*, 151(2):242–252, 2001.
- [208] H. Geen and R. Freeman. Band-selective radiofrequency pulses. *Journal of Magnetic Resonance*, 93(1):93–141, 1991.
- [209] A. Bax and D. G. Davis. Mlev-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, 65(2):355–360, 1985.
- [210] S. E. Butcher. Structure and function of the small ribozymes. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(3):315–320, 2001.

# Anhang A

## Pulsprogramme

3D  $^{13}\text{C}$ -editiertes NOESY:

```
                ;hchsqcnoesy
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p6=p5*2"
"p24=500u"

"d0=(in0-p3*1.2732-p2)/2"      ;in0 is increment/2
                               ;ph_corr = 90, -180
"d4=1.3m"                     ;1/4J for INEPT
"d14=d4-p19-50u-p24/2"
"d10=3u"
"d12=3u"
"d13=d4-p19-50u-d16"
"d15=d4-p19-50u-p24-d10-d12-d16"

"d8=150m"
"DELTA=d8-50u-p16-d16*2"

"CEN_HC1=(p24-p2)/2"
;"CEN_HN1=p5-p2-4u"

"d11=30m"

"l1=td1/2"
```

"l3=td2/2"

aqseq 312

1 ze

2 d11 do:f2 do:f3

d11

3 d11

4 d11\*2

5 d11\*3

6 d1

10u p11:f1

10u p12:f2

10u p13:f3

(p3 ph0):f2

50u UNBLKGRAD

p16:gp1

d16\*2

p1 ph0

50u

p19:gp2

d14

(CEN\_HC1 p1\*2 ph0) (p24:sp3 ph0):f2

50u

p19:gp2

d14

p1 ph12

50u p12:f2

p16:gp3

d16 p113:f3

4u cpd3:f3

(p3 ph1):f2

d0

(p2 ph0)

d0

(p3 ph0):f2

4u do:f3

50u

p16:gp4

d16

(p1 ph2):f1

46u

p19:gp5

```

    d16 pl13:f3
4u cpd3:f3
d13 ; IN13=d13/l3
(p1*2 ph0)
d12 ; IN12=IN10-IN13
(p24:sp3 ph0):f2
d10 ; IN10=1/2SWH(1H)
d15
4u do:f3
46u
p19:gp5
    d16
    (p1 ph3):f1
    DELTA
    46u
p16:gp6
    d16 pl12:f2
    d16 pl13:f3
4u BLKGRAD
(p1 ph4):f1
go=2 ph31 cpd2:f2 cpd3:f3
d11 do:f2 do:f3 wr #0 if #0 zd
    d11 ip1
lo to 3 times 2
    d11 id0
lo to 4 times 11
    d11 rd0
    d11 ip2
lo to 5 times 2
    d11 id10
    d11 id12
    d11 dd13
lo to 6 times 13
exit

ph0 = 0
ph1 = 0 2
ph2 = 0 0 2 2
ph3 = 1
ph4 = 1
ph11= 1
ph12= 1 1 1 1 3 3 3 3
ph31= 0 2 2 0 2 0 0 2

```

3D  $^{13}\text{C}$ -editiertes  $^{13}\text{C}$ -gefiltertes NOESY:

```
;jojo13ceditednoesy5.txt
;taken from vs13ceditednoesy4.txt
;adapted from vshchsqcnoesy = mirkohchsqcnoesy.txt (at the 800)
;see also vshcnoesy4.txt and vshcnoesy5.txt
```

```
;filtered NOESY to detect NOEs between  $^{13}\text{C}$ -bound protons
```

```
;Filter described in C Zwaalen, ..., L.E. Kay, JACS 1997,
; 119, 6711-6721
; Based on adiabatic pulse at a given rate plus some
; fitting of coupling and c.s.
```

```
;13C-edited 3D-hsqc-noesy -- 3D version
```

```
;Version 3 -- last revised 1.6.2004, taco
```

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

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

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

```
"p2=p1*2"
```

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

```
;"p6=p5*2"
```

```
"p24=500u"
```

```
;"d0=(in0*2-p3*4/3.1416-p2)/2" ;ph = (+180, -360)
```

```
"d0=(in0-p3*4/3.1416-p2)/2" ;ph = (+90, -180)
```

```
;delayed AQ only in 3D version
```

```
"d4=1.4m" ;1/(4*cnst2)
```

```
"d14=d4-p19-50u-p24/2"
```

```
"d22=1.7m-p25/2" ;numbers 1.7m and 1.8m taken from paper
```

```
"d23=1.8m-p26/2"
```

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

```
"d12=3u"
```

```
"d13=d4-p19-50u-d16"
```

```
"d15=d4-p19-50u-p24-d10-d12-d16"
```

```
;delayed AQ in semi-CT: equal delay on both sides\
```

```
; of p2 -- no evoln. of H c.shift. ph_corr=0,0\
```

```

"d11=30m"

"d8=150m"
"DELTA=d8-50u-p16-d16*2"

"CEN_HC1=(p24-p2)/2"
"CEN_HC2=(p25-p2)/2"
"CEN_HC3=(p26-p2)/2"

"l1=td1/2"
"l3=td2/2"
;"in13=d13/l3"
;"in12=in10-in13"
;in10=1/(2*SWH(1H))
    ;in10 is calculated in ased from the sw if ...
    ;nd10 is set to 2.

aqseq 312

1 ze
2 d11 do:f2 do:f3
    d11
3 d11
4 d11*2
5 d11*3
6 d1
    10u p11:f1
    10u p12:f2
    10u p13:f3
    (p3 ph0):f2
        50u UNBLKGRAD
        p16:gp1
        d16*2
    p1 ph0
        50u
        p19:gp2
d14 p118:f2 ;optional - to 120dB
    (CEN_HC1 p2 ph0) (p24:sp3 ph0):f2
        50u
        p19:gp2
d14 p12:f2 ;put power up after adiabatic pulse
p1 ph12

```

```

50u
p16:gp3
d16 pl13:f3
4u cpd3:f3
(p3 ph1):f2
d0
(p2 ph0)
d0
(p3 ph0):f2
4u do:f3
50u
p16:gp4
d16
(p1 ph2):f1
46u
p19:gp5
d16 pl13:f3
4u cpd3:f3
d13 pl18:f2 ;IN13=d13/13; 13 number of real points in F2
(p2 ph0)
d12 ;IN12=IN10-IN13
(p24:sp3 ph0):f2
d10 ;IN10=1/(2*SWH(1H))
d15
4u do:f3
46u
p19:gp5
d16
(p1 ph3):f1
DELTA ;mixing time
46u
p16:gp6
d16
d16 pl13:f3 ;perhaps set it to pl19 120dB
4u ;d16 is too long for changing pl13
(p1 ph4):f1

;block that filters out H bound to 13C
d22
(CEN_HC2 p2 ph0) (p25:sp5 ph0):f2
;delay required before changing pl2
d22
(p1 ph5):f1

```

```

20u p12:f2
; (p3 ph0):f2
  46u
  p16:gp7
  d16 p118:f2 ;perhaps set it to p118 120dB
  4u
(p1 ph0):f1
d23
(CEN_HC3 p2 ph0) (p26:sp6 ph0):f2
d23
(p1 ph3):f1
  46u
  p16:gp8
  d16 p112:f2
  4u BLKGRAD
(p1 ph0):f1
go=2 ph31 cpd2:f2 ;cpd3:f3 decoup 13C necessary, 15N depends on overall heat
d11 do:f2 wr #0 if #0 zd
  d11 ip1
lo to 3 times 2
  d11 id0
lo to 4 times 11
  d11 rd0
  d11 ip2
lo to 5 times 2
  d11 id10
  d11 id12
  d11 dd13
lo to 6 times 13
exit

ph0 = 0
ph1 = 0 2
ph2 = 0 0 2 2
ph3 = 1
ph4 = 1
ph5 = 0 0 0 0 2 2 2 2
ph11= 1
ph12= 1
ph31= 0 2 2 0 2 0 0 2

```

;For the 2D version, the other loop must be deleted

```
;Besides, the 13C c.s. evoln. period (d0) must deleted, too.
;The 2D version is recorded with no decoupling to better
; identify residual signals from H bound to 13C that
; are not totally refocused in the last inept-like period
; due to the fact that 1J(HC) in RNA are too different.

;TIP: always set the pl up between shaped and hard pulses.
;     W. Bermel says that it is not absolutely required in
;     the newest versions, i.e., sp_x does not overwrite pl_x

;TIP: it is also recommended to set pl down to 120dB
;     before sp, even though that value is not used by the
;     sp. But it was compulsory in former versions.

;shaped pulses on the 900MHz:
;p24@sp3 smoothed cirp size 1000, tot sweep width 53000, 500usec, 20%, -1
;p25@sp5 wurst size 1000, tot sweep width 90000, 1865usec, ad power index 20, +1
;p26@sp6 wurst size 1000, tot sweep width 90000, 2389usec, ad power index 20, +1
;p25 & p26 offset -14000Hz, power of 6000Hz := 41.7usec

;shaped pulses on the 800MHz:
;p24 smoothed cirp size 1000, tot sweep width 50000, 500usec, 20%, -1
;p25 wurst size 1000, tot sweep width 80000, 1859usec, ad power index 20, +1
;p26 wurst size 1000, tot sweep width 80000, 2358usec, ad power index 20, +1
;p25 & p26 offset -12000Hz, power of 6000Hz := 41.7usec

;shaped pulses on the 600MHz:
;p24 smoothed cirp size 1000, tot sweep width 45000, 500usec, 20%, -1
;p25 wurst size 1000, tot sweep width 60000, 1844usec, ad power index 20, +1
;p26 wurst size 1000, tot sweep width 60000, 2339usec, ad power index 20, +1
;p25 & p26 offset -9600Hz, power of 5000Hz := 50us

;decoupling in f2: garp
;decoupling in f3: adiabatic
;p5m4sp180.1 with smoothed chirp size 1000, total sweep width 10000, 2500 usec, 20%
;2500usec:=180.9usec 90degree hard power pulse

;p16 : gradient pulse, long   SINE.100 [1000u]
;p19 : gradient pulse, short  SINE.50  [300u]

;p112: f2 low power level
;p113: f3 low power level
```

```
;pl18: f2 low power level -- use it before sp
;pl19: f3 low power level -- use it before sp

;Increments in semi-CT
;in13 : d13/l3
;in10 : 1/(2*SW_h)    -- SW_h of 1H
;in12 : in10 - in13
;nd0 : 2    for 13C evoln
;nd10: 2    for 1H evoln - why is it 2 in semi-CT?
;        the value of nd10 is not relevant - the value
;        of in10 is what matters to define the actual SW

;d4 : 1/(4*cnst2)
;cnst2: 1J(HX)
;d8 : mixing time, ms

;l3 : td1/2 in the 2D version

;p16=1000usec
;p19=300usec

;Gradient strength
;gpz1: 15%    SINE.100
;gpz2: 10%    SINE.50
;gpz3: 30%    SINE.100
;gpz4: 40%    SINE.100
;gpz5: 10%    SINE.50
;gpz6: 35%    SINE.100
;gpz7: 50%    SINE.100
;gpz8: 30%    SINE.100

;o1p: on water
;o2p: 114p, centre of the OBSERVABLE 13C range in RNA
;   13C: observe 60-160 ppm -- decouple 60-220 ppm
;o3p: 165p, centre of the 15N range - decouple

3D 13C-editedes 12C-gefiltertes NOESY:

;taken from vs13ceditednoesy4.txt
;adapted from vshchsqcnoesy = mirkohchsqcnoesy.txt (at the 800)
;see also vshcnoesy4.txt and vshcnoesy5.txt

;filtered NOESY to detect NOEs between 13C/12C-bound protons
```

```
;Filter described in C Zwahlen, ..., L.E. Kay, JACS 1997,
; 119, 6711-6721
; Based on adiabatic pulse at a given rate plus some
; fitting of coupling and c.s.

;13C-edited 3D-hsqc-noesy -- 3D version

;Version 3 -- last revised 1.6.2004, taco

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

"p2=p1*2"
;"p4=p3*2"
;"p6=p5*2"

"p24=500u"

"d0=(in0*2-p3*4/3.1416-p2)/2" ;ph = (+180, -360)
;"d0=(in0-p3*4/3.1416-p2)/2" ;ph = (+90, -180)
;delayed AQ only in 3D version

"d4=1.4m" ;1/(4*cnst2)
"d14=d4-p19-50u-p24/2"
"d22=1.7m-p25/2" ;numbers 1.7m and 1.8m taken from paper
"d23=1.8m-p26/2"
"d10=3u"
"d12=3u"
"d13=d4-p19-50u-d16"
"d15=d4-p19-50u-p24-d10-d12-d16"

;delayed AQ in semi-CT: equal delay on both sides
; of p2 -- no evoln. of H c.shift. ph_corr=0,0

"d11=30m"

"d8=150m"
"DELTA=d8-50u-p16-d16*2"

"CEN_HC1=(p24-p2)/2"
```

```
"CEN_HC2=(p25-p2)/2"
```

```
"CEN_HC3=(p26-p2)/2"
```

```
"l1=td1/2"
```

```
"l3=td2/2"
```

```
"in13=d13/l3"
```

```
"in12=in10-in13"
```

```
;in10=1/(2*SWH(1H))
```

```
    ;in10 is calculated in ased from the sw if ...
```

```
    ;nd10 is set to 2.
```

```
aqseq 312
```

```
1 ze
```

```
2 d11 do:f2 do:f3
```

```
    d11
```

```
3 d11
```

```
4 d11*2
```

```
5 d11*3
```

```
6 d1
```

```
    10u p11:f1
```

```
    10u p12:f2
```

```
    10u p13:f3
```

```
    (p3 ph0):f2
```

```
        50u UNBLKGRAD
```

```
        p16:gp1
```

```
        d16*2
```

```
p1 ph0
```

```
    50u
```

```
    p19:gp2
```

```
d14 p118:f2 ;optional - to 120dB
```

```
    (CEN_HC1 p2 ph0) (p24:sp3 ph0):f2
```

```
    50u
```

```
    p19:gp2
```

```
d14 p12:f2 ;put power up after adiabatic pulse
```

```
p1 ph12
```

```
    50u
```

```
    p16:gp3
```

```
    d16 p113:f3
```

```
4u cpd3:f3
```

```
(p3 ph1):f2
```

```
d0
```

```
(p2 ph0)
```

```

d0
(p3 ph0):f2
4u do:f3
  50u
  p16:gp4
  d16
(p1 ph2):f1
  46u
  p19:gp5
  d16 pl13:f3
4u cpd3:f3
d13 pl18:f2      ;IN13=d13/13; 13 number of real points in F2
(p2 ph0)
d12              ;IN12=IN10-IN13
(p24:sp3 ph0):f2
d10              ;IN10=1/(2*SWH(1H))
d15
4u do:f3
  46u
  p19:gp5
  d16
(p1 ph3):f1
DELTA            ;mixing time
  46u
  p16:gp6
  d16
d16 pl13:f3      ;perhaps set it to pl19 120dB
4u              ;d16 is too long for changing pl13
(p1 ph4):f1

;block that filters out H bound to 13C
d22
(CEN_HC2 p2 ph0) (p25:sp5 ph0):f2
                ;delay required before changing pl2
d22
(p1 ph5):f1
20u pl2:f2
(p3 ph0):f2
  46u
  p16:gp7
  d16 pl18:f2    ;perhaps set it to pl18 120dB
  4u
(p1 ph0):f1

```

```

d23
(CEN_HC3 p2 ph0) (p26:sp6 ph0):f2
d23
(p1 ph0):f1
46u
  p16:gp8
  d16 p112:f2
  4u BLKGRAD
  (p1 ph0):f1
go=2 ph31 ;cpd2:f2 cpd3:f3
d11 do:f2 do:f3 wr #0 if #0 zd
  d11 ip1
lo to 3 times 2
  d11 id0
lo to 4 times l1
  d11 rd0
  d11 ip2
lo to 5 times 2
  d11 id10
  d11 id12
  d11 dd13
lo to 6 times l3
exit

```

```

ph0 = 0
ph1 = 0 2
ph2 = 0 0 2 2
ph3 = 1
ph4 = 1
ph5 = 1 1 1 1 3 3 3 3
ph11= 1
ph12= 1
ph31= 0 2 2 0 2 0 0 2

```

```

;For the 2D version, the other loop must be deleted
;Besides, the 13C c.s. evoln. period (d0) must deleted, too.
;The 2D version is recorded with no decoupling to better
; identify residual signals from H bound to 13C that
; are not totally refocused in the last inept-like period
; due to the fact that 1J(HC) in RNA are too different.

```

```

;TIP: always set the p1 up between shaped and hard pulses.

```

```

;      W. Bermel says that it is not absolutely required in
;      the newest versions, i.e., sp_x does not overwrite pl_x

;TIP: it is also recommended to set pl down to 120dB
;      before sp, even though that value is not used by the
;      sp. But it was compulsory in former versions.

;constant-time on 13C - mirror image lin pred
;semi-constant-time on 1H - forward lin pred

;shaped pulses on the 800MHz:
;p24 smoothed cirp size 1000, tot sweep width 50000, 500usec, 20%, -1
;p25 wurst size 1000, tot sweep width 80000, 1859usec, ad power index 20, +1
;p26 wurst size 1000, tot sweep width 80000, 2358usec, ad power index 20, +1
;p25 & p26 offset -12000Hz, power of 6000Hz := 41,7usec

;shaped pulses on the 600MHz:
;p24 smoothed cirp size 1000, tot sweep width 45000, 500usec, 20%, -1
;p25 wurst size 1000, tot sweep width 60000, 1844usec, ad power index 20, +1
;p26 wurst size 1000, tot sweep width 60000, 2339usec, ad power index 20, +1
;p25 & p26 offset -9600Hz

;p16 : gradient pulse, long  SINE.100  [1000u]
;p19 : gradient pulse, short SINE.50   [300u]

;p112: f2 low power level
;p113: f3 low power level
;p118: f2 low power level -- use it before sp
;p119: f3 low power level -- use it before sp

;Increments in semi-CT
;in13 : d13/13
;in10 : 1/(2*SW_h)  -- SW_h of 1H
;in12 : in10 - in13
;nd0 : 2  for 13C evoln
;nd10: 2  for 1H evoln - why is it 2 in semi-CT?
;      the value of nd10 is not relevant - the value
;      of in10 is what matters to define the actual SW

;d4 : 1/(4*cnst2)
;cnst2: 1J(HX)
;d8 : mixing time, ms

```

```
;l3 : td1/2 in the 2D version

;Gradient strength
;gpz1: 15%
;gpz2: 10%
;gpz3: 30%
;gpz4: 40%
;gpz5: 10%
;gpz6: 35%
;gpz7: 50%

;o2p: 114p, centre of the OBSERVABLE 13C range in RNA
; 13C: observe 60-160 ppm -- decouple 60-220 ppm
;o3p: 165p, centre of the 15N range - decouple
```

### 3D HCCH-COSY TOCSY:

```
;hcchcosytocsy for nucleic acids
;avance-version (00/12/08)
;HCCH-COSY-TOCSY
;3D sequence with
; inverse correlation using multiple inept transfer and
; C-C DIPSI3 spinlock
;
; F1(H,t1) -> F2(C,t2) -> F2(C') -> F1(H',t3)
;

;phase sensitive (t1)
;phase sensitive (t2)
;
;Hu et al JBNMR 12, 559 (1998)
;This pulse sequence is almost the same as in the paper.
;Differences:
; 1.-DELTA6 and DELTA7 are a bit different from tau-c and tau-d.
; I shortened DELTA6 as a compromise for CH and CH2 [*0.6]
; 2.-Use 15N instead of 31P. We only can decouple N or P,
; but not both at the same time (due to the channels).

;Examples: TARsmp19.3 on nmr700
; TAR17jn04.2 on nmr700

;*****
;ATTENTION!!!!
```

```

;This program is an example of bad practice.
; The definition of increments and delays is confusing:
;     d0, d20, d10 are a semi-CT on 1H
;     d23, d25 are the CT on 13C
;SOLUTION to the big mess:
; Do not believe the increments and SW in the EDA window.
; What dominate are the values of the increments as
;     defined in the ASED window and in the loops of the
;     program. The corresponding SW are 1/(2*in) when
;     st-ttpi mode is used.
; When processing in Felix, input the correct SW_hz
;     calculated by hand instead of believing what Felix
;     gets automatically from xwinnmr.
;*****
;1sw=0.5*in10
;2sw=0.5*in23

```

```

prosol relations=<triple>

```

```

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

```

```

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

```

```

"DELTA1=1.5m"      ;1/[1J(CH)] 160 Hz
"DELTA2=1.0m"      ;0.67 DELTA1, compromise for CH & CH2

```

```

"d0=3u"
"d20=3u"

```

```

"d10=DELTA1 + 6u + p4"
"d11=30m"
"d12=20u"

```

```

"d23=3u"

```

```

"d25=3.2m"

"p20=1m"    ;trim pulse
"p28=500u"  ;trim pulse
            ;Although a trim pulse can be up to 2ms
            ; I prefer to use less length to be in the
            ; safe side.

"p16=500u"  ;grad
"p29=300u"  ;grad
"p30=2m"    ;grad
"p31=1.25m" ;grad

"DELTA4=3.2m-p16-50u" ;refocus J(CC)
                ;2*DELTA4 is duration of COSY (?) -see paper
"DELTA3=DELTA4-DELTA2-d16+50u"
"DELTA5=3.2m-p22-3u" ;CT is 2*DELTA5 = 3.2ms =
                    ; =0.58/[1J(CC)] 45 Hz
                    ;Though 1/(2*J)=11ms, we evolve
                    ;for ca. 6ms as a compromise for C-C and
                    ;C-C-C carbon atoms in the ribose

"DELTA6=1.0m-p29-d16-50u"
"DELTA7=1.6m-p29-50u-d16"
"DELTA8=DELTA7-p1"

"CEN_HN2=(p22-p2)/2"
"CEN_HC2=(p4-p2)/2"

aqseq 312

1 d11 ze
  d11 p112:f2
2 d11 do:f2
3 d1 do:f2
  50u UNBLKGRAD
  d12 p11:f1
  d12 p12:f2
  d12 p13:f3

; (p3 ph0):f2

```

```

; 50u
; p16:gp1
; d16
; (p3 ph2):f2
; 50u
; p16:gp1
; d16
(p1 ph1)

```

DELTA1

```

d0
(p4 ph0):f2
d20
(p2 ph0)
d10
(p1 ph2)
  50u
  p16:gp2
  d16

```

```

(p3 ph3):f2

```

DELTA2

```

(p2 ph0)

```

DELTA3

```

  p16:gp3
  d16
(p4 ph0):f2
  50u
  p16:gp3

```

DELTA4

```

(p3 ph4):f2

```

d23

```

(p22 ph0):f3 (CEN_HN2 p2 ph0)

```

DELTA5

```

(p4 ph0):f2
d25

```

```

(p3 ph5):f2

```

```

  50u
  p30:gp4
  d16

```

```
(p1 ph0)
  50u
  p31:gp4
  d16
(p3 ph6):f2

d12 p115:f2

(p20 ph0):f2      ;this p20 trim pulse is part of the spin-lock
                  ;begin DIPSI3
9 (p9*2.722 ph7):f2
  (p9*4.389 ph9):f2
  (p9*2.778 ph7):f2
  (p9*3.056 ph9):f2
  (p9*0.333 ph7):f2
  (p9*2.556 ph9):f2
  (p9*4.000 ph7):f2
  (p9*2.722 ph9):f2
  (p9*4.111 ph7):f2
  (p9*3.778 ph9):f2
  (p9*3.889 ph7):f2
  (p9*2.889 ph9):f2
  (p9*3.000 ph7):f2
  (p9*0.333 ph9):f2
  (p9*2.500 ph7):f2
  (p9*4.050 ph9):f2
  (p9*2.830 ph7):f2
  (p9*4.389 ph9):f2
  (p9*2.722 ph9):f2
  (p9*4.389 ph7):f2
  (p9*2.778 ph9):f2
  (p9*3.056 ph7):f2
  (p9*0.333 ph9):f2
  (p9*2.556 ph7):f2
  (p9*4.000 ph9):f2
  (p9*2.722 ph7):f2
  (p9*4.111 ph9):f2
  (p9*3.778 ph7):f2
  (p9*3.889 ph9):f2
  (p9*2.889 ph7):f2
  (p9*3.000 ph9):f2
  (p9*0.333 ph7):f2
  (p9*2.500 ph9):f2
```

(p9\*4.050 ph7):f2  
(p9\*2.830 ph9):f2  
(p9\*4.389 ph7):f2  
(p9\*2.722 ph9):f2  
(p9\*4.389 ph7):f2  
(p9\*2.778 ph9):f2  
(p9\*3.056 ph7):f2  
(p9\*0.333 ph9):f2  
(p9\*2.556 ph7):f2  
(p9\*4.000 ph9):f2  
(p9\*2.722 ph7):f2  
(p9\*4.111 ph9):f2  
(p9\*3.778 ph7):f2  
(p9\*3.889 ph9):f2  
(p9\*2.889 ph7):f2  
(p9\*3.000 ph9):f2  
(p9\*0.333 ph7):f2  
(p9\*2.500 ph9):f2  
(p9\*4.050 ph7):f2  
(p9\*2.830 ph9):f2  
(p9\*4.389 ph7):f2  
(p9\*2.722 ph7):f2  
(p9\*4.389 ph9):f2  
(p9\*2.778 ph7):f2  
(p9\*3.056 ph9):f2  
(p9\*0.333 ph7):f2  
(p9\*2.556 ph9):f2  
(p9\*4.000 ph7):f2  
(p9\*2.722 ph9):f2  
(p9\*4.111 ph7):f2  
(p9\*3.778 ph9):f2  
(p9\*3.889 ph7):f2  
(p9\*2.889 ph9):f2  
(p9\*3.000 ph7):f2  
(p9\*0.333 ph9):f2  
(p9\*2.500 ph7):f2  
(p9\*4.050 ph9):f2  
(p9\*2.830 ph7):f2  
(p9\*4.389 ph9):f2  
lo to 9 times l1

(p20 ph0):f2 ;this p20 trim pulse is part of the spin-lock  
; ;end DIPSI3

d12 p12:f2

(p3 ph8):f2

(p28 ph0)

(p28\*2 ph2)

50u

p30:gp4

d16

(p1 ph0)

50u

p31:gp4

d16

(p3 ph5):f2

50u

p29:gp5

d16

DELTA6

(CEN\_HC2 p2 ph0) (p4 ph0):f2

50u

p29:gp5

d16

DELTA6

(p3 ph0):f2

50u

p16:gp6

d16

(p1 ph0)

50u

p29:gp7

d16

DELTA7

(CEN\_HC2 p2 ph0) (p4 ph0):f2

50u

p29:gp7

d16 p112:f2

DELTA8 BLKGRAD

(p1 ph10)

```

go=2 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 mc #0 to 2
    F1PH(ip1, id0 & id20 & dd10)
    F2PH(rd0 & rd20 & rd10 & ip3 & ip4,id23 & dd25)
exit

ph0=0
ph2=1
ph1=0 2
ph3=0 0 2 2
ph4=0
ph5=3
ph6=1
ph7=1
ph9=3
ph8=1
ph10=2
ph31=0 2 2 0

;p10 : 120dB
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p115: f2 channel - power level for TOCSY-spinlock

;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p9 : f2 channel - 90 degree low power pulse - TOCSY
;    TOCSY of 7.4 kHz at 700 MHz    [32-35u]

;p16: homospoil/gradient pulse           [500 usec]
;p19: gradient pulse 2                   [2 msec]
;p20: f2 channel - trim pulse            [2 msec]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p28: f1 channel - trim pulse            [1 msec]
;p29: gradient pulse 3                   [300 usec]

```

```

;p30: gradient pulse 4 [5 msec]
;p31: gradient pulse 5 [4.4 msec]
;d0 : incremented delay (F1 in 3D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1 [1.8 sec]
;d10: incremented delay (F2 in 3D) [3 usec]
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d21: 1/(6J'(CH)) - tau c [1.1 msec]
;d23: tau b [475 usec]
;l1: loop for DIPSI cycle:
; mixing time = ((p9*54.33*4) * l1) + (p20) [12 msec]
;in0: 1/(2 * SW(H)) = DW(H)
;nd0: 2
;in10: 1/(2 * SW(C)) = DW(C)
;nd10: 2
;NS: 16 * n
;DS: 256, set a high value due to DIPSI

;td1: number of experiments in F1
;td2: number of experiments in F2
;FnMODE: States-TPPI (or TPPI) in F1
;FnMODE: States-TPPI (or TPPI) in F2
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2 [GARP]
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;1J(CH): 160 Hz in ribose
;1J(CC): 45 Hz in ribose
;The compromise for CX and CX2 is ca. 0.67*... [0.5-0.6]

;DELTA2: refocus HC ... 1/(8*J)
;DELTA3: refocus CC
;DELTA4*2: time for CC refocus [3.2ms]

;for z-only gradients:
;gpz1: 20%
;gpz2: 50%
;gpz3: 10%
;gpz4: 30%
;gpz5: 25%
;gpz6: 60%
;gpz7: 18%

```

```
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100
;gpnam4: SINE.100
;gpnam5: SINE.50
;gpnam6: SINE.100
;gpnam7: SINE.50

;st-TPPI on both
;TD: 1k - 64 - 128
;SW: 6 - 28 - 4 ?
;in?: dominates sw -- 13c in23=100u -- 1h in0=180u
;o?p : 4.7 - 79.0 - 158.0 ppm
```

#### HCCH-COSY:

```
;hcchcosySE2d for nucleic acids

;avance-version (00/12/08)
;(H)CCH-COSY-SE, 2D version for C5-C6 of C and U in RNA.

;2D version of 3D sequence with
;  inverse correlation using multiple inept transfer and
;
;      F1(C,t1) -> F2(C',t2) -> F2(C') -> F1(H',t3)
;

;phase sensitive (t1)
;phase sensitive (t2)
;
;K. Gehring et al JMR 135, 185 (1998)

;In the 2D version, only the first CT is evolved. In the
; States-TPPI manner.
;The second CT is not t2 evolved, so the echo-antiecho is not
; feasible and the Sensitivity Enhancement either, in contrast
; with the 3D version.

;Check delays for delayed acquisition and ph-corr=0,0

;When refocusing heteronuclear J coupling, correct 1/4J with a
; 0.62 factor as a compromise for nuclei bound either to one
```

```
; or to two neighbours (3D version).
;In the 2D version for the C5-C6 of RNA C and U (HCC'H'), use
; instead 1/8J in order to have magnetization both in C and C'
; (incomplete transfer). Notice that, besides, some M will go
; to C4 and will be lost there. It is not possible to use shaped
; pulses for selective refocusing of C5-C4 coupling due to the
; fact that the bands of C4 and C6 are too close.
```

```
prosol relations=<triple>
```

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

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

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

```
"d4=1/(4*cnst2)"
```

```
    ;1J(XH) pyrimidine = 175-185Hz =180Hz
```

```
    ;1J(XH)    ribose = 145-170Hz =160Hz
```

```
"DELTA1=d4-50u-p16-d16"           ;paper says grad not possible
```

```
"d5=0.5* 1/(4*cnst3)" ;CT/2
```

```
    ;1J(CC) pyrimidine = 67Hz
```

```
    ;1J(CC)    ribose = 40Hz
```

```
    ;Atten. by 0.5 to keep M both in C and C',
```

```
    ;i.e., incomplete transfer from C to C'.
```

```
"DELTA3=2*d4"
```

```
    ;Total evoln. of 1J(CH) during the CT -- refocus.
```

```
    ;*0.62: compromise for refocusing 1J(CH) of CH and CH2
```

```
    ;in the paper (for protein). In RNA bases, full evoln.
```

```
    ;is possible.
```

```
"DELTA4=d5-d4"
```

```
    ;the paper calls it DELTA
```

```
    ;"DELTA4=d5-d4-p29-d16" --corrected for grad
```

```
    ;"DELTA4=d5-0.62*d4-p29-d16" if also CH2 to refocus.
```

```

"DELTA5=d4-d0-p22"
    ;this is CT/2-DELTA4=0.5*DELTA3
    ;"DELTA5=0.62*d4" if also CH2 to refocus.

"d10=d5+p2"
    ;p2 added for good phase
    ;p29 shorter than p16 to allow longer evolution
    ;"d10=d5-50u-p29-d16+p2" with grad

"d20=3u"
"d30=d5+p2"    ;identical to d10

"DELTA7=d4-50u-p16-d16-4u"
    ;refocus 1J(CH)
    ;1.1ms in the paper vs 1.7m DELTA1.
    ;"DELTA7=0.65*d4-50u-p16-d16" if also CH2 to refocus.

"DELTA8=50u+p16+d16"    ;compensation of last grad

"d11=30m"
"d12=20u"

"CEN_HN2=(p22-p2)/2"
"CEN_HC2=(p4-p2)/2"
"CEN_HC1=(p3-p1)/2"

;aqseq 312

1 d11 ze
  d11 p112:f2
2 d11 do:f2
3 d1 do:f2
  50u UNBLKGRAD
  d12 p11:f1
  d12 p12:f2
  d12 p13:f3

;purging of C natural magnetization

```

```
(p3 ph0):f2
  50u
  p16:gp1
  d16
```

```
;INEPT - paper says grad not possible
```

```
(p1 ph1)
DELTA1
  50u
  p16:gp12
  d16
(CEN_HC2 p2 ph2) (p4 ph1):f2
  50u
  p16:gp12
  d16
DELTA1
(p1 ph2)
  50u
  p16:gp2
  d16
(p3 ph3):f2      ;increment for St-TPPI
```

```
;CT evolution t1: transfer via 1J(CC)
;As J=ca 67 Hz, the CT should be 1/2J=7.4m.
;But it's shortened to 1/2 in order to have M both in C and C'.
;This makes the CT too short, so that gradients can not be used.
; This happens also in the paper. Instead, the pi pulse on C
; is exorcycled -that happens to be more efficient
```

```
d0
(p22 ph1):f3
DELTA5
(p2 ph2)
DELTA4
  ;p29:gp3
  ;d16
(p4 ph4):f2
  ;50u
  ;p29:gp3
  ;d16
```

```
d10
(p3 ph5):f2
```

```
;purging pulses for residual antiphase H-C terms
```

```
(p1 ph6)
(p1 ph1)
```

```
;second CT evolution - disabled in the 2D version
```

```
d20
(p22 ph1):f3
DELTA5
(p2 ph2)
DELTA4
    ;p29:gp5
    ;d16
(p4 ph8):f2
    ;50u
    ;p29:gp6 --here the 3D has EA concerted with ph7
    ;d16
d30
(CEN_HC1 p1 ph1) (p3 ph1):f2
    ;spoil grad not usable here with Echo-Antiecho.
    ;taco recommends here simultaneous 90deg pulses.
```

```
;Sensitivity enhancement disabled in the 2D version
```

```
;Refocus antiphase M as in a usual HSQC
```

```
DELTA7
    4u
    50u
    p16:gp7
    d16
(CEN_HC2 p2 ph1) (p4 ph1):f2
    50u
    p16:gp7
    d16
DELTA7 p112:f2
```

```

4u BLKGRAD

go=2 ph31 cpd2:f2
  d11 do:f2 mc #0 to 2
  F1PH(ip3, id0 & dd10)
exit

;Phase cycle of the 2D version.
;gp3 and gp4 disabled and pi pulse exorcycled

ph0= 0
ph1= 0
ph2= 1
ph3= 0
ph4= 0 1 2 3 0 1 2 3
ph8= 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2
      3 3 3 3 3 3 3 3 0 0 0 0 0 0 0 0
ph5= 0 2 2 0 2 0 0 2
ph6= 0 0 2 2 0 0 2 2 2 2 0 0 2 2 0 0
      ;ph6 does not contribute to the detectable signal (?)
ph31=0 2 0 2 0 2 0 2 2 0 2 0 2 0 2 0

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p1  : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2  : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3  : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4  : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p21 : f3 channel - 90 degree low power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse [500 usec]
;p19: gradient pulse 2 [2 msec]
;p29: gradient pulse 3 [300 usec]
;p30: gradient pulse 4 [5 msec]
;p31: gradient pulse 5 [4.4 msec]
;d0  : incremented delay (F1 in 3D) [3 usec]
;d1  : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4  : 1/(4J(CH)) - tau a [1.6 msec]
;d10: decremented delay (F1 in 3D) [3 usec]

```

```
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;in0:  $1/(2 * SW(H)) = DW(H)$ 
;nd0: 2
;in10: in0
;nd10: 2
;NS: 16 * n
;DS: 32
;td1: number of experiments in F1
;td2: number of experiments in F2
;FnMODE: States-TPPI (or TPPI) in F1
;FnMODE: States-TPPI (or TPPI) in F2 ---- echo antiecho??
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;cnst2: 1J(CH)=180Hz in C and U -RNA
;cnst3: 1J(CC)=67Hz for C5-C6 in RNA

;constant-time on 13C

;for z-only gradients (values from paper in brackets):
;gpz1: 20% (y) It should be z!
;gpz2: 38% (y) It should be z!
;gpz3: 23.5% (x)
;gpz7: 25% (y)
;gpz12: 15% (z)
;notice the 4:1 ratio of gp6 and gp11 for echo-antiecho
;p16=500usec

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.50
;gpnam2: SINE.50
;gpnam7: SINE.50
;gpnam12: SINE.50

HCN(Ribose):

;johcnsug.txt
;avance-version (00/10/16)
;HCN on ribose
;3D inverse correlation for triple resonance using multiple
; inept transfer steps
```

```
;
; F1(N,t1) -> F2(C1',t2) -> F3(H1')
;
;phase sensitive
;with decoupling during acquisition
;
;R. Fiala, F. Jiang, V. Sklenar
; J. Biomol. NMR 12, 373 - 383 (1998)
```

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

```
aqseq 312
```

```
"p2=p1*2"
```

```
"p4=p3*2"
```

```
"p22=p21*2"
```

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

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

```
"d13=p3"
```

```
"d4=1.50m"
```

```
"d23=30m"
```

```
"d26=p12/2-p3"
```

```
"DELTA=d23/4-d16-p16-p11/2"
```

```
"d22=DELTA"
```

```
"d25=DELTA"
```

```
"d15=d0*2+p14"
```

```
"DELTA1=d4-p16-d16-4u"
```

"CEN\_CN1=(p12-p13)/2"

"CEN\_HC1=(p4-p2)/2"

"CEN\_HC2=(p14-p2)/2"

1 ze

d11 p112:f2 p116:f3

2 d11 do:f2 do:f3

3 d1 p13:f3 p12:f2 p11:f1

(p1 ph1)

d13

d4

(CEN\_HC1 p2 ph1):f1 (p4 ph1):f2

d4 UNBLKGRAD

(p3 ph2):f2

d26

DELTA p120:f1

p16:gp1

d16 p121:f2 p122:f3

(p11:sp1 ph11):f1

d16

p16:gp1

DELTA

(p12:sp2 ph1):f2 (CEN\_CN1 p13:sp3 ph1):f3

DELTA

p16:gp1

d16 p12:f2

d13

(p11:sp1 ph11):f1

d16 p13:f3

p16:gp1

DELTA p11:f1

d26

(p3 ph3):f2

(p1 ph4):f1

20u

p16:gp2

d16

(p21 ph5):f3

d0

(CEN\_HC2 p2 ph1):f1 (p14:sp4 ph1):f2  
 d0  
 (p22 ph1):f3  
 d15  
 (p21 ph6):f3  
 20u  
 p16:gp3  
 d16 pl2:f2  
  
 (p1 ph7):f1  
 (p3 ph8):f2  
  
 d26  
 d22 pl20:f1  
 p16:gp4  
 d16 pl21:f2 pl22:f3  
 (p11:sp1 ph11):f1  
 d16  
 p16:gp4  
 d22  
 (p12:sp2 ph1):f2 (CEN\_CN1 p13:sp3 ph1):f3  
 d25  
 p16:gp4  
 d16 pl2:f2  
 (p11:sp1 ph11):f1  
 d16 pl3:f3  
 p16:gp4  
 d25 pl1:f1  
 d26  
  
 (p3 ph9):f2  
 4u  
 DELTA1  
 p16:gp5  
 d16  
 (CEN\_HC1 p2 ph1):f1 (p4 ph1):f2  
 d16  
 p16:gp5  
 DELTA1 pl12:f2 pl16:f3  
 4u BLKGRAD  
 go=2 ph31 cpd2:f2 ;cpd3:f3  
 d11 do:f2 do:f3 mc #0 to 2  
 F1PH(ip5,id0)

```

        F2PH(rd0 & ip8, id22 & dd25)
exit

ph1=0
ph2=0 2
ph3=1
ph4=1
ph5=0 0 2 2
ph6=0
ph7=1
ph8=1
ph9=0 0 0 0 2 2 2 2
ph11=0
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2

;p10 : 120db
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p116: f3 channel - power level for CPD/BB decoupling
;sp0 : f2 channel - shaped pulse 180 degree (modulated)
;sp3 : f2 channel - shaped pulse 180 degree (C6/C8 on resonance)
;sp5 : f2 channel - shaped pulse 180 degree (C1' off resonance)
;sp9 : f3 channel - shaped pulse 180 degree
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse
;p16: homospoil/gradient pulse [1 ms]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p28: f1 channel - trim pulse [1 ms]
;p30: f3 channel - 180 degree shaped pulse for inversion
;d0 : incremented delay (2D) [3 us]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J(HC) (C1')) [1.6 ms]
;d11: delay for disk I/O [30 ms]
;d13: short delay [4 us]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery

```

```

;d19: delay for binomial water suppression
;   d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;d22: 1/(4J(CN))
;   C1': [18 ms]
;d23: 1/(4J(CN))
;   C1' and C6/C8: [17 ms]
;d25: 1/(4J(CN))
;   C6/C8: [16 ms]
;d27: 1/(4J(HC)) (C6/C8)
;   for H6/H8: [1.25 ms]
;in0: 1/(2 * SW(H)) = DW(H)
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: >= 32
;td1: number of experiments in F1
;FnMODE: States-TPPI (or TPPI)
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;cpd3: decoupling according to sequence defined by cpdprg3
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;use gradient ratio:
;   gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4 : gp 5 : gp 6 : gp 7
;   -40 : 25 : -45 : -60 : 40 : 55 : 10

;for z-only gradients:
;gpz1: -40%
;gpz2: 25%
;gpz3: -45%
;gpz4: -60%
;gpz5: 40%
;gpz6: 55%
;gpz7: 10%

;use gradient files:
;gpname1: SINE.100
;gpname2: SINE.100
;gpname3: SINE.100
;gpname4: SINE.100
;gpname5: SINE.100
;gpname6: SINE.100
;gpname7: SINE.100

```

```

;calculate pulselength according to:
;
; (DeltaOmega * DeltaT) / (width of region[ppm] * SFOn{MHz})
;
;for p14 use q3 pulse (DeltaOmega * DeltaT = 3.448)
; to cover 17.13ppm
; (pulselength: 2ms at 400.13 MHz)
; sp3: C6/C8 on res.
; sp5: C1' off res.
; sp0: twofold modulated pulse at 90ppm (C1' off res.)
; and 137ppm (C6/C8 on res.)
;for p30 use iburp2 pulse (DeltaOmega * DeltaT = 4.53)
; to cover 55.86ppm (N1/N9)
; (pulselength: 2ms at 400.13 MHz)

```

HCN(Base):

```

;hcn
;avance-version (00/10/16)
;HCN
;2D inverse correlation for triple resonance using multiple
; inept transfer steps
;
; F1(N,t1) -> F2(C1',t2) -> F3(H1')
;
;phase sensitive
;with decoupling during acquisition
;
;R. Fiala, F. Jiang, V. Sklenar
; J. Biomol. NMR 12, 373 - 383 (1998)

# 1 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/Avance.incl" 1
;$Id: Avance2.incl,v 1.5 2000/08/16 13:26:55 ber Exp $
# 15 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/tchcnbasetr.txt" 2
# 1 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/Grad.incl" 1
;Grad2.incl - include file for Gradient Spectroscopy
; for 1

define list<gradient> EA=<EA>

;$Id: Grad2.incl,v 1.6 2000/10/16 11:47:20 ber Exp $
# 16 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/tchcnbasetr.txt" 2

```

```
# 1 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/Delay.incl" 1
;Delay.incl - include file for commonly used delays
;
;version 00/02/07

;general delays

define delay DELTA
define delay DELTA1
define delay DELTA2
define delay DELTA3
define delay DELTA4
define delay DELTA5
define delay DELTA6
define delay DELTA7
define delay DELTA8

define delay TAU
define delay TAU1
define delay TAU2
define delay TAU3
define delay TAU4
define delay TAU5

;delays for centering pulses

define delay CEN_HN1
define delay CEN_HN2
define delay CEN_HN3
define delay CEN_HC1
define delay CEN_HC2
define delay CEN_HC3
define delay CEN_HC4
define delay CEN_HP1
define delay CEN_HP2
define delay CEN_CN1
define delay CEN_CN2
define delay CEN_CN3
define delay CEN_CN4
define delay CEN_CP1
define delay CEN_CP2
```

```
;loop counters
```

```
define loopcounter COUNTER
define loopcounter SCALEF
define loopcounter FACTOR1
define loopcounter FACTOR2
define loopcounter FACTOR3
```

```
;$Id: Delay.incl,v 1.10 2000/05/08 11:39:02 eng Exp $
# 17 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/tchcnbasetr.txt" 2
```

```
aqseq 321
```

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

```
"d0=3u"
"d10=4u"
"d11=30m"
```

```
"d4=1.25m-p19-d16"
"d5=d4-4u"
```

```
"d15=p12+6u"
"d22=24m-4u"
"d25=24m-p19-d16-d15-p22-4u"
```

```
"CEN_HC1=(p4-p2)/2"
"CEN_HC3=(p12-p2)/2"
"CEN_HC2=(p3-p1)/2"
"CEN_HC4=(p15-p2)/2"
```

```
# 1 "mc_line 53 file C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/tchcnbasetr.txt expanding definition p
; dimension 3 aq-mode (F2) States-TPPI (F1) States-TPPI
define delay MCWRK
define delay MCREST
define loopcounter ST1CNT
"ST1CNT = td1 / ( 2 ) "
define loopcounter ST2CNT
"ST2CNT = td2 / ( 2 ) "
```

```
"MCWRK = 0.125000 * d11"
"MCREST = d11 - d11"
# 52 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/tchcnbasetr.txt"

1 ze
  d11 pl12:f2 pl16:f3
# 1 "mc_line 55 file C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/tchcnbasetr.txt expanding start 1
2      MCWRK*2 do:f2 do:f3
LBLSTS2,      MCWRK*2
LBLF2,      MCWRK*3
LBLSTS1,      MCWRK
LBLF1,      MCREST
# 55 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/tchcnbasetr.txt"

3 d11 pl9:f1
  d1 cw:f1
  d11 do:f1
  d11 pl3:f3 pl2:f2 pl1:f1
  (p1 ph1)
  d4 setnmr3|0 setnmr0|34|32|33
  p19:gp1
  d16
  (CEN_HC1 p2 ph1):f1 (p4 ph1):f2
  d16
  p19:gp1
  d4
  (p1 ph3):f1
; 4u pl11:f1
; p11 ph11
  50u
  p16:gp6
  d16 pl1:f1
  (p3 ph2):f2
  d10
  (p13:sp3 ph1):f2
  d22 ;pl20:f2

  (p21 ph5):f3
  d0
  (p12:sp2 ph1):f2
      ;changed due to visible coupling
  d0
  (p22 ph1):f3
```

```

d15
(p21 ph6):f3

d25 ;p12:f2
p19:gp2*EA
d16

(p13:sp3 ph1):f2
4u
(p1 ph7):f1
4u
d4 p12:f2
p19:gp3
d16
(CEN_HC1 p2 ph1):f1 (p4 ph1):f2
d16
p19:gp3
d4 p12:f2
4u
(CEN_HC2 p1 ph10):f1 (p3 ph1):f2
4u
d4 p12:f2
p19:gp4
d16
(CEN_HC1 p2 ph1):f1 (p4 ph1):f2
4u
d16
p19:gp5
d5 p112:f2 p116:f3
4u setnmr3^0 setnmr0^34^32^33
;p1 ph11
go=2 ph31 cpd2:f2 ;cpd3:f3
# 1 "mc_line 105 file C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/tchcnbasetr.txt expanding mc command
MCWRK do:f2 do:f3 wr #0 if #0 zd igrad EA MCWRK ip10*2
lo to LBLSTS2 times 2
MCWRK id10 MCWRK dd25
lo to LBLF2 times ST2CNT
MCWRK ip5 MCWRK rd10 MCWRK rd25
lo to LBLSTS1 times 2
MCWRK id0
lo to LBLF1 times ST1CNT
# 105 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/tchcnbasetr.txt"

```

```
exit
```

```
ph1=0
ph2=0 2
ph3=1
ph5=0 0 2 2
ph6=0
ph7=0
ph10=1
ph11=3
ph31=0 2 2 0
```

```
;p10 : 120db
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p116: f3 channel - power level for CPD/BB decoupling
;sp0 : f2 channel - shaped pulse 180 degree (modulated)
;sp3 : f2 channel - shaped pulse 180 degree (C6/C8 on resonance)
;sp5 : f2 channel - shaped pulse 180 degree (C1' off resonance)
;sp9 : f3 channel - shaped pulse 180 degree
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse
;p16: homospoil/gradient pulse [1 ms]
;p19: homospoil/gradient pulse [0.5 ms]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p28: f1 channel - trim pulse [1 ms]
;p30: f3 channel - 180 degree shaped pulse for inversion
;d0 : incremented delay (2D) [3 us]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J(HC) (C1')) [1.6 ms]
;d11: delay for disk I/O [30 ms]
;d13: short delay [4 us]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
```

```

;d22: 1/(4J(CN))
;      C1': [18 ms]
;d23: 1/(4J(CN))
;      C1' and C6/C8: [17 ms]
;d25: 1/(4J(CN))
;      C6/C8: [16 ms]
;d27: 1/(4J(HC)) (C6/C8)
;      for H6/H8: [1.25 ms]
;in0: 1/(2 * SW(H)) = DW(H)
;nd0: 2
;NS: 4 * n
;DS: >= 32
;td1: number of experiments in F1
;FnMODE: States-TPPI (or TPPI)
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2z
;cpd3: decoupling according to sequence defined by cpdprg3
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;shaped pulses for 600MHz:
;p13@sp3 iburp2.1000, p13=2100us, spoffs=-7000Hz (C5)
;p12@sp2 reburp1000, p12=2500us, spoffs=0Hz

;shaped pulses for 700MHz:
;p13@sp3 iburp2.1000, p13=2100us, spoffs=-7000Hz (C5)
;p12@sp2 reburp1000, p12=2300us, spoffs=0Hz

;use gradients:
;      gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4 : gp 5 : gp 6 : gp 7
;      20 : 80 : 25 : -60 : 35 : -60 : 18

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

```

```
;calculate pulselength according to:
;
; (DeltaOmega * DeltaT) / (width of region[ppm] * SF0n{MHz})
;
;for p14 use q3 pulse (DeltaOmega * DeltaT = 3.448)
; to cover 17.13ppm
; (pulselength: 2ms at 400.13 MHz)
; sp3: C6/C8 on res.
; sp5: C1' off res.
; sp0: twofold modulated pulse at 90ppm (C1' off res.)
; and 137ppm (C6/C8 on res.)
;for p30 use iburp2 pulse (DeltaOmega * DeltaT = 4.53)
; to cover 55.86ppm (N1/N9)
; (pulselength: 2ms at 400.13 MHz)
```

H(C)N(C)H:

```
;hcnch
;avance-version (00/10/16)
;HCNCH
;3D inverse correlation for triple resonance using multiple
; inept transfer steps

;R. Fiala, F. Jiang, V. Sklenar
; J. Biomol. NMR 12, 373 - 383 (1998)
```

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

```
aqseq 321
```

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

```
"d0=3u"
"d11=30m"
"d13=4u"
```

```
"d4=1.50m"
"d14=d4-p16-d16"
```

"d5=d4+p3+d0\*2"

"d15=d5-p16-d16"

"d7=d4-p1"

"d6=1.25m"

"d8=d6-p16-d16"

"d22=18m"

"d10=18m"

"d25=33m"

"DELTA=d25/4-d16-p16-p11/2"

"DELTA1=DELTA-d4-p12-p22"

"DELTA3=DELTA-p12/2-p22/2+p1"

"DELTA2=15.0m-d6-p16-d16"

"DELTA5=DELTA2+p2"

"CEN\_CN1=(p12-p13)/2"

"CEN\_CN2=(p14-p22)/2"

"CEN\_HC1=(p4-p2)/2"

"CEN\_HC2=(p3-p1)/2"

1 ze

d11 p112:f2 p116:f3

2 d11 do:f2 do:f3

3 d1 p13:f3 p12:f2 p11:f1

d11 fq1:f2

(p1 ph11):f1

d14 UNBLKGRAD

p16:gp6

d16

d0

(p4 ph1):f2

d0

(p2 ph1):f1

d15

p16:gp6

d16

(p3 ph2):f2

DELTA3 p120:f1

p16:gp1

d16 p121:f2

(p11:sp1 ph1):f1

d16  
p16:gp1  
DELTA3 p121:f2  
(p22 ph1):f3  
d4  
(p12:sp2 ph1):f2  
DELTA1  
p16:gp1  
d16 p12:f2  
(p11:sp1 ph1):f1  
d16 p13:f3  
p16:gp1  
DELTA p11:f1

(p1 ph4):f1  
d7  
d4  
(p3 ph3):f2  
20u  
p16:gp2  
d16

(p21 ph5):f3  
d22  
(p14:sp4 ph1):f2 (CEN\_CN2 p22 ph1):f3  
d10  
(p21 ph6):f3  
20u  
p16:gp3  
d16  
d11 fq1:f2  
20u

(p3 ph7):f2  
d6  
DELTA5  
p16:gp5  
d16  
(p12:sp2 ph1):f2 (CEN\_CN1 p13:sp3 ph1):f3  
d16  
p16:gp5  
DELTA2  
(p2 ph1):f1

d6

(p3 ph1):f2

(p1 ph1):f1

4u

d8

p16:gp4

d16

(CEN\_HC1 p2 ph1):f1 (p4 ph1):f2

d16

p16:gp4

d8 p112:f2 p116:f3

4u BLKGRAD

go=2 ph31 cpd2:f2 cpd3:f3

d11 do:f2 do:f3 mc #0 to 2

F1PH(ip11 & rd22 & rd10,id0)

F2PH(ip5, dd10 & id22)

exit

ph1=0

ph2=0 0 2 2

ph3=0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0  
2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2

ph4=1 1 1 1 3 3 3 3

ph5=0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0  
0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0  
2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2  
2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2

ph6=0 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2

ph7=0

ph11=0 2

ph31=0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0  
2 0 0 2 0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2  
2 0 0 2 0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2  
0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2 0 2 2 0

;p10 : 120db

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)

;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)

;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)

```

;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p116: f3 channel - power level for CPD/BB decoupling
;sp0 : f2 channel - shaped pulse 180 degree (modulated)
;sp3 : f2 channel - shaped pulse 180 degree (C6/C8 on resonance)
;sp5 : f2 channel - shaped pulse 180 degree (C1' off resonance)
;sp9 : f3 channel - shaped pulse 180 degree
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse
;p16: homospoil/gradient pulse [1 ms]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p28: f1 channel - trim pulse [1 ms]
;p30: f3 channel - 180 degree shaped pulse for inversion
;d0 : incremented delay (2D) [3 us]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J(HC)) (C1') [1.6 ms]
;d11: delay for disk I/O [30 ms]
;d13: short delay [4 us]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;d22: 1/(4J(CN))
; C1': [18 ms]
;d23: 1/(4J(CN))
; C1' and C6/C8: [17 ms]
;d25: 1/(4J(CN))
; C6/C8: [16 ms]
;d27: 1/(4J(HC)) (C6/C8)
; for H6/H8: [1.25 ms]
;in0: 1/(2 * SW(H)) = DW(H)
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: >= 32
;td1: number of experiments in F1
;FnMODE: States-TPPI (or TPPI)
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;cpd3: decoupling according to sequence defined by cpdprg3
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence
;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

```

```
;use gradient ratio:
;
;           gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4 : gp 5 : gp 6 : gp 7
;           -40 :  25 : -45 : -60 :  40 :  55 :  10

;for z-only gradients:
;gpz1: -40%
;gpz2: 25%
;gpz3: -45%
;gpz4: -60%
;gpz5: 40%
;gpz6: 55%
;gpz7: 10%

;use gradient files:
;gpname1: SINE.100
;gpname2: SINE.100
;gpname3: SINE.100
;gpname4: SINE.100
;gpname5: SINE.100
;gpname6: SINE.100
;gpname7: SINE.100

;calculate pulselength according to:
;
; (DeltaOmega * DeltaT) / (width of region[ppm] * SFOn{MHz})
;
;for p14 use q3 pulse (DeltaOmega * DeltaT = 3.448)
; to cover 17.13ppm
; (pulselength: 2ms at 400.13 MHz)
; sp3: C6/C8 on res.
; sp5: C1' off res.
; sp0: twofold modulated pulse at 90ppm (C1' off res.)
;       and 137ppm (C6/C8 on res.)
;for p30 use iburp2 pulse (DeltaOmega * DeltaT = 4.53)
; to cover 55.86ppm (N1/N9)
; (pulselength: 2ms at 400.13 MHz)
```

### HCC-COSY Iminos:

```
;HNN-COSY - Pulsprogramm zur Bestimmung von Wasserstoffbrueckenbindungen
;modifiziert von M. Hennig & J.R. Williamson: Nuc Ac Res 2000, 28, 1585-1593
```

;A.J. Dingley & S. Grzesiek: J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 8293-8297  
;HNN-COSY von den Iminos ausgehend in H2O

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

```
"p2=p1*2"
```

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

```
"p22=p21*2"
```

```
"p8=p21*59.4/90"
```

```
"p9=p21*298/90"
```

```
"p27=p1"
```

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

```
"d12=20u"
```

```
"d16=500u"
```

```
"d30=50u"
```

```
;"d0=(in0-p21*4/3.14159-p2)/2" ;ph = (+90, -180)
```

```
"d0=(in0*2-p21*4/3.14159-p2)/2" ;ph = (+180, -360)
```

```
"d20=2.25m"
```

```
"d21=2.25m"
```

```
"d22=15m - d16 - p16"
```

```
"d23=15m - d30 - p16"
```

```
"DELTA=d19-p22/2"
```

```
"DELTA1=d20-p16-d16-p27*2.385-d19*5+p22/2"
```

```
"DELTA2=d20-p16-d16-p27*2.154-p27*0.231-d19*5+p22/2-8u"
```

```
"l3=td1/2"
```

```
1 d11 ze
```

```
    d11
```

```
2 d1 do:f3 do:f2
```

```
    d11*4
```

```
3 d11
```

```
4 d12 do:f3 do:f2
```

d12 p11:f1  
 d12 p13:f3  
 d12 p112:f2

(p1 ph1):f1

d20 UNBLKGRAD  
 (center (p2 ph0):f1 (p8 ph20 p9 ph22 p8 ph20):f3)  
 d21

(p1 ph2):f1  
 d30  
 p16:gp1 ;G1  
 d16  
 4u cpd2:f2  
 (p21 ph3):f3  
 d22  
 p16:gp2 ;G2  
 d16

(p8 ph11 p9 ph12 p8 ph11):f3

d30  
 p16:gp2 ;G2  
 d23  
 (p21 ph4):f3

d0 ;t1/2  
 (p2 ph2):f1  
 d0

(p21 ph2):f3  
 d22  
 p16:gp3 ;G3  
 d16  
 (p8 ph20 p9 ph22 p8 ph20):f3  
 d30  
 p16:gp3 ;G3  
 d23  
 (p21 ph1):f3  
 4u do:f2  
 d30  
 p16:gp4 ;G4

```
d16
(p1 ph1):f1

DELTA1
p16:gp5
d16
p27*0.231 ph7
d19*2
p27*0.692 ph7
d19*2
p27*1.462 ph7
DELTA
(p22 ph1):f3
DELTA
p27*1.462 ph8
d19*2
p27*0.692 ph8
d19*2
p27*0.231 ph8
4u
p16:gp5
d16
4u BLKGRAD
DELTA2 p113:f3

go=2 ph31 cpd3:f3
d1 do:f3 do:f2 wr #0 if #0 zd
d11 ip3
d11 ip4
d11 ip11
d11 ip12
lo to 3 times 2
d11 id0
lo to 4 times 13

exit

ph0=0
ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=1 1 3 3
```

```
ph6=2
ph7=0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
ph8=2 2 2 2 3 3 3 3 0 0 0 0 1 1 1 1
ph11=0
ph12=2
ph20=0
ph22=2
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

;f1=Protonen 1H
;f2=Carbon 13C
;f3=Stickstoff 15N

;p1= f1 channel 90 degree high power pulse
;p2= f1 channel 180 degree high power pulse
;p21= f3 channel 90 degree high power pulse
;p22= f3 channel 180 degree high power pulse
;cpd2: adiabatic broadband decoupling of all carbons in the base
;cpd3: adiabatic broadband decoupling of all nitrogens in the base

;gradients: all SINE.100 with p16=1000ms
; gpz1=10%
; gpz2=7%
; gpz3=-17%
; gpz4=15%
; gpz5=70%

;purine: J(H8-N7/N9)=10Hz
;          J(H2-N1/N3)=15Hz
;pyrimidines: J(H5-N1)=4.5Hz
;              J(H6-N1)=3.5Hz
;              J(H5-N3)=2.5Hz

;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d16: delay for homospoil/gradient recovery

PH-ct-COSY:

;phctpcosy
;adapted from decp90f3
;avance-version (00/02/07)
;J Biomol NMR 2002, 22, 65-81 Carlomagno et al
```

```
;measuring HP correlation with P on F2 with third sender (300W)
;Constant Time
```

```
;Last revised vsan: 2.10.2004
```

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

```
"p2=p1*2"
```

```
"p12=p11*2"
```

```
;"p6=p1*4/3"
```

```
"p6=p1*240/90"
```

```
"d12=20u"
```

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

```
"d2=15m-p16-d16-d0"
```

```
"d22=15m-p16-d16-50u"
```

```
"CEN_HP1=p11-p1"
```

```
"in22=in0"
```

```
1 ze
```

```
2 d11 p13:f3 p17:f1
```

```
3 (p6 ph0):f1
```

```
5m
```

```
lo to 3 times 500
```

```
; p16:gp3
```

```
; d16
```

```
d12 p11:f1
```

```
(p11 ph1):f3
```

```
d2
```

```
d0
```

```
    p16:gp1
```

```
    d16
```

```
(CEN_HP1 p2 ph4):f1 (p12 ph0):f3
```

```
    50u
```

```
    p16:gp1
```

```
    d16
```

```
d22
```

```

(p11 ph2):f3
  50u
  p16:gp2
  d16
(p1 ph3):f1
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2 F1PH(ip1, id0 & dd22)
exit

ph0=0
ph1=0 2
ph2=1 1 3 3
ph3=0 0 0 0 2 2 2 2
ph4=0 0 0 0 0 0 0 ;1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2 ;2 0 0 2 0 2 2 0

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p17 : f1 channel - lower power 6.0 dB
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d2 : 1/(2J(XH))
;cnst2: = J(XH)      3J(HP) = ca. 9Hz
;in ased, set in22 to the same value of in0
;set same Constant Time in declaration of d2 and d22 - 15ms - 50ms

```

## HCCH-E. COSY

```

;HCCH-E.COSY a/b interleaved
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p6=p5*2"

"d4=1.5m"
"d14=d4-p19-50u"
"d24=d4+p3-4u-p16-50u-d16"
"d6=7.5m" ;1/2Jcc

```

```

; "d6=12m" ;1/2Jcc
; "d6=18m" ;3/4Jcc
"d0=d6/2-d4-p2*2-8u-p19-50u-d16"
"d20=d6/2-p19-50u-d16"
; "d8=12m" ;1/2Jcc
; "d8=6m" ;1/4Jcc
"d8=3.7m" ;1/4Jcc
"d7=d8/2+p3*0.6366-p16-50u-d16"

"DELTA=d8/2-p2-4u-d4"
"DELTA1=d4-p16-50u-d16"
"CEN_HC1=p4+4u-p1"
"CEN_HC2=p2-p3"

"d11=30m"

"l0=td1/4"

1 ze
2 d11 do:f2
  3m
3 12m
4 d11
  d11
  3m
5 10u p19:f1
  d1 cw:f1
  4u do:f1
  10u p11:f1
  10u p12:f2
  10u p113:f3
  (p3 ph0):f2
50u UNBLKGRAD
GRADIENT(cnst22)
d16*2
  p1 ph4
50u
GRADIENT2(cnst20)
  d14
  (CEN_HC1 p1*2 ph10) (p3 ph11 4u p4 ph0 4u p3 ph11):f2
50u
GRADIENT2(cnst20)
  d14

```

```

    p1 ph5
50u
GRADIENT(cnst23)
d16
    4u cpd3:f3
    (p3 ph1):f2
    d4
    (p1 ph9 4u p2 ph10 4u p1 ph9)
    d0
50u
GRADIENT2(cnst19)
d16
    (p4 ph0):f2
50u
GRADIENT2(cnst19)
d16
    d20
    (p3 ph2):f2
    d7
50u
GRADIENT(cnst21)
d16
    (p4 ph0):f2
    DELTA
    (p1 ph10)
    4u
    (p1 ph6)
    DELTA1
50u
GRADIENT(cnst21)
d16
    (p3 ph3):f2
    (p1*2 ph0)
    4u do:f3
46u
GRADIENT(cnst21)
d16
    d24 p112:f2
    4u BLKGRAD
    go=2 ph31 cpd2:f2
    d11 do:f2 wr #0 if #0 zd
    3m ip1
    lo to 3 times 2

```

```

3m rp1
3m ip9
3m ip9
3m ip1
lo to 4 times 2
3m rp1
d11 id0
d11 dd20
lo to 5 times 10
exit

```

```

ph0 = 0
ph1 = 3 3 3 3 3 3 3
      3 3 3 3 3 3 3
      1 1 1 1 1 1 1
      1 1 1 1 1 1 1
ph2 = 0 0 0 0 0 0 0
      0 0 0 0 0 0 0
      0 0 0 0 0 0 0
      0 0 0 0 0 0 0
      2 2 2 2 2 2 2
      2 2 2 2 2 2 2
      2 2 2 2 2 2 2
      2 2 2 2 2 2 2
ph3 = 0
ph4 = (8)1 1 1 1 1 1 3
      3 3 3 3 3 3 5
ph5 = (8)3 3 3 3 3 3 5
ph6 = 2
ph9 = (8)1 1 1 1 1 1 3
ph10= (8)1 1 1 1 1 1 3
ph11= 1
ph31= 0 0 0 0 0 0 0
      2 2 2 2 2 2 2
      2 2 2 2 2 2 2
      0 0 0 0 0 0 0

```

ct-HSQC zur Bestimmung der  $J_{2'OH,C1'/C3'}$

```

;inviprst
;avance-version
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using States-TPPI method

```

;with decoupling during acquisition  
;G. Bodenhausen & D.J. Ruben, Chem. Phys. Lett. 69, 185 (1980)

#include <Avance.incl>

#include <Grad.incl>

"p2=p1\*2"

"p4=p3\*2"

"d0=3u"

"d10=25m-p12-p16-d30"

"d21=25m-p22-3u-d16-p16"

"d9=p12/2"

"d23=25m-p2-3u-p12/2-p16-d16"

"d3=p3-p1"

"d18=(p12-p4)/2"

"d19=(p22-p2)/2"

"d4=1s/(cnst2\*4)-p19-d16"

"d11=30m"

"d12=20u"

"d16=500u"

"d30=50u"

"d13=3u"

"d22=p13+4u"

"l3=(td1/4)"

"l0=0"

1 ze

    d11 p112:f2

2 d11 do:f2

    3m

3 6m

4 d11\*2

5 d1

    d12 p12:f2

    d13 do:f1

    d12 p11:f1

    d12 p13:f3

```
(p1 ph1)
d4 UNBLKGRAD
p19:gp4
d16
(d3 p2 ph2) (p4 ph9):f2
d16
p19:gp4
d4 p17:f1
(p11 ph0)
(p1 ph3)
d30
p16:gp1
d16 p11:f1

(p3 ph6):f2

if "l0 %2 == 1" goto 100

d0
(d19 p2 ph18):f1 (p22 ph1):f3
d21 p120:f1
p16:gp2
d16
(p4 ph0):f2
d30
p16:gp2
d10
(p12:sp1 ph0):f1
goto 101

100 d0
(d19 p2 ph18):f1 (p22 ph1):f3
d23 p120:f1
p16:gp2
d16
(p12:sp1 ph0):f1 (d18 p4 ph0):f2
d30
p16:gp2
d9
d10

101 (p3 ph7):f2
d30
```

```

p16:gp3
d16 p11:f1
(p1 ph4)
d22
d4
p19:gp5
d16
(d3 p2 ph17) (p4 ph5):f2
d16
p19:gp5
d4 p112:f2
4u BLKGRAD
(p13 ph8)
go=2 ph31 cpd2:f2
d11 do:f2 wr #0 if #0 zd
3m iu0
lo to 3 times 2
3m ip6
3m ip9
lo to 4 times 2
d11 id0
d11 dd10
lo to 5 times l3
exit

ph0=0
ph1=0
ph2=0 0 2 2
ph3=1
ph4=1
ph5=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph6=0 2
ph7=0 0 0 0 2 2 2 2
ph17=0 2
ph8=3
ph18=1 1 3 3
ph9=0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p19 : f1 channel - power level for presaturation
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling

```

```

;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d13: short delay [3 usec]
;cnst2: = J(XH)
;l3: loop for phase sensitive 2D using States-TPPI method: l3 = td1/2
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 4 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: States-TPPI
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

```

ct-NOESY zur Bestimmung der  $J_{2'OH,H2'}$

```

;noesygst19
;avance-version
;2D homonuclear correlation via dipolar coupling
;dipolar coupling may be due to noe or chemical exchange.
;phase sensitive using States-TPPI method
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson.,
; Series A 102, 241 -245 (1993)

```

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

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

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

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

```
"d12=20u"
```

```
"p2=p1*2.0"
```

```
"d10=d21-p12-4u-d12-p16-d16"
```

```
"d18=d21-3u-p12-p4-p16-d16-4u-d12"
```

```

"p4=p3*2"

"l3=(td1/2)"
"l0=0"

1 ze
2 d1
3 3m
4 d11*2
5 d12 p11:f1
  d12 p12:f2
  d12 UNBLKGRAD
  p1 ph1

if "l0 %2 == 1" goto 100

  d0
  (p4 ph0):f2
  d12 p120:f1
  4u
  (p12:sp2 ph0):f1
  d18
  p16:gp3
  d16
  (p11:sp1 ph10):f1
  d16
  p16:gp3
  d10
  (p12:sp2 ph0):f1
  4u
  d12 p11:f1
goto 101

100 d0
  (p4 ph0):f2
  d18 p120:f1
  p16:gp3
  d16
  d12
  (p12:sp2 ph0):f1
  4u
  (p11:sp1 ph10):f1
  d16

```

```
p16:gp3
d10
(p12:sp2 ph0):f1
4u
d12 p11:f1

101 p1 ph2
d8
p16:gp2
d16 p111:f1
p13 ph13
4u p11:f1
p1 ph3
d12 p118:f1
50u
p16:gp1
d16
p28*0.231 ph4
d19*2
p28*0.692 ph4
d19*2
p28*1.462 ph4
d19*2
p28*1.462 ph5
d19*2
p28*0.692 ph5
d19*2
p28*0.231 ph5
46u
p16:gp1
d16
4u BLKGRAD
go=2 ph31
d1 wr #0 if #0 ip1 zd
lo to 3 times 2

3m iu0
lo to 4 times 2

d11 id0
d11 dd10
lo to 5 times l3
exit
```

```

ph0=0
ph10=0 0 1 1 2 2 3 3
ph1=0 2
ph2=0
ph3=0
ph13=2
ph4=0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
ph5=2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3
ph31=0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p118
;
;           use for fine adjustment
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p28: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;d0 : incremented delay (2D)                [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d8 : mixing time
;d11: delay for disk I/O                    [30 msec]
;d12: delay for power switching             [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
;   d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;l3: loop for phase sensitive 2D using States-TPPI method: l3 = td1/2
;in0: 1/(1 * SW) = 2 * DW
;nd0: 1
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: States-TPPI

;use gradient program (GRDPROG) : 2sine
;use gradient ratio: cnst21 : cnst22
;   20 :   20

```

## Anhang B

# Kristallisationsbedingungen

## Kristallisationsbedingungen Classics Suite

|  |
|--|
| 0.1 M BICINE pH 9.0, 2 % (v/v) Dioxane, 10 % (w/v) PEG 20000                       |
| 0.1 M MES pH 6.5, 10 % (v/v) Dioxane, 1.6 M AmSO                                   |
| 35 % (v/v) Dioxane   |
| 0.5 M NaCl, 0.1 M tri-Na citrate pH 5.6, 2 % (v/v) Ethylene imine polymer          |
| 0.1 M Tris pH 8.5, 12 % (v/v) Glycerol, 1.5 M AmSO                                 |
| 0.5 M NaCl, 0.01 M Mg chloride, 0.01 M CTAB  |
| 0.01 M FeCl <sub>2</sub> , 0.1 M tri-Na citrate pH 5.6, 10 % (v/v) Jeffamine M-600 |
| 0.1 M HEPES pH 7.5, 20 % (v/v) Jeffamine M-600                                     |
| 0.5 M AmSO <sub>4</sub> , 0.1 M tri-Na citrate pH 5.6, 1.0 M Lithium sulfate       |
| 0.01 M NiCl <sub>2</sub> , 0.1 M Tris pH 8.5, 1.0 M Lithium sulfate                |
| 0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5, 1.5 M Lithium sulfate                              |
| 0.1 M BICINE pH 9.0, 2.0 M MgCl  |
| 0.2 M Mg formate   |
| 0.1 M MES pH 6.5, 1.6 M Mg sulfate   |
| 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 8 % (w/v) PEG 8000  |
| 0.1 M HEPES pH 7.5, 10 % (w/v) PEG 8000  |
| 0.5 M Lithium sulfate, 15 % (w/v) PEG 8000   |
| 0.2 M Zinc acetate, 0.1 M Na cacodylate pH 6.5, 18 % (w/v) PEG 8000                |
| 0.2 M Calcium acetate, 0.1 M Na cacodylate pH 6.5, 18 % (w/v) PEG 8000             |
| 0.2 M Mg acetate, 0.1 M Na cacodylate pH 6.5, 20 % (w/v) PEG 8000                  |
| 0.05 M K phosphate, 20 % (w/v) PEG 8000  |
| 0.2 M AmSO <sub>4</sub> , 0.1 M Na cacodylate pH 6.5, 30 % (w/v) PEG 8000          |
| 0.2 M Na acetate, 0.1 M Na cacodylate pH 6.5, 30 % (w/v) PEG 8000                  |
| 0.2 M AmSO <sub>4</sub> , 30 % (w/v) PEG 8000                                      |
| 0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5, 2 % (v/v) PEG 400, 2.0 M AmSO                      |
| 0.2 M CaCl <sub>2</sub> , 0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5, 28 % (v/v) PEG 400       |
| 0.1 M Cadmium chloride, 0.1 M Na acetate pH 4.6, 30 % (v/v) PEG 400                |
| 0.2 M Mg chloride, 0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5, 30 % (v/v) PEG 400              |
| 0.2 M tri-Na citrate, 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 30 % (v/v) PEG 400                    |
| 0.1 M Na chloride, 0.1 M BICINE pH 9.0, 20 % (w/v) PEG 550 MME                     |
| 0.01 M Zinc sulfate, 0.1 M MES pH 6.5, 25 % (w/v) PEG 550 MME                      |
| 10 % (w/v) PEG 1000, 10 % (w/v) PEG 8000   |
| 30 % (w/v) PEG 1500  |
| 0.01 M NiCl <sub>2</sub> , 0.1 M Tris pH 8.5, 20 % (w/v) PEG 2000 MME              |
| 0.2 M AmSO <sub>4</sub> , 0.1 M Na acetate pH 4.6, 30 % (w/v) PEG 2000 MME         |
| 0.1 M Na acetate pH 4.6, 8 % (w/v) PEG 4000  |
| 0.2 M AmSO <sub>4</sub> , 0.1 M Na acetate pH 4.6, 25 % (w/v) PEG 4000             |
| 0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Na acetate pH 4.6, 30 % (w/v) PEG 4000               |
| 0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M tri-Na citrate pH 5.6, 30 % (w/v) PEG 4000           |
| 0.2 M MgCl <sub>2</sub> , 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 30 % (w/v) PEG 4000               |
| 0.2 M Lithium sulfate, 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 30 % (w/v) PEG 4000                  |
| 0.2 M Na acetate, 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 30 % (w/v) PEG 4000                       |
| 0.2 M AmSO <sub>4</sub> , 30 % (w/v) PEG 4000                                      |
| 0.2 M AmSO <sub>4</sub> , 0.1 M MES pH 6.5, 30 % (w/v) PEG 5000 MME                |
| 0.1 M HEPES pH 7.5, 10 % (w/v) PEG 6000, 5 % (v/v) MPD                             |
| 10 % (w/v) PEG 6000, 2.0 M NaCl  |
| 0.1 M HEPES pH 7.5, 20 % (w/v) PEG 10000, 8 % (v/v) Ethylene glycol                |
| 0.1 M MES pH 6.5, 12 % PEG 20000   |
| 0.01 M CoCl <sub>2</sub> , 0.1 M Na acetate pH 4.6, 1.0 M 1,6-Hexanediol           |
| 0.1 M tri-Na citrate pH 5.6, 2.5 M 1,6-Hexanediol                                  |
| 0.2 M MgCl <sub>2</sub> , 0.1 M Tris pH 8.5, 3.4 M 1,6-Hexanediol                  |
| 5 % (v/v) Isopropanol, 2.0 M AmSO <sub>4</sub>                                     |
| 0.1 M HEPES Na salt pH 7.5, 10 % (v/v) Isopropanol, 20 % (w/v) PEG 4000            |
| 0.2 M CaCl <sub>2</sub> , 0.1 M Na acetate pH 4.6, 20 % (v/v) Isopropanol          |
| 0.1 M tri-Na citrate pH 5.6, 20 % (v/v) Isopropanol, 20 % (w/v) PEG 4000           |
| 0.2 M tri-Na citrate, 0.1 M HEPES Na salt pH 7.5, 20 % (v/v) Isopropanol           |
| 0.2 M tri-Na citrate, 0.1 M Na cacodylate pH 6.5, 30 % (v/v) Isopropanol           |
| 0.2 M MgCl <sub>2</sub> , 0.1 M HEPES Na salt pH 7.5, 30 % (v/v) Isopropanol       |
| 0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 30 % (v/v) Isopropanol              |
| 10 % (v/v) Ethanol, 1.5 M NaCl   |
| 0.1 M Tris pH 8.5, 20 % (v/v) Ethanol  |
| 25 % (v/v) Ethylene glycol   |
| 0.02 M CaCl <sub>2</sub> , 0.1 M Na acetate pH 4.6, 30 % (v/v) MPD                 |
| 0.2 M NaCl, 0.1 M Na acetate pH 4.6, 30 % (v/v) MPD                                |
| 0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M tri-Na citrate pH 5.6, 30 % (v/v) MPD                |

## Kristallisationsbedingungen Classics Suite

|   |
|---|
| 0.2 M Mg acetate, 0.1 M Na cacodylate pH 6.5, 30 %(v/v) MPD               |
| 0.2 M tri-Na citrate, 0.1 M HEPES Na salt pH 7.5, 30 %(v/v) MPD           |
| 0.5 M AmSO <sub>4</sub> , 0.1 M HEPES pH 7.5, 30 %(v/v) MPD               |
| 0.2 M Ammonium phosphate, 0.1 M Tris pH 8.5, 50 %(v/v) MPD                |
| 0.1 M HEPES pH 7.5, 70 %(v/v) MPD   |
| 0.1 M Tris pH 8.5, 25 %(v/v) tert-Butanol                                 |
| 0.1 M tri-Na citrate pH 5.6, 35 %(v/v) tert-Butanol                       |
| 0.4 M Ammonium phosphate  |
| 0.1 M tri-Na citrate pH 5.6, 1.0 M Ammonium phosphate                     |
| 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 2.0 M Ammonium phosphate                           |
| 0.1 M HEPES pH 7.5, 2.0 M Ammonium formate                                |
| 0.1 M Na acetate pH 4.6, 2.0 M AmSO <sub>4</sub>                          |
| 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 2.0 M AmSO <sub>4</sub>                            |
| 2.0 M AmSO <sub>4</sub>   |
| 0.1 M NaCl, 0.1 M HEPES pH 7.5, 1.6 M AmSO <sub>4</sub>                   |
| 0.01 M CoCl <sub>2</sub> , 0.1 M MES pH 6.5, 1.8 M AmSO <sub>4</sub>      |
| 0.2 M K/Na tartrate, 0.1 M tri-Na citrate pH 5.6, 2.0 M AmSO <sub>4</sub> |
| 1.0 M Imidazole pH 7.0  |
| 0.4 M K/Na tartrate   |
| 0.1 M HEPES Na salt pH 7.5, 0.8 M K/Na tartrate                           |
| 0.1 M Imidazole pH 6.5, 1.0 M Na acetate                                  |
| 0.05 M Cadmium sulfate, 0.1 M HEPES pH 7.5, 1.0 M Na acetate              |
| 0.1 M Na cacodylate pH 6.5, 1.4 M Na acetate                              |
| 0.1 M Na acetate pH 4.6, 2.0 M NaCl                                       |
| 0.1 M Na phosphate, 0.1 M K phosphate, 0.1 M MES pH 6.5, 2.0 M NaCl       |
| 0.1 M HEPES pH 7.5, 4.3 M NaCl  |
| 0.1 M HEPES Na salt pH 7.5, 1.4 M tri-Na citrate                          |
| 1.6 M tri-Na citrate pH 6.5   |
| 0.1 M HEPES Na salt pH 7.5, 0.8 M Na phosphate, 0.8 M K phosphate         |
| 0.1 M Na acetate pH 4.6, 2.0 M Na formate                                 |
| 4.0 M Na formate  |

## Kristallisationsbedingungen MPD Suite

|  |
|--|
| 0.2 M Cadmium chloride, 40 %(v/v) MPD      |
| 0.2 M Potassium fluoride, 40 %(v/v) MPD    |
| 0.2 M Ammonium fluoride, 40 %(v/v) MPD     |
| 0.2 M Lithium chloride, 40 %(v/v) MPD      |
| 0.2 M Magnesium chloride, 40 %(v/v) MPD    |
| 0.2 M Na chloride, 40 %(v/v) MPD           |
| 0.2 M Calcium chloride, 40 %(v/v) MPD      |
| 0.2 M Potassium chloride, 40 %(v/v) MPD    |
| 0.2 M Ammonium chloride, 40 %(v/v) MPD     |
| 0.2 M Na iodide, 40 %(v/v) MPD             |
| 0.2 M Potassium iodide, 40 %(v/v) MPD      |
| 0.2 M Ammonium iodide, 40 %(v/v) MPD       |
| 0.2 M Na thiocyanate, 40 %(v/v) MPD        |
| 0.2 M Potassium thiocyanate, 40 %(v/v) MPD |
| 0.2 M Lithium nitrate, 40 %(v/v) MPD       |
| 0.2 M Magnesium nitrate, 40 %(v/v) MPD     |
| 0.2 M Na nitrate, 40 %(v/v) MPD            |
| 0.2 M Potassium nitrate, 40 %(v/v) MPD     |
| 0.2 M Ammonium nitrate, 40 %(v/v) MPD      |
| 0.2 M Zinc sulfate, 40 %(v/v) MPD          |
| 0.2 M Na formate, 40 %(v/v) MPD            |
| 0.2 M Potassium formate, 40 %(v/v) MPD     |
| 0.2 M Ammonium formate, 40 %(v/v) MPD      |
| 0.2 M Lithium acetate, 40 %(v/v) MPD       |
| 0.2 M Magnesium acetate, 40 %(v/v) MPD     |
| 0.2 M Na malonate, 40 %(v/v) MPD           |
| 0.2 M Na acetate, 40 %(v/v) MPD            |
| 0.2 M Calcium acetate, 40 %(v/v) MPD       |
| 0.2 M Potassium acetate, 40 %(v/v) MPD     |
| 0.2 M Ammonium acetate, 40 %(v/v) MPD      |
| 0.2 M Lithium sulfate, 40 %(v/v) MPD       |
| 0.2 M Magnesium sulfate, 40 %(v/v) MPD     |

## Kristallisationsbedingungen MPD Suite

|  |
|--|
| 0.2 M Cesium chloride, 40 %(v/v) MPD                               |
| 0.2 M Nickel chloride, 40 %(v/v) MPD                               |
| 0.2 M Ammonium sulfate, 40 %(v/v) MPD                              |
| 0.2 M di-Na tartrate, 40 %(v/v) MPD                                |
| 0.2 M K/Na tartrate, 40 %(v/v) MPD                                 |
| 0.2 M di-Ammonium tartrate, 40 %(v/v) MPD                          |
| 0.2 M Na phosphate, 40 %(v/v) MPD                                  |
| 0.2 M Potassium bromide, 40 %(v/v) MPD                             |
| 0.2 M Na bromide, 40 %(v/v) MPD                                    |
| 0.2 M di-Potassium phosphate, 40 %(v/v) MPD                        |
| 0.2 M Ammonium phosphate, 40 %(v/v) MPD                            |
| 0.2 M di-Ammonium phosphate, 40 %(v/v) MPD                         |
| 0.2 M tri-Lithium citrate, 40 %(v/v) MPD                           |
| 0.2 M tri-Na citrate, 40 %(v/v) MPD                                |
| 0.2 M tri-Potassium citrate, 40 %(v/v) MPD                         |
| 0.2 M di-Ammonium citrate, 40 %(v/v) MPD                           |
| 0.1 M Citric acid pH 4.0, 10 %(v/v) MPD                            |
| 0.1 M Na acetate pH 5.0, 10 %(v/v) MPD                             |
| 0.1 M MES pH 6.0, 10 %(v/v) MPD                                    |
| 0.1 M HEPES pH 7.0, 10 %(v/v) MPD                                  |
| 0.1 M Tris pH 8.0, 10 %(v/v) MPD                                   |
| 0.1 M BICINE pH 9.0, 10 %(v/v) MPD                                 |
| 0.1 M Citric acid pH 4.0, 20 %(v/v) MPD                            |
| 0.1 M Na acetate pH 5.0, 20 %(v/v) MPD                             |
| 0.1 M MES pH 6.0, 20 %(v/v) MPD                                    |
| 0.1 M HEPES pH 7.0, 20 %(v/v) MPD                                  |
| 0.1 M Tris pH 8.0, 20 %(v/v) MPD                                   |
| 0.1 M BICINE pH 9.0, 20 %(v/v) MPD                                 |
| 0.1 M Citric acid pH 4.0, 40 %(v/v) MPD                            |
| 0.1 M Na acetate pH 5.0, 40 %(v/v) MPD                             |
| 0.1 M MES pH 6.0, 40 %(v/v) MPD                                    |
| 0.1 M HEPES pH 7.0, 40 %(v/v) MPD                                  |
| 0.1 M Tris pH 8.0, 40 %(v/v) MPD                                   |
| 0.1 M BICINE pH 9.0, 40 %(v/v) MPD                                 |
| 0.1 M Na acetate pH 4.0, 65 %(v/v) MPD                             |
| 0.1 M Na acetate pH 5.0, 65 %(v/v) MPD                             |
| 0.1 M MES pH 6.0, 65 %(v/v) MPD                                    |
| 0.1 M HEPES pH 7.0, 65 %(v/v) MPD                                  |
| 0.1 M Tris pH 8.0, 65 %(v/v) MPD                                   |
| 0.1 M BICINE pH 9.0, 65 %(v/v) MPD                                 |
| 0.1 M tri-Na citrate, 0.1 M HEPES Na salt pH 7.5, 10 %(w/v) MPD    |
| 0.05 M Magnesium chloride, 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 12 %(w/v) MPD    |
| 0.02 M Calcium chloride, 0.1 M Na acetate pH 4.6, 15 %(w/v) MPD    |
| 0.1 M Imidazole.HCl pH 8.0, 15 %(w/v) MPD, 5 %(w/v) PEG 4000       |
| 0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M tri-Na citrate pH 5.6, 15 %(w/v) MPD |
| 0.2 M Magnesium acetate, 0.1 M MES Na salt pH 6.5, 15 %(w/v) MPD   |
| 0.2 M tri-Na citrate, 0.1 M HEPES Na salt pH 7.5, 15 %(w/v) MPD    |
| 0.1 M tri-Na citrate, 0.1 M HEPES Na salt pH 7.5, 20 %(w/v) MPD    |
| 0.1 M Imidazole.HCl pH 8.0, 20 %(w/v) MPD                          |
| 0.2 M Na chloride, 20 %(w/v) MPD, 4 %(w/v) Glycerol                |
| 0.02 M Calcium chloride, 0.1 M Na acetate pH 4.6, 30 %(w/v) MPD    |
| 0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M tri-Na citrate pH 5.6, 30 %(w/v) MPD |
| 0.2 M Magnesium acetate, 0.1 M MES Na salt pH 6.5, 30 %(w/v) MPD   |
| 0.5 M Ammonium sulfate, 0.1 M HEPES Na salt pH 7.5, 30 %(w/v) MPD  |
| 0.2 M tri-Na citrate, 0.1 M HEPES Na salt pH 7.5, 30 %(w/v) MPD    |
| 0.1 M HEPES Na salt pH 7.5, 30 %(w/v) MPD, 5 %(w/v) PEG 4000       |
| 0.1 M Imidazole.HCl pH 8.0, 30 %(w/v) MPD, 10 %(w/v) PEG 4000      |
| 30 %(w/v) MPD, 20 %(w/v) Ethanol                                   |
| 35 %(w/v) MPD  |
| 0.1 M Imidazole.HCl pH 8.0, 35 %(w/v) MPD                          |
| 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 40 %(w/v) MPD                               |
| 0.1 M HEPES Na salt pH 7.5, 47 %(w/v) MPD                          |
| 47 %(w/v) MPD, 2 %(w/v) tert-Butanol                               |
| 50 %(w/v) MPD  |

## Kristallisationsbedingungen Nucleix

|  |
|--|
| 0.05 M MES pH 5.6, 0.01 M MgCl <sub>2</sub> , 2 M Li sulfate   |
| 0.05 M MES pH 5.6, 0.01 M Mg acetate, 2.5 M Ammonium sulfate   |
| 0.05 M MES pH 5.6, 0.1 M Mg acetate, 20 % MPD  |
| 0.05 M MES pH 5.6, 0.2 M KCl, 0.01 M Mg sulfate, 10 % PEG 400  |
| 0.05 M MES pH 5.6, 0.2 M KCl, 0.01 M MgCl <sub>2</sub> , 5 % PEG 8000                                |
| 0.05 M MES pH 5.6, 0.1 M Ammonium sulfate, 0.01 M MgCl <sub>2</sub> , 20 % PEG 8000                  |
| 0.05 M MES pH 6.0, 0.02 M MgCl <sub>2</sub> , 15 % Isopropanol                                       |
| 0.05 M MES pH 6.0, 0.1 M Ammonium acetate, 0.005 M Mg sulfate, 0.6 M NaCl                            |
| 0.05 M MES pH 6.0, 0.1 M KCl, 0.01 M MgCl <sub>2</sub> , 10 % PEG 400                                |
| 0.05 M MES pH 6.0, 0.005 M Mg sulfate, 5 % PEG 4000  |
| 0.05 M Na cacodylate pH 6.0, 0.01 M MgCl <sub>2</sub> , 1 M Li sulfate                               |
| 0.05 M Na cacodylate pH 6.0, 0.01 M Mg sulfate, 1.8 M Li sulfate                                     |
| 0.05 M Na cacodylate pH 6.0, 0.015 M Mg acetate, 1.7 M Ammonium sulfate                              |
| 0.05 M Na cacodylate pH 6.0, 0.1 M KCl, 0.025 M MgCl <sub>2</sub> , 15 % Isopropanol                 |
| 0.05 M Na cacodylate pH 6.0, 0.04 M MgCl <sub>2</sub> , 5 % MPD                                      |
| 0.05 M Na cacodylate pH 6.0, 0.04 M Mg acetate, 30 % MPD   |
| 0.05 M Na cacodylate pH 6.0, 0.2 M KCl, 0.01 M CaCl <sub>2</sub> , 10 % PEG 4000                     |
| 0.05 M Na cacodylate pH 6.5, 0.01 M Mg acetate, 1.3 M Li sulfate                                     |
| 0.05 M Na cacodylate pH 6.5, 0.01 M Mg sulfate, 2 M Ammonium sulfate                                 |
| 0.05 M Na cacodylate pH 6.5, 0.1 M Ammonium acetate, 0.015 M Mg acetate, 10 % Isopropanol            |
| 0.05 M Na cacodylate pH 6.5, 0.2 M KCl, 0.005 M MgCl <sub>2</sub> , 10 % 1,6-Hexanediol              |
| 0.05 M Na cacodylate pH 6.5, 0.08 M Mg acetate, 15 % PEG 400   |
| 0.05 M Na cacodylate pH 6.5, 0.2 M KCl, 0.01 M MgCl <sub>2</sub> , 10 % PEG 4000                     |
| 0.05 M Na cacodylate pH 6.5, 0.2 M Ammonium acetate, 0.01 M CaCl <sub>2</sub> , 10 % PEG 4000        |
| 0.05 M Na cacodylate pH 6.5, 0.08 M Mg acetate, 30 % PEG 4000  |
| 0.05 M Na cacodylate pH 6.5, 0.2 M KCl, 0.1 M Mg acetate, 10 % PEG 8000                              |
| 0.05 M Na cacodylate pH 6.5, 0.2 M Ammonium acetate, 0.01 M Mg acetate, 30 % PEG 8000                |
| 0.05 M HEPES Na salt pH 7.0, 0.05 M Mg sulfate aq., 1.6 M Li sulfate                                 |
| 0.05 M HEPES Na salt pH 7.0, 0.01 M MgCl <sub>2</sub> , 4 M LiCl                                     |
| 0.05 M HEPES Na salt pH 7.0, 0.01 M MgCl <sub>2</sub> , 1.6 M Ammonium sulfate                       |
| 0.05 M HEPES Na salt pH 7.0, 0.005 M MgCl <sub>2</sub> , 25 % PEG MME 550                            |
| 0.05 M HEPES Na salt pH 7.0, 0.2 M KCl, 0.01 M MgCl <sub>2</sub> , 20 % 1,6-Hexanediol               |
| 0.05 M HEPES Na salt pH 7.0, 0.2 M Ammonium chloride, 0.01 M MgCl <sub>2</sub> , 30 % 1,6-Hexanediol |
| 0.05 M HEPES Na salt pH 7.0, 0.1 M KCl, 0.005 M Mg sulfate aq., 15 % MPD                             |
| 0.05 M HEPES Na salt pH 7.0, 0.1 M KCl, 0.01 M MgCl <sub>2</sub> , 5 % PEG 400                       |
| 0.05 M HEPES Na salt pH 7.0, 0.1 M KCl, 0.01 M CaCl <sub>2</sub> , 10 % PEG 400                      |
| 0.05 M HEPES Na salt pH 7.0, 0.2 M KCl, 0.025 M Mg sulfate aq., 20 % PEG 200                         |
| 0.05 M HEPES Na salt pH 7.0, 0.2 M Ammonium acetate, 0.15 M Mg acetate, 5 % PEG 4000                 |
| 0.05 M HEPES Na salt pH 7.0, 0.1 M Ammonium acetate, 0.02 M MgCl <sub>2</sub> , 5 % PEG 8000         |
| 0.05 M TRIS.HCl pH 7.5, 0.01 M MgCl <sub>2</sub> , 1.6 M Ammonium sulfate                            |
| 0.05 M TRIS.HCl pH 7.5, 0.1 M KCl, 0.015 M MgCl <sub>2</sub> , 10 % PEG MME 550                      |
| 0.05 M TRIS.HCl pH 7.5, 0.01 M Mg acetate, 5 % Isopropanol   |
| 0.05 M TRIS.HCl pH 7.5, 0.05 M Ammonium acetate, 0.01 M MgCl <sub>2</sub> , 10 % MPD                 |
| 0.05 M TRIS.HCl pH 7.5, 0.2 M KCl, 0.05 M MgCl <sub>2</sub> , 10 % PEG 4000                          |
| 0.05 M TRIS.HCl pH 8.5, 0.025 M Mg sulfate aq., 1.8 M Ammonium sulfate                               |
| 0.05 M TRIS.HCl pH 8.5, 0.005 M Mg sulfate aq., 35 % 1,6-Hexanediol                                  |
| 0.05 M TRIS.HCl pH 8.5, 0.1 M KCl, 0.01 M MgCl <sub>2</sub> , 30 % PEG 400                           |
| 0.05 M TRIS.HCl pH 8.5, 0.2 M Ammonium chloride, 0.01 M CaCl <sub>2</sub> , 30 % PEG 4000            |

## Kristallisationsbedingungen PEG

|  |
|--|
| 0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 40 % (v/v) PEG 200      |
| 0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 30 % (v/v) PEG 300      |
| 0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 30 % (v/v) PEG 400      |
| 0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 25 % (v/v) PEG 550 MME  |
| 0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 25 % (w/v) PEG 1000     |
| 0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 25 % (w/v) PEG 2000 MME |
| 0.1 M MES pH 6.5, 40 % (v/v) PEG 200                 |
| 0.1 M MES pH 6.5, 30 % (v/v) PEG 300                 |
| 0.1 M MES pH 6.5, 30 % (v/v) PEG 400                 |
| 0.1 M MES pH 6.5, 25 % (v/v) PEG 550 MME             |
| 0.1 M MES pH 6.5, 25 % (w/v) PEG 1000                |
| 0.1 M MES pH 6.5, 25 % (w/v) PEG 2000 MME            |
| 0.1 M HEPES pH 7.5, 40 % (v/v) PEG 200               |
| 0.1 M HEPES pH 7.5, 30 % (v/v) PEG 300               |
| 0.1 M HEPES pH 7.5, 30 % (v/v) PEG 400               |
| 0.1 M HEPES pH 7.5, 25 % (v/v) PEG 550 MME           |
| 0.1 M HEPES pH 7.5, 25 % (w/v) PEG 1000              |

## Kristallisationsbedingungen PEG

|   |
|---|
| 0.1 M HEPES pH 7.5, 25 % (w/v) PEG 2000 MME       |
| 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 40 % (v/v) PEG 200         |
| 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 30 % (v/v) PEG 300         |
| 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 30 % (v/v) PEG 400         |
| 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 25 % (v/v) PEG 550 MME     |
| 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 25 % (w/v) PEG 1000        |
| 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 25 % (w/v) PEG 2000 MME    |
| 0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 25 % (w/v) PEG 3000  |
| 0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 25 % (w/v) PEG 4000  |
| 0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 25 % (w/v) PEG 6000  |
| 0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 25 % (w/v) PEG 8000  |
| 0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 20 % (w/v) PEG 10000 |
| 0.1 M Sodium acetate pH 4.6, 15 % (w/v) PEG 20000 |
| 0.1 M MES pH 6.5, 25 % (w/v) PEG 3000             |
| 0.1 M MES pH 6.5, 25 % (w/v) PEG 4000             |
| 0.1 M MES pH 6.5, 25 % (w/v) PEG 6000             |
| 0.1 M MES pH 6.5, 25 % (w/v) PEG 8000             |
| 0.1 M MES pH 6.5, 20 % (w/v) PEG 10000            |
| 0.1 M MES pH 6.5, 15 % (w/v) PEG 20000            |
| 0.1 M HEPES pH 7.5, 25 % (w/v) PEG 3000           |
| 0.1 M HEPES pH 7.5, 25 % (w/v) PEG 4000           |
| 0.1 M HEPES pH 7.5, 25 % (w/v) PEG 6000           |
| 0.1 M HEPES pH 7.5, 25 % (w/v) PEG 8000           |
| 0.1 M HEPES pH 7.5, 20 % (w/v) PEG 10000          |
| 0.1 M HEPES pH 7.5, 15 % (w/v) PEG 20000          |
| 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 25 % (w/v) PEG 3000        |
| 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 25 % (w/v) PEG 4000        |
| 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 25 % (w/v) PEG 6000        |
| 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 25 % (w/v) PEG 8000        |
| 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 20 % (w/v) PEG 10000       |
| 0.1 M Tris.HCl pH 8.5, 15 % (w/v) PEG 20000       |

## Kristallisationsbedingungen Sparse Matrix II

|   |                                    |                                    |
|---|------------------------------------|------------------------------------|
| 5 % (w/v) PEG 3,000                         | 0.1 M Mes, pH=6                    | 30 % (v/v) Polyethylene glycol 200 |
| 0.1 M Na chloride                           | 0.1 M Na Acetate, pH=4.5           | 30 % (v/v) Polyethylene glycol 200 |
| 0.05 M Lithium sulfate monohydrate          | 0.1 M Tris, pH=7                   | 50 % (v/v) Polyethylene glycol 200 |
| 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate        | 0.1 M Na Cacodylate, pH=6.5        | 50 % (v/v) Polyethylene glycol 200 |
| 0.2 M Zinc acetate dihydrate                | 0.1 M Na Cacodylate, pH=6.5        | 50 % (v/v) Polyethylene glycol 200 |
| 0.2 M Na chloride                           | 0.1 M Na Phosphate-Citrate, pH=4.2 | 50 % (v/v) Polyethylene glycol 200 |
| 0.2 M Na chloride                           | 0.1 M Na/K Phosphate, pH=6.2       | 50 % (v/v) Polyethylene glycol 200 |
|   | 0.1 M HEPES, pH=7.5                | 50 % (v/v) Polyethylene glycol 200 |
|   | 0.1 M CHES, pH=9.5                 | 50 % (v/v) Polyethylene glycol 200 |
|   | 0.1 M Tris, pH=7                   | 50 % (v/v) Polyethylene glycol 200 |
|   | 0.1 M Na Citrate, pH=5.5           | 50 % (v/v) Polyethylene glycol 200 |
| 10 % (v/v) Glycerol, 1 M Ammonium sulfate   | 0.1 M Imidazole, pH=8              | 20 % (v/v) Polyethylene glycol 300 |
| 10 % (v/v) Glycerol, 0.2 M Ammonium sulfate | 0.1 M Na Phosphate-Citrate, pH=4.2 | 20 % (v/v) Polyethylene glycol 300 |
| 10 % (v/v) Glycerol, 5 % (w/v) PEG 8,000    | 0.1 M Tris, pH=8.5                 | 20 % (v/v) Polyethylene glycol 300 |
| 0.2 M Calcium acetate hydrate               | 0.1 M Na Cacodylate, pH=6.5        | 40 % (v/v) Polyethylene glycol 300 |
| 0.2 M Sodium chloride                       | 0.1 M CHES, pH=9.5                 | 40 % (v/v) Polyethylene glycol 300 |
| 0.2 M Sodium citrate dihydrate              | 0.1 M CHES, pH=9.5                 | 40 % (v/v) Polyethylene glycol 300 |
| 5 % (w/v) PEG 1,000                         | 0.1 M Tris, pH=7                   | 40 % (v/v) Polyethylene glycol 300 |
| 0.2 M Na chloride                           | 0.1 M HEPES, pH=7.5                | 40 % (v/v) Polyethylene glycol 300 |
| 0.2 M Na chloride                           | 0.1 M Na Acetate, pH=4.5           | 40 % (v/v) Polyethylene glycol 300 |
| 0.2 M Zinc acetate                          | 0.1 M Imidazole, pH=8              | 40 % (v/v) Polyethylene glycol 300 |
|   | 0.1 M Na Phosphate-Citrate, pH=4.2 | 40 % (v/v) Polyethylene glycol 300 |
| 0.5 M Ammonium sulfate, 10 % (v/v) Glycerol | 0.1 M CAPS, pH=10.5                | 30 % (v/v) Polyethylene glycol 400 |
| 10 % (v/v) Glycerol, 5 % (w/v) PEG 3,000    | 0.1 M HEPES, pH=7.5                | 30 % (v/v) Polyethylene glycol 400 |
| 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate        | 0.1 M Na Citrate, pH=5.5           | 40 % (v/v) Polyethylene glycol 400 |
| 0.2 M Calcium acetate                       | 0.1 M HEPES, pH=7.5                | 40 % (v/v) Polyethylene glycol 400 |
| 0.2 M Lithium sulfate                       | 0.1 M Tris, pH=8.5                 | 40 % (v/v) Polyethylene glycol 400 |
| 5 % (w/v) PEG 3,000                         | 0.1 M Mes, pH=6                    | 40 % (v/v) Polyethylene glycol 400 |
| 0.2 M Na chloride                           | 0.1 M Na/K Phosphate, pH=6.2       | 40 % (v/v) Polyethylene glycol 400 |
|   | 0.1 M Imidazole, pH=8              | 40 % (v/v) Polyethylene glycol 400 |
|   | 0.1 M Na Acetate, pH=4.5           | 40 % (v/v) Polyethylene glycol 400 |
| 0.2 M Sodium chloride                       | 0.1 M CHES, pH=9.5                 | 50 % (v/v) Polyethylene glycol 400 |
| 0.2 M Lithium sulfate                       | 0.1 M Na Acetate, pH=4.5           | 50 % (v/v) Polyethylene glycol 400 |
|   | 0.1 M Mes, pH=6                    | 50 % (v/v) Polyethylene glycol 400 |
| 0.5 M Ammonium sulfate, 10 % (v/v) Glycerol | 0.1 M Tris, pH=7                   | 30 % (v/v) Polyethylene glycol 600 |
| 1 M Sodium chloride, 10 % (v/v) Glycerol    | 0.1 M Na Cacodylate, pH=6.5        | 30 % (v/v) Polyethylene glycol 600 |
| 10 % (v/v) Glycerol, 0.05 M Lithium sulfate | 0.1 M HEPES, pH=7.5                | 30 % (v/v) Polyethylene glycol 600 |
| 5 % (w/v) PEG 1,000, 10 % (v/v) Glycerol    | 0.1 M Mes, pH=6                    | 30 % (v/v) Polyethylene glycol 600 |
| 0.2 M Calcium acetate hydrate               | 0.1 M Na Cacodylate, pH=6.5        | 40 % (v/v) Polyethylene glycol 600 |
| 0.2 M Magnesium chloride                    | 0.1 M Na Acetate, pH=4.5           | 40 % (v/v) Polyethylene glycol 600 |
| 0.2 M Zinc acetate                          | 0.1 M Imidazole, pH=8              | 40 % (v/v) Polyethylene glycol 600 |
|   | 0.1 M CHES, pH=9.5                 | 40 % (v/v) Polyethylene glycol 600 |
|   | 0.1 M Na Citrate, pH=5.5           | 40 % (v/v) Polyethylene glycol 600 |
|   | 0.1 M Na Phosphate-Citrate, pH=4.2 | 40 % (v/v) Polyethylene glycol 600 |
| 10 % (v/v) Glycerol, 0.2 M Zinc acetate     | 0.1 M Imidazole, pH=8              | 25 % (v/v) 1,2-Propanediol         |
| 0.05 M Calcium acetate                      | 0.1 M Na Acetate, pH=4.5           | 40 % (v/v) 1,2-Propanediol         |
| 0.2 M Na citrate                            | 0.1 M CHES, pH=9.5                 | 40 % (v/v) 1,2-Propanediol         |
|   | 0.1 M HEPES, pH=7.5                | 40 % (v/v) 1,2-Propanediol         |

Kristallisationsbedingungen Sparse Matrix II

|   |                                     |                                       |
|---|-------------------------------------|---------------------------------------|
| 10 % (v/v) Glycerol, 0.2 M Ammonium sulfate   | 25 % (v/v) 1,2-Propanediol          | 0.1 M Tris, pH=7                      |
| 10 % (v/v) Glycerol, 0.2 M Magnesium chloride | 25 % (v/v) 1,2-Propanediol          | 0.1 M Tris, pH=8.5                    |
| 10 % (v/v) Glycerol, 5 % (w/v) PEG 3,000      | 25 % (v/v) 1,2-Propanediol          | 0.1 M Na Phosphate-Citrate, pH=4.2    |
| 10 % (v/v) Glycerol                           | 25 % (v/v) 1,2-Propanediol          | 0.1 M Na/K Phosphate, pH=6.2          |
| 20 % (v/v) MPD                                | 30 % (v/v) 1,2-Propanediol          | 0.1 M Na Citrate, pH=5.5              |
| 20 % (v/v) PEG 400                            | 30 % (v/v) 1,2-Propanediol          | 0.1 M HEPES, pH=7.5                   |
| 0.2 M Na chloride                             | 40 % (v/v) 1,2-Propanediol          | 0.1 M Na Citrate, pH=5.5              |
|   | 40 % (v/v) 1,2-Propanediol          | 0.1 M Na Acetate, pH=4.5              |
| 0.2 M Ammonium sulfate                        | 35 % (v/v) 2-Methyl-2,4-pentanediol | 0.1 M Tris, pH=8.5                    |
| 10 % (v/v) Glycerol                           | 35 % (v/v) 2-Methyl-2,4-pentanediol | 0.1 M Na Acetate, pH=4.5 <sup>5</sup> |
| 0.05 M Zinc acetate dihydrate                 | 35 % (v/v) 2-Methyl-2,4-pentanediol | 0.1 M Na Cacodylate, pH=6.5           |
| 0.2 M Magnesium chloride                      | 40 % (v/v) 2-Methyl-2,4-pentanediol | 0.1 M Imidazole, pH=8                 |
| 5 % (w/v) PEG 8,000                           | 40 % (v/v) 2-Methyl-2,4-pentanediol | 0.1 M Na Cacodylate, pH=6.5           |
|   | 40 % (v/v) 2-Methyl-2,4-pentanediol | 0.1 M CAPS, pH=10.5                   |
|   | 40 % (v/v) 2-Methyl-2,4-pentanediol | 0.1 M CHES, pH=9.5                    |
|   | 40 % (v/v) 2-Methyl-2,4-pentanediol | 0.1 M Na Citrate, pH=5.5              |
|   | 40 % (v/v) 2-Methyl-2,4-pentanediol | 0.1 M Na Phosphate-Citrate, pH=4.2    |
| 0.2 M Ammonium sulfate                        | 40 % (v/v) 2-Methyl-2,4-pentanediol | 0.1 M Tris, pH=7                      |
| 0.05 M Magnesium chloride                     | 40 % (v/v) Ethanol                  | 0.1 M Tris, pH=8.5                    |
| 5 % (w/v) PEG 1,000                           | 40 % (v/v) Ethanol                  | 0.1 M Na Phosphate-Citrate, pH=4.2    |
|   | 40 % (v/v) Ethanol                  | 0.1 M Tris, pH=7                      |
| 0.05 M Calcium acetate                        | 35 % (v/v) Ethoxyethanol            | 0.1 M Imidazole, pH=8                 |
| 0.2 M Lithium sulfate                         | 35 % (v/v) Ethoxyethanol            | 0.1 M Tris, pH=8.5                    |
| 0.2 M Na chloride                             | 35 % (v/v) Ethoxyethanol            | 0.1 M Na/K Phosphate, pH=6.2          |
|   | 35 % (v/v) Ethoxyethanol            | 0.1 M Na Cacodylate, pH=6.5           |
|   | 35 % (v/v) Ethoxyethanol            | 0.1 M Na Citrate, pH=5.5              |
| 0.2 M Ammonium sulfate                        | 40 % (v/v) Ethylene glycol          | 0.1 M Na Phosphate-Citrate, pH=4.2    |
| 0.2 M Calcium acetate                         | 40 % (v/v) Ethylene glycol          | 0.1 M Imidazole, pH=8                 |
| 5 % (w/v) PEG 3,000                           | 40 % (v/v) Ethylene glycol          | 0.1 M HEPES, pH=7.5                   |
| 0.2 M Zinc acetate                            | 40 % (v/v) Ethylene glycol          | 0.1 M Mes, pH=6                       |
|   | 40 % (v/v) Ethylene glycol          | 0.1 M Na Acetate, pH=4.5              |
|   | 40 % (v/v) Ethylene glycol          | 0.1 M Tris, pH=7                      |
|   | 40 % (v/v) Ethylene glycol          | 0.1 M Na/K Phosphate, pH=6.2          |
| 0.2 M Lithium sulfate                         | 50 % (v/v) Ethylene glycol          | 0.1 M HEPES, pH=7.5                   |
| 0.2 M Magnesium chloride                      | 50 % (v/v) Ethylene glycol          | 0.1 M Tris, pH=8.5                    |
| 5 % (w/v) PEG 1,000                           | 50 % (v/v) Ethylene glycol          | 0.1 M Na Acetate, pH=4.5              |
|   | 50 % (v/v) Ethylene glycol          | 0.1 M Imidazole, pH=8                 |
| 0.5 M Potassium sodium tartrate Tetrahydrate  | 50 % (v/v) Ethylene glycol          | 0.1 M CHES, pH=9.5                    |
| 0.2 M Calcium acetate hydrate                 | 45 % (v/v) Glycerol                 | 0.1 M Na Cacodylate, pH=6.5           |
|   | 45 % (v/v) Glycerol                 | 0.1 M Imidazole, pH=8                 |
| 5 % (w/v) PEG 1,000                           | 35 % (v/v) Isopropanol              | 0.1 M Na Citrate, pH=5.5              |
| 0.2 M Zinc acetate                            | 35 % (v/v) Isopropanol              | 0.1 M Imidazole, pH=8                 |
|   | 35 % (v/v) Isopropanol              | 0.1 M Tris, pH=8.5                    |
|   | 35 % (v/v) Isopropanol              | 0.1 M Na Acetate, pH=4.5              |
|   | 35 % (v/v) Isopropanol              | 0.1 M Na Phosphate-Citrate, pH=4.2    |
| 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate          | 35 % (v/v) Isopropanol              | 0.1 M Na Cacodylate, pH=6.5           |
| 0.2 M Ammonium sulfate                        | 30 % (v/v) Polyethylene glycol 200  | 0.1 M CAPS, pH=10.5                   |
| 0.2 M Di-ammonium phosphate                   | 30 % (v/v) Polyethylene glycol 200  | 0.1 M Tris, pH=8.5                    |



# Anhang C

## DFT-Kalkulationen

Skript für die Geometrieoptimierung der Modellverbindung:

```
\%chk=Pnucdps3.chk  
\%nproc=4  
\#b3lyp/6-31g(d) Opt=ModRedundant
```

NMR Test w/o Pnucdps3

```
-2 1  
C  
O          1          B1  
H          1          B2    2          A1  
H          1          B3    2          A2    3          D1  
H          1          B4    2          A3    4          D2  
P          2          B5    1          A4    5          D3  
O          6          B6    2          A5    1          D4  
O          6          B7    2          A6    1          D5  
O          6          B8    2          A7    1          D6  
C          9          B9    6          A8    2          D7  
C          10         B10   9          A9    6          D8  
O          11         B11  10         A10   9          D9  
C          11         B12  10         A11   9          D10  
O          13         B13  11         A12  10         D11  
C          13         B14  11         A13  10         D12  
O          15         B15  13         A14  11         D13  
C          12         B16  11         A15  10         D14  
N          17         B17  12         A16  11         D15  
C          18         B18  17         A17  12         D16  
C          18         B19  17         A18  12         D17  
H          10         B20   9          A19   6          D18
```

|   |    |     |    |     |    |     |
|---|----|-----|----|-----|----|-----|
| H | 10 | B21 | 9  | A20 | 6  | D19 |
| H | 11 | B22 | 10 | A21 | 9  | D20 |
| H | 13 | B23 | 11 | A22 | 10 | D21 |
| H | 15 | B24 | 13 | A23 | 11 | D22 |
| H | 16 | B25 | 15 | A24 | 13 | D23 |
| H | 17 | B26 | 12 | A25 | 11 | D24 |
| H | 19 | B27 | 18 | A26 | 17 | D25 |
| H | 19 | B28 | 18 | A27 | 17 | D26 |
| H | 19 | B29 | 18 | A28 | 17 | D27 |
| H | 20 | B30 | 18 | A29 | 17 | D28 |
| H | 20 | B31 | 18 | A30 | 17 | D29 |
| H | 20 | B32 | 18 | A31 | 17 | D30 |
| P | 14 | B33 | 13 | A32 | 11 | D31 |
| O | 34 | B34 | 14 | A33 | 13 | D32 |
| O | 34 | B35 | 14 | A34 | 13 | D33 |
| O | 34 | B36 | 14 | A35 | 13 | D34 |
| C | 37 | B37 | 34 | A36 | 14 | D35 |
| H | 38 | B38 | 37 | A37 | 34 | D36 |
| H | 38 | B39 | 37 | A38 | 34 | D37 |
| H | 38 | B40 | 37 | A39 | 34 | D38 |

|     |            |
|-----|------------|
| B1  | 1.41961579 |
| B2  | 1.08977888 |
| B3  | 1.08984678 |
| B4  | 1.08977291 |
| B5  | 1.60338423 |
| B6  | 1.48539355 |
| B7  | 1.47612296 |
| B8  | 1.60686091 |
| B9  | 1.43308130 |
| B10 | 1.50526941 |
| B11 | 1.42864761 |
| B12 | 1.51377310 |
| B13 | 1.42380441 |
| B14 | 1.50121318 |
| B15 | 1.43348840 |
| B16 | 1.44016874 |
| B17 | 1.48553324 |
| B18 | 1.48025876 |
| B19 | 1.48014932 |
| B20 | 1.09016742 |
| B21 | 1.09025135 |
| B22 | 1.08973483 |

|     |              |
|-----|--------------|
| B23 | 1.08994541   |
| B24 | 1.08963113   |
| B25 | 1.02957710   |
| B26 | 1.09018393   |
| B27 | 1.09023346   |
| B28 | 1.09032747   |
| B29 | 1.08973254   |
| B30 | 1.09030913   |
| B31 | 1.08969124   |
| B32 | 1.08976419   |
| B33 | 1.60854344   |
| B34 | 1.47829023   |
| B35 | 1.48331285   |
| B36 | 1.57720924   |
| B37 | 1.38232558   |
| B38 | 1.08944986   |
| B39 | 1.09004082   |
| B40 | 1.08995092   |
| A1  | 109.52331249 |
| A2  | 109.47572866 |
| A3  | 109.47058117 |
| A4  | 124.20172481 |
| A5  | 110.57589534 |
| A6  | 106.06540374 |
| A7  | 104.42338658 |
| A8  | 122.23160254 |
| A9  | 110.60183137 |
| A10 | 112.01312377 |
| A11 | 109.90173249 |
| A12 | 110.11193154 |
| A13 | 102.18254283 |
| A14 | 112.28621913 |
| A15 | 107.87696250 |
| A16 | 113.97661098 |
| A17 | 109.52633123 |
| A18 | 109.48711336 |
| A19 | 110.62124864 |
| A20 | 110.59443667 |
| A21 | 109.88812354 |
| A22 | 111.31553889 |
| A23 | 112.09985484 |
| A24 | 109.47075632 |
| A25 | 108.35564701 |

|     |               |
|-----|---------------|
| A26 | 109.51379541  |
| A27 | 109.47754910  |
| A28 | 109.48929091  |
| A29 | 109.44478375  |
| A30 | 109.49905784  |
| A31 | 109.51296150  |
| A32 | 119.62276206  |
| A33 | 111.76254802  |
| A34 | 108.18800011  |
| A35 | 95.49293049   |
| A36 | 124.82479900  |
| A37 | 108.89777451  |
| A38 | 108.89927849  |
| A39 | 108.93908667  |
| D1  | 120.00695788  |
| D2  | 120.01000483  |
| D3  | 60.00414929   |
| D4  | 39.96268547   |
| D5  | 171.90961861  |
| D6  | -76.21826793  |
| D7  | -69.74942689  |
| D8  | 168.89578757  |
| D9  | -57.74195050  |
| D10 | 57.28036340   |
| D11 | 73.43707893   |
| D12 | -162.07628221 |
| D13 | -75.23240269  |
| D14 | 142.73972851  |
| D15 | -122.15982962 |
| D16 | -21.24242033  |
| D17 | 98.78005123   |
| D18 | 48.91910189   |
| D19 | -71.13162046  |
| D20 | 177.28021550  |
| D21 | -42.09926553  |
| D22 | 161.14949124  |
| D23 | -125.11960108 |
| D24 | 117.85332133  |
| D25 | 179.99539790  |
| D26 | -59.99612687  |
| D27 | 59.98798991   |
| D28 | 179.99306314  |
| D29 | -60.06579946  |

|     |               |
|-----|---------------|
| D30 | 60.03236835   |
| D31 | -157.25783959 |
| D32 | 33.38992503   |
| D33 | 167.90089078  |
| D34 | -81.67370197  |
| D35 | 157.51990551  |
| D36 | -173.94357736 |
| D37 | 66.09141079   |
| D38 | -53.93388718  |

```
D 25 15 16 26 40.0 F
D 1 2 6 9 -76.22 F
D 2 6 9 10 -69.75 F
D 6 9 10 11 168.9 F
D 9 10 11 13 57.28 F
D 11 13 14 34 -157.26 F
D 13 14 34 37 -81.67 F
D 14 34 37 38 157.52 F
```

--Link1--

```
\%chk=Pnucdps3.chk
\%nproc=4
\#b3lyp/6-31g(d) geom=check
```

NMR Test

-2 1

Skript für die Berechnung der NMR-Parameter:

```
\%chk=DFTP1Nuc0.chk
\%rwf=/scratch/nmrtestwo-71.rwf,2000MB,/scratch/nmrtestwo-72.rwf,2000MB,/scratch/nmrtestwo-73.r
\%nproc=4
\#b3lyp/6-311g(2df,2pd) geom=check nmr=spinspin
```

NMR Test

-2 1

Tabelle C.1: DFT-Berechnungen der  ${}^3J_{\text{H}^2\text{OH}}$ - und  ${}^2J_{\text{H}^2\text{OH}}$ -Kopplungen bei unterschiedlichen Dihedralwinkeln (H2'-C2'-O2'-2'OH) mit dem Basis-satz b3lyp/6-311g(2df, 2pd).

| Dihedralwinkel                   | 0     | 20    | 40    | 60    | 100   | 120   | 140   | 160   | 180   | 200   | 220   | 240   | 260   | 280   | 320   | 340   | 360   |
|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $J_{\text{C}1',2'\text{OH}}$     | 2,21  | 6,61  | 10,73 | 12,42 | 7,41  | 3,02  | -0,44 | -1,18 | 0,5   | 2,87  | 4,43  | 4,62  | 3,77  | 2,37  | -0,85 | -0,58 | 2,21  |
| $J_{\text{C}2',2'\text{OH}}$     | -2,61 | -2,95 | -3,28 | -3,22 | -2,94 | -2,94 | -2,98 | -3,08 | -3,13 | -3,07 | -2,9  | -2,76 | -2,74 | -2,79 | -2,7  | -2,56 | -2,61 |
| $J_{\text{C}3',2'\text{OH}}$     | 1,53  | -0,15 | -0,33 | 0,56  | 3,53  | 4,39  | 4,21  | 2,95  | 1,21  | -0,15 | -0,35 | 1,07  | 3,62  | 5,89  | 6,2   | 4,08  | 1,53  |
| $J_{\text{H}2',2'\text{OH}}$     | 8,82  | 7,59  | 4,63  | 1,69  | -0,09 | 2,62  | 7,46  | 12,04 | 13,73 | 12,14 | 8,39  | 3,56  | 0,09  | -0,46 | 4,64  | 7,59  | 8,82  |
| $J_{\text{C}1',2'\text{OH}}$ FC  | 2,26  | 6,65  | 10,73 | 12,41 | 7,5   | 3,16  | -0,27 | -1    | 0,64  | 2,97  | 4,5   | 4,68  | 3,79  | 2,34  | -0,85 | -0,54 | 2,26  |
| $J_{\text{C}2',2'\text{OH}}$ FC  | -2,59 | -3,01 | -3,46 | -3,5  | -3,34 | -3,27 | -3,25 | -3,34 | -3,42 | -3,4  | -3,29 | -3,17 | -3,13 | -3,09 | -2,74 | -2,53 | -2,59 |
| $J_{\text{C}3',2'\text{OH}}$ FC  | 1,52  | -0,18 | -0,37 | 0,52  | 3,5   | 4,36  | 4,24  | 3,02  | 1,27  | -0,12 | -0,35 | 1,07  | 3,63  | 5,93  | 6,24  | 4,11  | 1,52  |
| $J_{\text{H}2',2'\text{OH}}$ FC  | 8,02  | 6,84  | 4,04  | 1,37  | -0,01 | 2,78  | 7,64  | 12,23 | 13,92 | 12,34 | 8,59  | 3,76  | 0,23  | -0,45 | 4,16  | 6,89  | 8,02  |
| $J_{\text{C}1',2'\text{OH}}$ SD  | 0,02  | 0,03  | 0,05  | 0,05  | 0,01  | -0,02 | -0,03 | -0,05 | -0,05 | -0,05 | -0,07 | -0,1  | -0,09 | -0,05 | 0,01  | 0,01  | 0,02  |
| $J_{\text{C}2',2'\text{OH}}$ SD  | -0,01 | -0,01 | 0,01  | 0,04  | 0,05  | 0,04  | 0,03  | 0,03  | 0,04  | 0,04  | 0,05  | 0,06  | 0,06  | 0,04  | -0,01 | -0,01 | -0,01 |
| $J_{\text{C}3',2'\text{OH}}$ SD  | 0,03  | 0,01  | -0,03 | -0,06 | -0,07 | -0,06 | -0,08 | -0,09 | -0,07 | -0,03 | 0,01  | 0,03  | 0,03  | 0,03  | 0,05  | 0,04  | 0,03  |
| $J_{\text{H}2',2'\text{OH}}$ SD  | 0,38  | 0,33  | 0,22  | 0,08  | -0,06 | -0,04 | 0,01  | 0,05  | 0,06  | 0,06  | 0,02  | -0,03 | -0,06 | -0,04 | 0,2   | 0,33  | 0,38  |
| $J_{\text{C}1',2'\text{OH}}$ PSO | 0,24  | 0,34  | 0,38  | 0,39  | 0,25  | 0,11  | -0,04 | -0,21 | -0,39 | -0,55 | -0,63 | -0,59 | -0,48 | -0,33 | -0,04 | 0,11  | 0,24  |
| $J_{\text{C}2',2'\text{OH}}$ PSO | 0,14  | 0,14  | 0,12  | 0,15  | 0,27  | 0,27  | 0,31  | 0,34  | 0,36  | 0,39  | 0,47  | 0,53  | 0,51  | 0,42  | 0,22  | 0,16  | 0,14  |
| $J_{\text{C}3',2'\text{OH}}$ PSO | 0,21  | 0,06  | -0,14 | -0,3  | -0,61 | -0,68 | -0,66 | -0,54 | -0,37 | -0,18 | 0,01  | 0,19  | 0,31  | 0,37  | 0,37  | 0,31  | 0,21  |
| $J_{\text{H}2',2'\text{OH}}$ PSO | -1,31 | -1,43 | -1,27 | -0,6  | 1,25  | 2,09  | 2,83  | 3,3   | 3,45  | 3,31  | 2,94  | 2,39  | 1,69  | 0,9   | -0,54 | -1,01 | -1,31 |
| $J_{\text{C}1',2'\text{OH}}$ DSO | -0,31 | -0,4  | -0,43 | -0,43 | -0,35 | -0,24 | -0,1  | 0,08  | 0,3   | 0,51  | 0,63  | 0,63  | 0,55  | 0,41  | 0,03  | -0,16 | -0,31 |
| $J_{\text{C}2',2'\text{OH}}$ DSO | -0,15 | -0,07 | 0,05  | 0,09  | 0,06  | 0,01  | -0,07 | -0,11 | -0,11 | -0,1  | -0,13 | -0,17 | -0,17 | -0,16 | -0,17 | -0,18 | -0,15 |
| $J_{\text{C}3',2'\text{OH}}$ DSO | -0,24 | -0,03 | 0,21  | 0,4   | 0,72  | 0,77  | 0,7   | 0,55  | 0,37  | 0,19  | -0,02 | -0,21 | -0,36 | -0,45 | -0,46 | -0,38 | -0,24 |
| $J_{\text{H}2',2'\text{OH}}$ DSO | 1,73  | 1,86  | 1,63  | 0,84  | -1,27 | -2,22 | -3,02 | -3,53 | -3,7  | -3,56 | -3,17 | -2,56 | -1,77 | -0,87 | 0,81  | 1,38  | 1,73  |

**Tabelle C.2:** DFT-Berechnungen der  $^3J_{2'OH}$ - und  $^2J_{2'OH}$ -Kopplungen bei unterschiedlichen Dihedralwinkeln (H2'-C2'-O2'-2'OH) mit dem Basis-satz b3lyp/6-31g(d).

| Dihedralwinkel     | 0     | 20    | 40    | 60    | 100   | 120   | 140   | 160   | 180   | 200   | 220   | 240   | 260   | 280   | 320   | 340   | 360   |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $J_{C1',2'OH}$     | 2,32  | 6,11  | 9,53  | 10,97 | 6,96  | 3,03  | -0,3  | -1,17 | 0,37  | 2,87  | 4,57  | 4,64  | 3,48  | 1,84  | -0,95 | -0,33 | 2,32  |
| $J_{C3',2'OH}$     | 1,72  | -0,02 | -0,33 | 0,53  | 3,85  | 4,72  | 4,65  | 3,29  | 1,22  | -0,23 | -0,26 | 1,31  | 3,74  | 5,69  | 5,81  | 4,03  | 1,72  |
| $J_{H2',2'OH}$     | 8,42  | 7,08  | 4,02  | 1,13  | -0,75 | 1,74  | 6,57  | 11,33 | 13,15 | 11,52 | 7,59  | 2,69  | -0,66 | -1,09 | 4,01  | 7,1   | 8,42  |
| $J_{C1',2'OH}$ FC  | 2,43  | 6,23  | 9,62  | 11,05 | 7,11  | 3,19  | -0,14 | -1,06 | 0,41  | 2,81  | 4,47  | 4,54  | 3,37  | 1,72  | -0,96 | -0,27 | 2,43  |
| $J_{C3',2'OH}$ FC  | 1,79  | -0,01 | -0,39 | 0,43  | 3,68  | 4,55  | 4,54  | 3,24  | 1,2   | -0,24 | -0,25 | 1,37  | 3,84  | 5,83  | 5,96  | 4,15  | 1,79  |
| $J_{H2',2'OH}$ FC  | 7,55  | 6,22  | 3,37  | 0,89  | -0,13 | 2,64  | 7,67  | 12,54 | 14,4  | 12,75 | 8,74  | 3,71  | 0,12  | -0,64 | 3,64  | 6,4   | 7,55  |
| $J_{C1',2'OH}$ SD  | 0,01  | 0,02  | 0,04  | 0,04  | 0,01  | -0,02 | -0,04 | -0,05 | -0,05 | -0,05 | -0,07 | -0,1  | -0,08 | -0,05 | -0,01 | 0,01  | 0,01  |
| $J_{C3',2'OH}$ SD  | 0,02  | -0,01 | -0,03 | -0,06 | -0,06 | -0,06 | -0,07 | -0,08 | -0,06 | -0,03 | -0,01 | 0,01  | 0,02  | 0,02  | 0,04  | 0,03  | 0,02  |
| $J_{H2',2'OH}$ SD  | 0,35  | 0,31  | 0,21  | 0,09  | -0,06 | -0,05 | -0,01 | 0,03  | 0,04  | 0,04  | 0,01  | -0,04 | -0,05 | -0,02 | 0,2   | 0,31  | 0,35  |
| $J_{C1',2'OH}$ PSO | 0,18  | 0,26  | 0,29  | 0,3   | 0,19  | 0,09  | -0,03 | -0,16 | -0,3  | -0,41 | -0,46 | -0,43 | -0,35 | -0,24 | -0,03 | 0,08  | 0,18  |
| $J_{C3',2'OH}$ PSO | 0,15  | 0,03  | -0,12 | -0,25 | -0,49 | -0,54 | -0,52 | -0,44 | -0,3  | -0,15 | -0,01 | 0,13  | 0,22  | 0,27  | 0,27  | 0,22  | 0,15  |
| $J_{H2',2'OH}$ PSO | -1,28 | -1,37 | -1,24 | -0,74 | 0,65  | 1,29  | 1,86  | 2,22  | 2,33  | 2,22  | 1,93  | 1,51  | 0,97  | 0,38  | -0,7  | -1,06 | -1,28 |
| $J_{C1',2'OH}$ DSO | -0,3  | -0,4  | -0,42 | -0,42 | -0,34 | -0,23 | -0,1  | 0,09  | 0,31  | 0,51  | 0,63  | 0,63  | 0,55  | 0,42  | 0,04  | -0,15 | -0,3  |
| $J_{C3',2'OH}$ DSO | -0,23 | -0,02 | 0,22  | 0,41  | 0,72  | 0,77  | 0,71  | 0,56  | 0,38  | 0,19  | -0,01 | -0,2  | -0,35 | -0,44 | -0,45 | -0,37 | -0,23 |
| $J_{H2',2'OH}$ DSO | 1,79  | 1,92  | 1,69  | 0,9   | -1,2  | -2,15 | -2,95 | -3,46 | -3,63 | -3,48 | -3,09 | -2,49 | -1,7  | -0,81 | 0,88  | 1,44  | 1,79  |

**Tabelle C.3:** DFT-Berechnungen der  $^3J_{2'OH}$ -Kopplungen des Modellsystems bei einem Dihedralwinkel (H2'-C2'-O2'-2'OH)  $\theta=60^\circ$  mit dem Basissatz b3lyp/6-311g(2df, 2pd).

|                | 2'OH: H-Donator | O2': H-Akzeptor | O2', O4': H-Akzeptor | O2', O4' H-Akzeptor; 2'OH H-Donator |
|----------------|-----------------|-----------------|----------------------|-------------------------------------|
| $J_{C1',2'OH}$ | 11,7            | 11,58           | 10,61                | 10,83                               |
| $J_{C2',2'OH}$ | -1,95           | -3,06           | -2,82                | -1,54                               |
| $J_{C3',2'OH}$ | 0,41            | 0,47            | 0,67                 | 0,42                                |
| $J_{H2',2'OH}$ | 1,43            | 1,85            | 1,64                 | 1,31                                |

**Tabelle C.4:** Simulation der NOEs der 2'OH mit den H1' und H2' mit TRIO; Teil 1.

| theta | NOE      | tau=0,001s | tau= 0,04s | tau=0,05s | tau=0,1s | NOE      | tau=0,001s | tau= 0,04s | tau=0,05s | tau=0,1s |
|-------|----------|------------|------------|-----------|----------|----------|------------|------------|-----------|----------|
| 0     | 2'OH-H1' | 0,110231   | 4,60009    | 5,79126   | 11,8046  | 2'OH-H2' | 1,86705    | 61,364     | 73,036    | 115,272  |
| 10    | 2'OH-H1' | 0,0929624  | 3,95995    | 5,008     | 10,3953  | 2'OH-H2' | 1,82626    | 60,1731    | 71,6652   | 113,452  |
| 20    | 2'OH-H1' | 0,0802415  | 3,47907    | 4,41491   | 9,29432  | 2'OH-H2' | 1,70988    | 56,7717    | 67,7373   | 108,149  |
| 30    | 2'OH-H1' | 0,0716174  | 3,12549    | 3,97387   | 8,43944  | 2'OH-H2' | 1,54102    | 51,7162    | 61,8701   | 100,028  |
| 40    | 2'OH-H1' | 0,0655419  | 2,86661    | 3,64634   | 7,76943  | 2'OH-H2' | 1,34542    | 45,7383    | 54,8898   | 90,0665  |
| 50    | 2'OH-H1' | 0,0618619  | 2,68338    | 3,4101    | 7,25166  | 2'OH-H2' | 1,14621    | 39,4662    | 47,5149   | 79,1678  |
| 60    | 2'OH-H1' | 0,0601398  | 2,58045    | 3,27305   | 6,91746  | 2'OH-H2' | 0,963006   | 33,5513    | 40,5126   | 68,4601  |
| 70    | 2'OH-H1' | 0,060224   | 2,5492     | 3,22507   | 6,75243  | 2'OH-H2' | 0,803464   | 28,272     | 34,2231   | 58,5322  |
| 80    | 2'OH-H1' | 0,0620093  | 2,59488    | 3,27377   | 6,78108  | 2'OH-H2' | 0,670246   | 23,7773    | 28,8389   | 49,7951  |
| 90    | 2'OH-H1' | 0,0658951  | 2,71557    | 3,41662   | 6,99826  | 2'OH-H2' | 0,562785   | 20,0654    | 24,3706   | 42,3644  |
| 100   | 2'OH-H1' | 0,071909   | 2,9352     | 3,68319   | 7,45947  | 2'OH-H2' | 0,474859   | 16,995     | 20,6586   | 36,0599  |
| 110   | 2'OH-H1' | 0,0810352  | 3,26438    | 4,08576   | 8,18127  | 2'OH-H2' | 0,408202   | 14,608     | 17,76     | 31,0305  |
| 120   | 2'OH-H1' | 0,09375    | 3,74165    | 4,67065   | 9,23908  | 2'OH-H2' | 0,355048   | 12,6943    | 15,428    | 26,9189  |
| 130   | 2'OH-H1' | 0,111722   | 4,39977    | 5,47561   | 10,6819  | 2'OH-H2' | 0,315332   | 11,2269    | 13,633    | 23,7035  |
| 140   | 2'OH-H1' | 0,136608   | 5,30579    | 6,58027   | 12,6339  | 2'OH-H2' | 0,284779   | 10,0994    | 12,2523   | 21,2238  |
| 150   | 2'OH-H1' | 0,17155    | 6,56099    | 8,10605   | 15,296   | 2'OH-H2' | 0,263501   | 9,31768    | 11,2955   | 19,5142  |
| 160   | 2'OH-H1' | 0,220077   | 8,29161    | 10,2071   | 18,9434  | 2'OH-H2' | 0,248791   | 8,79805    | 10,665    | 18,43    |
| 170   | 2'OH-H1' | 0,28804    | 10,7189    | 13,1559   | 24,075   | 2'OH-H2' | 0,2405     | 8,53275    | 10,3511   | 17,9496  |
| 180   | 2'OH-H1' | 0,38142    | 14,0738    | 17,237    | 31,2123  | 2'OH-H2' | 0,238128   | 8,49721    | 10,3219   | 18,0061  |
| 190   | 2'OH-H1' | 0,505932   | 18,5562    | 22,6915   | 40,754   | 2'OH-H2' | 0,241056   | 8,65861    | 10,5351   | 18,5089  |

**Tabelle C.5:** Simulation der NOEs der 2'OH mit den H1' und H2' mit TRIO; Teil 2.

| theta | NOE      | tau=0,001s | tau= 0,04s | tau=0,05s | tau=0,1s | NOE      | tau=0,001s | tau= 0,04s | tau=0,05s | tau=0,1s |
|-------|----------|------------|------------|-----------|----------|----------|------------|------------|-----------|----------|
| 200   | 2'OH-H1' | 0,665426   | 24,2615    | 29,6224   | 52,7735  | 2'OH-H2' | 0,249134   | 8,99806    | 10,963    | 19,3774  |
| 210   | 2'OH-H1' | 0,857751   | 31,0289    | 37,8095   | 66,6882  | 2'OH-H2' | 0,263969   | 9,5629     | 11,6603   | 20,6803  |
| 220   | 2'OH-H1' | 1,05768    | 37,9137    | 46,0943   | 80,4085  | 2'OH-H2' | 0,285551   | 10,3431    | 12,6124   | 22,3729  |
| 230   | 2'OH-H1' | 1,22988    | 43,7167    | 53,0381   | 91,5971  | 2'OH-H2' | 0,315109   | 11,3826    | 13,8701   | 24,5202  |
| 240   | 2'OH-H1' | 1,33064    | 47,0629    | 57,0281   | 97,9193  | 2'OH-H2' | 0,354959   | 12,7565    | 15,5251   | 27,2844  |
| 250   | 2'OH-H1' | 1,32656    | 46,9575    | 56,9124   | 97,8222  | 2'OH-H2' | 0,406868   | 14,5336    | 17,661    | 30,8115  |
| 260   | 2'OH-H1' | 1,21862    | 43,4284    | 52,7233   | 91,3505  | 2'OH-H2' | 0,475268   | 16,8721    | 20,4709   | 35,4397  |
| 270   | 2'OH-H1' | 1,04357    | 37,5905    | 45,7573   | 80,2981  | 2'OH-H2' | 0,560878   | 19,8024    | 23,9915   | 41,2322  |
| 280   | 2'OH-H1' | 0,842072   | 30,7079    | 37,4943   | 66,7813  | 2'OH-H2' | 0,67004    | 23,5229    | 28,4571   | 48,5442  |
| 290   | 2'OH-H1' | 0,653787   | 24,128     | 29,5485   | 53,3981  | 2'OH-H2' | 0,804111   | 28,0508    | 33,8796   | 57,3275  |
| 300   | 2'OH-H1' | 0,496107   | 18,5169    | 22,7409   | 41,6613  | 2'OH-H2' | 0,963011   | 33,3313    | 40,1781   | 67,3338  |
| 310   | 2'OH-H1' | 0,374191   | 14,1268    | 17,398    | 32,3012  | 2'OH-H2' | 1,14924    | 39,3881    | 47,3632   | 78,4482  |
| 320   | 2'OH-H1' | 0,282602   | 10,8125    | 13,3587   | 25,169   | 2'OH-H2' | 1,34457    | 45,5815    | 54,663    | 89,3856  |
| 330   | 2'OH-H1' | 0,21661    | 8,42723    | 10,4518   | 20,0295  | 2'OH-H2' | 1,54161    | 51,6694    | 61,7911   | 99,7183  |
| 340   | 2'OH-H1' | 0,168651   | 6,70021    | 8,34838   | 16,3166  | 2'OH-H2' | 1,70758    | 56,6641    | 67,5997   | 107,857  |
| 350   | 2'OH-H1' | 0,134732   | 5,47856    | 6,86149   | 13,6977  | 2'OH-H2' | 1,8246     | 60,1146    | 71,594    | 113,327  |
| 360   | 2'OH-H1' | 0,110372   | 4,60017    | 5,79133   | 11,8046  | 2'OH-H2' | 1,8674     | 61,3641    | 73,0361   | 115,272  |

**Tabelle C.6:** Simulation der NOEs der 2'OH mit den H3' und H4' mit TRIO; Teil 1.

| theta | NOE      | tau=0,001s | tau= 0,04s | tau=0,05s | tau=0,1s | NOE      | tau=0,001s | tau= 0,04s | tau=0,05s | tau=0,1s |
|-------|----------|------------|------------|-----------|----------|----------|------------|------------|-----------|----------|
| 0     | 2'OH-H3' | 0,0369852  | 2,58206    | 3,50708   | 9,10479  | 2'OH-H4' | 0,0488301  | 1,88359    | 2,33347   | 4,47034  |
| 10    | 2'OH-H3' | 0,0369208  | 2,68024    | 3,61993   | 9,25253  | 2'OH-H4' | 0,0516355  | 2,01687    | 2,49497   | 4,74684  |
| 20    | 2'OH-H3' | 0,0447409  | 2,76773    | 3,70863   | 9,28617  | 2'OH-H4' | 0,0586054  | 2,23037    | 2,75405   | 5,19621  |
| 30    | 2'OH-H3' | 0,0462225  | 2,83649    | 3,76654   | 9,20008  | 2'OH-H4' | 0,0666345  | 2,55062    | 3,14412   | 5,882    |
| 40    | 2'OH-H3' | 0,0546322  | 2,91191    | 3,82733   | 9,0818   | 2'OH-H4' | 0,0802607  | 3,01553    | 3,71137   | 6,88974  |
| 50    | 2'OH-H3' | 0,057059   | 2,99267    | 3,89427   | 8,95969  | 2'OH-H4' | 0,0976439  | 3,68231    | 4,52655   | 8,34918  |
| 60    | 2'OH-H3' | 0,0624812  | 3,08754    | 3,98048   | 8,88407  | 2'OH-H4' | 0,123859   | 4,64821    | 5,70829   | 10,4737  |
| 70    | 2'OH-H3' | 0,0676133  | 3,19317    | 4,08372   | 8,86387  | 2'OH-H4' | 0,161996   | 6,05221    | 7,42598   | 13,5613  |
| 80    | 2'OH-H3' | 0,0756299  | 3,29054    | 4,18108   | 8,86678  | 2'OH-H4' | 0,218551   | 8,09091    | 9,91787   | 18,0215  |
| 90    | 2'OH-H3' | 0,0751837  | 3,36566    | 4,25752   | 8,87325  | 2'OH-H4' | 0,299397   | 11,0723    | 13,5552   | 24,4699  |
| 100   | 2'OH-H3' | 0,0810873  | 3,39492    | 4,28063   | 8,81334  | 2'OH-H4' | 0,418409   | 15,3057    | 18,7037   | 33,4582  |
| 110   | 2'OH-H3' | 0,0773897  | 3,38913    | 4,26791   | 8,73731  | 2'OH-H4' | 0,586873   | 21,2886    | 25,9458   | 45,8056  |
| 120   | 2'OH-H3' | 0,0799591  | 3,32501    | 4,18622   | 8,5644   | 2'OH-H4' | 0,815033   | 29,0842    | 35,3191   | 61,2656  |
| 130   | 2'OH-H3' | 0,0750251  | 3,22649    | 4,06837   | 8,36653  | 2'OH-H4' | 1,10297    | 38,6624    | 46,735    | 79,2819  |
| 140   | 2'OH-H3' | 0,0728672  | 3,08514    | 3,89965   | 8,0919   | 2'OH-H4' | 1,40574    | 48,2942    | 58,0969   | 96,3109  |
| 150   | 2'OH-H3' | 0,0709091  | 2,9224     | 3,70566   | 7,77946  | 2'OH-H4' | 1,66829    | 56,3031    | 67,4467   | 109,605  |
| 160   | 2'OH-H3' | 0,067793   | 2,7259     | 3,46802   | 7,37276  | 2'OH-H4' | 1,78445    | 59,6965    | 71,3672   | 114,875  |
| 170   | 2'OH-H3' | 0,0631144  | 2,51828    | 3,21301   | 6,90919  | 2'OH-H4' | 1,7199     | 57,6746    | 68,9929   | 111,369  |
| 180   | 2'OH-H3' | 0,0569782  | 2,29292    | 2,9317    | 6,36493  | 2'OH-H4' | 1,49369    | 50,7001    | 60,8293   | 99,5606  |
| 190   | 2'OH-H3' | 0,0505252  | 2,07897    | 2,66175   | 5,81994  | 2'OH-H4' | 1,19208    | 41,1369    | 49,5546   | 82,6743  |

**Tabelle C.7:** Simulation der NOEs der 2'OH mit den H3' und H4' mit TRIO; Teil 2.

| theta | NOE      | tau=0,001s | tau=0,04s | tau=0,05s | tau=0,1s | NOE      | tau=0,001s | tau=0,04s | tau=0,05s | tau=0,1s |
|-------|----------|------------|-----------|-----------|----------|----------|------------|-----------|-----------|----------|
| 200   | 2'OH-H3' | 0,044647   | 1,87943   | 2,40906   | 5,30005  | 2'OH-H4' | 0,894819   | 31,3647   | 37,9292   | 64,4756  |
| 210   | 2'OH-H3' | 0,0397726  | 1,71761   | 2,20503   | 4,88539  | 2'OH-H4' | 0,649051   | 23,0325   | 27,9399   | 48,2319  |
| 220   | 2'OH-H3' | 0,0341944  | 1,5831    | 2,03795   | 4,56268  | 2'OH-H4' | 0,461622   | 16,5565   | 20,1344   | 35,202   |
| 230   | 2'OH-H3' | 0,0322142  | 1,49087   | 1,92583   | 4,36726  | 2'OH-H4' | 0,330926   | 11,9652   | 14,5837   | 25,7928  |
| 240   | 2'OH-H3' | 0,0293916  | 1,42403   | 1,84829   | 4,26134  | 2'OH-H4' | 0,239465   | 8,74807   | 10,6895   | 19,145   |
| 250   | 2'OH-H3' | 0,0277411  | 1,38853   | 1,81213   | 4,25546  | 2'OH-H4' | 0,177294   | 6,55243   | 8,0299    | 14,5865  |
| 260   | 2'OH-H3' | 0,0259428  | 1,37983   | 1,81197   | 4,34049  | 2'OH-H4' | 0,134436   | 5,03608   | 6,19041   | 11,4093  |
| 270   | 2'OH-H3' | 0,0257536  | 1,39988   | 1,85062   | 4,52664  | 2'OH-H4' | 0,105301   | 3,98462   | 4,91165   | 9,17421  |
| 280   | 2'OH-H3' | 0,0253592  | 1,44821   | 1,928     | 4,81528  | 2'OH-H4' | 0,0850254  | 3,24603   | 4,01009   | 7,57066  |
| 290   | 2'OH-H3' | 0,0253618  | 1,53008   | 2,05175   | 5,22911  | 2'OH-H4' | 0,0708246  | 2,72133   | 3,36738   | 6,40859  |
| 300   | 2'OH-H3' | 0,0257154  | 1,63807   | 2,21085   | 5,73035  | 2'OH-H4' | 0,0609628  | 2,35242   | 2,9141    | 5,57676  |
| 310   | 2'OH-H3' | 0,026535   | 1,78313   | 2,4204    | 6,35739  | 2'OH-H4' | 0,0541553  | 2,09636   | 2,59903   | 4,99454  |
| 320   | 2'OH-H3' | 0,0276609  | 1,94065   | 2,64476   | 7,00067  | 2'OH-H4' | 0,0497233  | 1,92903   | 2,39293   | 4,61146  |
| 330   | 2'OH-H3' | 0,0292825  | 2,11724   | 2,89196   | 7,67443  | 2'OH-H4' | 0,0471919  | 1,83325   | 2,27489   | 4,39119  |
| 340   | 2'OH-H3' | 0,0313217  | 2,28757   | 3,12506   | 8,26942  | 2'OH-H4' | 0,0461722  | 1,79321   | 2,22508   | 4,29413  |
| 350   | 2'OH-H3' | 0,0305815  | 2,44357   | 3,33284   | 8,75737  | 2'OH-H4' | 0,0457965  | 1,80939   | 2,24415   | 4,32097  |
| 360   | 2'OH-H3' | 0,0334099  | 2,58007   | 3,50536   | 9,10397  | 2'OH-H4' | 0,047848   | 1,88305   | 2,333     | 4,47012  |

# Lebenslauf



Jörg Fohrer, geboren am 30.09.1977 in Frankfurt am Main

- seit 2004            Promotion am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie,  
Göttingen, bei Prof. Dr. Christian Griesinger  
unter der Betreuung von PD Dr. Teresa Carlomagno
- 2003 - 2004        Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie,  
Göttingen, bei Prof. Dr. Christian Griesinger  
unter der Betreuung von PD Dr. Teresa Carlomagno  
Thema: Messung und Interpretation von Kopplungen an RNA
- 1998 - 2003        Studium der Chemie,  
Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main  
Nebenfach: Toxikologie
- 1997 - 1998        Zivildienst
- 1997                Allgemeine Hochschulreife  
an der Ziehenschule in Frankfurt am Main

**PUBLIKATIONEN:**

Mirko Hennig, **Jörg Fohrer** und Teresa Carlomagno: *Assignment and NOE Analysis of 2'-Hydroxylprotons in RNA: Implications for Stabilization of RNA A-Form Duplexes*, Journal of the American Chemical Society (2005), **127**, 2028-2029.

**Jörg Fohrer**, Mirko Hennig und Teresa Carlomagno: *Influence of the 2'-Hydroxylgroup Conformation on the Stability of A-Form Helices in RNA*, Journal of Molecular Biology (2006), **356**, 280-287.

**Jörg Fohrer**, Uwe Reinscheid, Mirko Hennig und Teresa Carlomagno: *Calculation of the Dependence of Homo- and Heteronuclear  $^3J$  and  $^2J$  Scalar Couplings for the Determination of the 2'-Hydroxy Conformation in RNA*, Angewandte Chemie International Edition (2006), **45**, 7033-7036.

Mate Erdelyi, Bernhard Pfeiffer, Kurt Hauenstein, **Jörg Fohrer**, Karl-Heinz Altmann und Teresa Carlomagno: *The Conformational Preferences of Natural and C3-modified Epothilones in Aqueous Solution*, Journal of Medicinal Chemistry (2007), *submitted*.

**KONFERENZEN:**

**Jörg Fohrer**, Mirko Hennig und Teresa Carlomagno: *The determination of the conformation of the 2'-hydroxylgroup in RNA*. **17<sup>th</sup> EENC, Lille (Frankreich), 2004**.

**Jörg Fohrer**, Mirko Hennig und Teresa Carlomagno: *The determination of the conformation of the 2'-hydroxylgroup in RNA*. **17<sup>th</sup> EENC, Il Ciocco (Italien), 2004**.

**Jörg Fohrer**, Mirko Hennig und Teresa Carlomagno: *The conformation of the 2'-hydroxylgroup in RNA in solution*. **1. Deutsch-Französischer Kongress in Organischer Chemie, Goslar (Deutschland), 2005**.

**Jörg Fohrer**, Mirko Hennig und Teresa Carlomagno: *The conformation of the 2'-hydroxylgroup in RNA in solution: implications for RNA structure stabilization*. **47<sup>th</sup> ENC, Asilomar (Kalifornien, USA), 2006.**

**Jörg Fohrer**, Melanie Falb, Claudia Schwiegk und Teresa Carlomagno: *NMR Studies of a spliceosome related Lariat forming ribozyme*. **GdCh-Fachgruppentagung NMR, Göttingen (Deutschland), 2007.**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der genannten Literatur und der erwähnten Hilfen angefertigt habe.

Frankfurt, den

(Jörg Fohrer)