

- [10] Die bevorzugte Konformation von **1** in Lösung (D_2O) wurde mit gängigen Methoden ermittelt: a) H. Rosemeyer, F. Seela, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1997**, 2341–2345; b) H. Rosemeyer, G. Todt, B. Golankiewicz, Z. Kazimierczuk, W. Bourgeois, U. Kretschmer, H.-P. Muth, F. Seela, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 5784–5790. Pseudorotationsparameter und Konformationen der C4'-C5'-Bindung von **1** in D_2O : 77 % South, $P_S = 164.7^\circ$, $\phi_S = 32.5^\circ$; 23 % North, $P_N = 19.0^\circ$, $\phi_N = 36.0^\circ$; 83 % $\gamma^{(+)}g$, 8 % γ^l , 8 % $\gamma^{(-)}g$; Sättigung des C8-H-Signals ergibt NOE-Werte von 7.3 % an H1', 2.3 % an H2' und 0.9 % am H3'.
- [11] a) W. Guschlbauer, J. F. Chantot, D. Thiele, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1990**, 8, 491–511; b) A. L. Marlow, E. Mezzina, G. P. Spada, S. Masiero, J. T. Davis, G. Gottarelli, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 5116–5123; c) M. Cai, A. L. Marlow, J. C. Fettinger, D. Fabris, T. J. Haverlock, B. A. Moyer, J. T. Davis, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 1339–1341; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1283–1285.
- [12] a) P. Schultze, N. V. Hud, F. W. Smith, J. Feigon, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 3018–3028; b) C. Kang, X. Zhang, R. Ratliff, R. Moyzis, A. Rich, *Nature* **1992**, 356, 126–131; c) D. R. Goodlett, D. G. Kamp II, C. C. Hardin, M. Corrigan, R. D. Smith, *Biol. Mass Spectrom.* **1993**, 22, 181–183; d) F. Seela, C. Wei, A. Melenewski, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 4940–4945; e) T. C. Marsh, J. Vesenka, E. Henderson, *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23, 696–700.
- [13] a) R. Taylor, O. Kennard, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 5063–5070; b) G. R. Desiraju, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 441–449.
- [14] P. Hobza, V. Špirko, H. L. Selzle, E. W. Schlag, *J. Phys. Chem. A* **1998**, 102, 2501–2504.
- [15] a) M. C. Wahl, M. Sundaralingam, *Trends Biochem. Sci.* **1997**, 22, 97–102; b) I. Berger, M. Egli, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 12116–12121; c) M. Brandl, M. Meyer, J. Sühnel, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2001**, 18, 545–555; d) M. Egli, R. V. Gessner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 180–184.
- [16] F. Seela, C. Wei, H. Reuter, G. Kastner, *Acta Crystallogr. Sect. C* **1999**, 55, 1335–1337.
- [17] a) F. Seela, M. Zulauf, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 1781–1790; b) N. Ramzaeva, C. Mittelbach, F. Seela, *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 1809–1822.
- [18] a) T. Le Dean, L. Perrouault, D. Praseuth, N. Habhou, J. L. Decout, N. T. Thuong, J. Lhomme, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 7749–7760; b) H. E. Moser, P. B. Dervan, *Science* **1987**, 238, 645–650; J. Milligan, S. Krauczyk, S. Wadwani, M. Matteucci, *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 327–333.
- [19] J. Marfurt, C. Leumann, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 184–187; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 175–177.
- [20] G. A. Leonard, K. E. McAuley-Hecht, N. J. Gibson, T. Brown, W. P. Watson, W. N. Hunter, *Biochemistry* **1994**, 33, 4755–4761.
- [21] D. T. Bong, T. D. Clark, J. R. Granja, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 1016–1041; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 988–1011.

RNA-Konformationsgleichgewichte und der Einfluss der Methylierung von Nucleobasen auf die Gleichgewichtslage**

Claudia Höbartner, Marc-Olivier Ebert, Bernhard Jaun und Ronald Micura*

Die konstitutionelle Vielfalt der RNA wird durch mehr als 90 natürlich vorkommende, chemisch modifizierte Nucleoside eindrucksvoll belegt.^[1, 2] Die Aufklärung der Funktion modifizierter Nucleoside in biologischen Prozessen ist Gegenstand intensiver Forschung. Kürzlich wurde z. B. berichtet, dass die Modifikationen bestimmter Nucleoside in einer menschlichen mitochondrialen tRNA^{Lys} für die korrekte Bildung der dreidimensionalen Kleeblattstruktur unverzichtbar sind.^[3] Das entsprechende unmodifizierte In-vitro-Transkript bildete keine Kleeblattstruktur, sondern eine aufgeweitete Haarnadelschleife. Soweit uns bekannt ist, sind dies die ersten und bis jetzt einzigen Studien, die die signifikanten Auswirkungen von Nucleosidmodifikationen auf RNA-Faltungsprozesse mit experimentellen Daten belegen. Diese Ergebnisse veranlassten uns, den Einfluss der Methylierung von Nucleobasen in kurzen palindromen Oligoribonucleotidduplexen systematisch zu untersuchen. Dabei fanden wir, dass der Austausch einzelner Nucleoside durch ihre methylierten Äquivalente wie 1-Methylguanosin (m^1G), N^2,N^2 -Dimethylguanosin (m^2G), N^6,N^6 -Dimethyladenosin (m^6A) oder 3-Methyluridin (m^3U) zur Bildung von Haarnadel-anstelle von Duplexstrukturen führt.^[4] Diese bemerkenswerte Änderung des Sekundärstrukturmotivs bildet die Grundlage für die hier vorgestellten Untersuchungen. Wir berichten über einzelsträngige Oligoribonucleotide, die in zwei unterschiedlichen, miteinander im Gleichgewicht stehenden Konformationen vorliegen. Die Lage des monomolekularen Gleichgewichts wird durch die Methylierung bestimmter Nucleobasen signifikant verschoben.

Das Methylierungsmuster der untersuchten Sequenzen entspricht jenem der natürlich vorkommenden Helix 45 am 3'-Ende der rRNA in der kleinen ribosomalen Untereinheit (Abbildung 1).^[5] Die beiden in der Schleife aufeinanderfolgenden m^6A Nucleotide sind in Bakterien und Eukaryonten beinahe universell konserviert. Diese modifizierten Adenosine sind für die Funktion bedeutsam, jedoch ist der exakte

[*] Dr. R. Micura, DI C. Höbartner

Leopold Franzens Universität, Institut für Organische Chemie
Innrain 52 a, 6020 Innsbruck (Österreich)

Fax: (+43) 512-507-2892

E-mail: ronald.micura@uibk.ac.at

Dipl.-Chem. M.-O. Ebert, Prof. Dr. B. Jaun

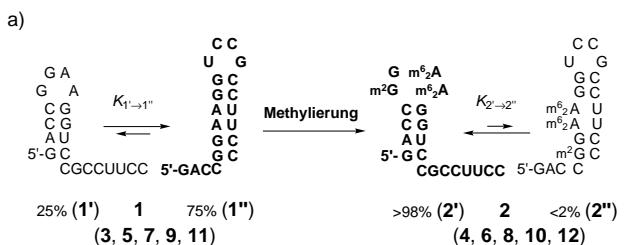
Laboratorium für Organische Chemie

Universitätstrasse 16, 8092 Zürich (Schweiz)

[**] Wir danken dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (P13216-CHE und P15042) für die finanzielle Unterstützung sowie Dr. K. Breuker (Innsbruck) für die massenspektrometrische Analyse und Prof. R. Konrat (Innsbruck) für die Hilfe bei den NMR-Experimenten. R.M. dankt Prof. B. Kräutler (Innsbruck) für seine großzügige Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Grund für ihre Methylierung nicht im Detail verstanden. Zum Vergleich der Konformationen von methylierten und nichtmethylierten Sequenzen diente uns das Helix-45-Methylierungsmuster 5'-...CCm²GAm⁶₂AGG...3' als Leitmotiv (Tabelle 1, Abbildung 2). Für die gezielte Konstruktion der Sequenzen waren zwei Fragestellungen von Bedeutung. Erstens, ist ein komplementärer Sequenzabschnitt 5'-...CCUUC...3' in der Lage, die nichtmethylierte Stamm-Schleifenstruktur 5'-...CCGAAGG...3' aufzubrechen? Und zweitens, wenn ja, wird durch die Methylierung



25% (1') 1 75% (1'') (3, 5, 7, 9, 11)

>98% (2') 2 <2% (2'') (4, 6, 8, 10, 12)

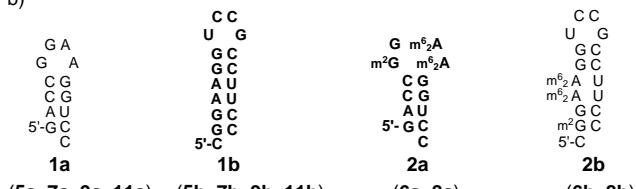


Abbildung 2. a) Allgemeines Konzept zur Untersuchung von monomolekularen RNA-Konformationsgleichgewichten und der Verschiebung des Gleichgewichts durch Methylierung ausgewählter Nukleobasen. Sowohl **1** als auch **2** können prinzipiell in zwei verschiedenen Konformationen (**1'**/**1''** und **2'**/**2''**) vorliegen. b) Die Zuordnung der Konformation erfolgt durch den Vergleich der ¹H-NMR-Spektren mit jenen der entsprechenden Referenzsequenzen (**1a**/**1b** und **2a**/**2b**). Die Gleichgewichtslage ist durch Basenmutationen in der Sequenz beeinflussbar (vgl. Gleichgewichtskonstanten für **3**, **5**, **7**, **9** und **11** in Tabelle 1). Durch Methylierung wird das Gleichgewicht zu einem einzigen Konformer (>98% **2'**) verschoben, welches vorher weniger bevorzugt war.

| B. stearothermophilus | S. cerevisiae | E. coli |
|---------------------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| G m ² A m ² G m ⁶ A | G m ⁶ A U m ⁶ A | G m ⁶ A m ² G m ⁶ A |
| CG CG | GC GC | GC GC |
| AU | AU | AU |
| UG | UG | UG |
| GC | GC | GC |
| CG | CG | CG |
| CG | CG | CG |
| GC | UA | AU |
| AU | UA | AU |
| 5'... GU | GGAUCAACCUCUUCUA _{OH} | 5'... U |
| 5'... U | GGAUCAUUA _{OH} | 5'... U |
| 5'... GU | GGAUCAACCUCUUCUA _{OH} | 5'... U |

Abbildung 1. Ausgewählte Helix-45-Sequenzen am 3'-Ende der rRNA in der kleinen ribosomalen Untereinheit. Die zwei aufeinanderfolgenden m⁶A-Nukleotide in der Schleife sind in den meisten Organismen konservert. Der exakte Grund für ihre Methylierung ist bisher nicht verstanden; N²-Methylguanosin (m²G), N⁶,N⁶-Dimethyladenosin (m⁶A).

Tabelle 1. Methylierte und nichtmethylierte Oligoribonukleotide in Anlehnung an das Helix-45-Sequenzmotiv der kleinen ribosomalen Untereinheit; Schmelztemperaturen T_m , thermodynamische Daten der Doppelhelixbildung abgeleitet aus den Schmelzkurven, Konformationsgleichgewichtskonstanten abgeleitet, aus den ¹H-NMR-NH-Spektren massenspektrometrische Daten.^[a-e]

| No. | Basensequenzen | T_m ^[a] [°C] | Thermodynamische Daten der Doppelhelixbildung ^[a,b] | | | $K_{\text{f},\text{f}''}^{298\text{K-NMR}}$ | $M_{\text{calc.}}$ | $M_{\text{obs.}}$ [amu] | |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------|----------------------------|--------|
| | | | ΔH° [kcal mol ⁻¹] | ΔS° [cal mol ⁻¹ K ⁻¹] | $\Delta G_{298\text{K}}^\circ$ [kcal mol ⁻¹] | | | | |
| 1 | GACCGGAAGGUCCGCCUCC | 78.0 | | | | 3.0 | (25:75) | 6356.8 | 6355.9 |
| 1a | GACCGGAAGGUCC | 77.7 | -54.7 | -157.1 | -7.9 | | | 4178.6 | 4178.1 |
| 1b | CGGAAGGUCCGCCUCC | 73.3 | -55.0 | -160.0 | -7.3 | | | 5377.2 | 5376.3 |
| 2 | GACCM ² GAm ⁶ ₂ AGGUCCGCCUCC | 72.7 | -48.3 | -140.7 | -6.3 | <0.02 | (>98:<2) | 6427.0 | 6426.4 |
| 2a | GACCM ² GAm ⁶ ₂ AGGUCC | 72.7 | -49.8 | -145.1 | -6.5 | | | 4248.7 | 4247.9 |
| 2b | Cm ² GAm ⁶ ₂ AGGUCCGCCUCC | 54.0 | -34.5 | -104.2 | -3.4 | | | 5447.4 | 5445.0 |
| 3 | GACCGGAAGGUCCGCCUCCG | 81.2 | | | | 5.7 | (15:85) | 6702.0 | 6702.1 |
| 4 | GACCM ² GAm ⁶ ₂ AGGUCCGCCUCCG | 72.4 | -41.9 | -122.0 | -5.5 | <0.02 | | 6772.2 | 6771.8 |
| 5 | GACCGGAAGGUCUUCCUCC | 78.2 | | | | 1.2 | (45:55) | 6318.8 | 6318.3 |
| 5a | GACCGGAAGGUCU | 77.9 | -56.4 | -161.4 | -8.3 | | | 4179.6 | 4178.6 |
| 5b | CGGAAGGUCUUCCUCC | 70.5 | -48.0 | -140.8 | -6.0 | | | 5339.2 | 5339.0 |
| 6 | GACCM ² GAm ⁶ ₂ AGGUUUCCUCCUCC | 73.2 | -49.3 | -142.5 | -6.8 | <0.02 | | 6388.9 | 6386.8 |
| 6a | GACCM ² GAm ⁶ ₂ AGGUUCU | 73.2 | -48.8 | -141.1 | -6.7 | | | 4249.7 | 4248.8 |
| 6b | Cm ² GAm ⁶ ₂ AGGUUUCCUCCUCC | 41.6 | -34.7 | -108.4 | -2.4 | | | 5409.3 | 5408.1 |
| 7 | GACCGGAAGGUCE ₃ CCUCC | 70.8 | | | | 1.5 | (40:60) | 6130.7 | 6131.0 |
| 7a | GACCGGAAGGU | 72.4 | -51.3 | -149.3 | -7.1 | | | 3874.1 | 3874.9 |
| 7b | CGGAAGGUCE ₃ CCUCC | 68.2 | -62.4 | -183.3 | -7.7 | | | 5151.1 | 5152.0 |
| 8 | GACCM ² GAm ⁶ ₂ AGGUUCE ₃ CCUCC | 67.5 | -50.9 | -149.2 | -6.4 | <0.02 | | 6200.9 | 6200.6 |
| 8a | GACCM ² GAm ⁶ ₂ AGGUC | 64.9 | -39.5 | -116.6 | -4.7 | | | 3945.2 | 3945.5 |
| 8b | Cm ² GAm ⁶ ₂ AGGUUCE ₃ CCUCC | 40.6 | -31.4 | -99.2 | -1.8 | | | 5221.3 | 5222.5 |
| 9 | GAGGGGAACCUCCGGGUUCC | 81.8 | | | | 19.0 | (5:95) | 6436.9 | 6436.5 |
| 9a | GAGGGGAACCUCC | 67.0 | -43.9 | -129.6 | -5.3 | | | 4178.6 | 4176.7 |
| 9b | GGGAACCUCCGGGUUCC | 79.9 | -48.4 | -138.4 | -7.1 | | | 5417.3 | 5418.2 |
| 10 | GAGGM ² GAm ⁶ ₂ ACCUCCGGGUUCC | 61.0 | -40.0 | -120.0 | -4.3 | <0.02 | | 6507.0 | 6504.5 |
| 11 | GAGGGGAACCUCCGGGUUC | 73.9 | | | | 4.0 | (20:80) | 6131.7 | 6130.4 |
| 11a | GAGGGGAACCUCC | 67.0 | -43.9 | -129.6 | -5.3 | | | 4178.6 | 4176.7 |
| 11b | GGAACCUCCGGGUUC | 71.7 | -43.7 | -127.9 | -5.6 | | | 4766.9 | 4766.1 |
| 12 | GAGGM ² GAm ⁶ ₂ ACCUCCGGGUUC | 60.7 | -40.1 | -119.5 | -4.5 | <0.02 | | 6201.8 | 6199.0 |

[a] 2 μM, 150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.0. [b] ΔH° und ΔS° erhalten aus den α/T -Kurven durch Kurvenanalyse; vgl. Lit. [9]. [c] 0.2 mM; 25 mM Natriumarsenatpuffer, pH 7.4, 298 K, H₂O/D₂O = 9/1. [d] Konformerenverhältnis (%). [e] MALDI-TOF- oder ESI-MS.

(entsprechend 5'...CCm²Gm⁶₂Am⁶₂AGG...3') die Wiederausbildung der ursprünglichen Sekundärstruktur erzwungen?

Ein Beispiel für ein Sequenzensemble, das sich zur experimentellen Untersuchung dieser Fragen eignet, ist in Abbildung 2 dargestellt.^[6] Die nichtmethylierte Sequenz **1** und die methylierte Sequenz **2** können prinzipiell je zwei unterschiedliche Konformationen einnehmen, nämlich **1'** und **1''** bzw. **2'** und **2''** (Abbildung 2a). Die beiden Konformationen können durch Vergleich mit einem geeigneten Referenzsystem zugeordnet werden (Abbildung 2b). Die Referenzsequenzen **1a**/**1b** und **2a**/**2b** repräsentieren kurze Abschnitte der Sequenzen **1** und **2** und zeichnen sind dadurch aus, dass sie jeweils nur eine einzige Konformation einnehmen können. Diese definierte Konformation entspricht einer der beiden möglichen Konformationen **1'** oder **1''** der Sequenz **1** (bzw. **2'** oder **2''** der Sequenz **2**).

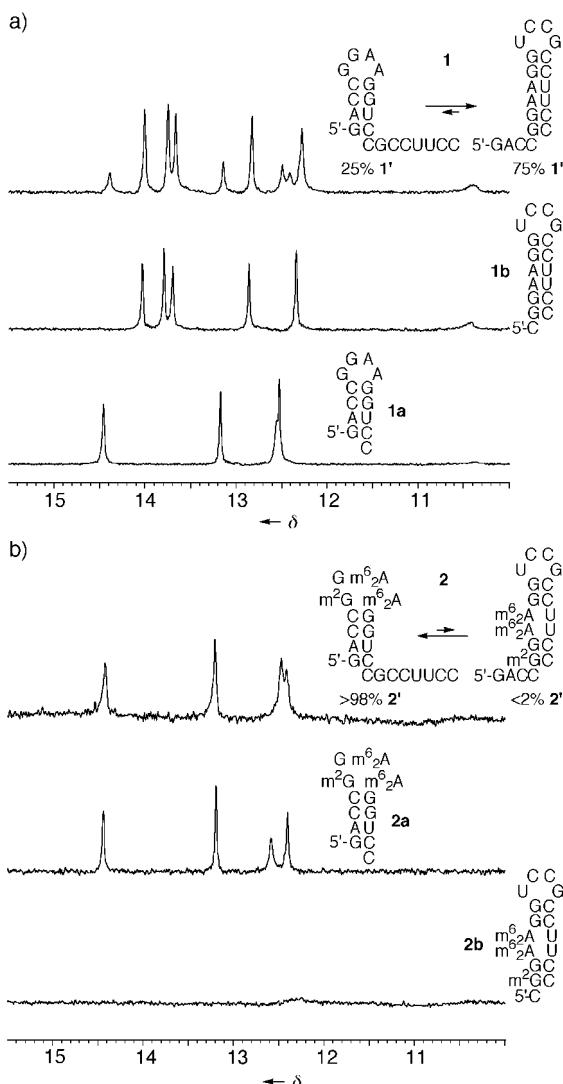


Abbildung 3. Zuordnung des RNA-Konformationsgleichgewichts durch ¹H-NMR-NH-Spektroskopie. a) Das NH-Spektrum von Sequenz **1** spiegelt die NH-Signalsätze der Referenzen **1a** und **1b** in einem Verhältnis von 25:75 (**1':1''**) wider; b) Im Unterschied dazu zeigt das NH-Spektrum von Sequenz **2** nur den Signalsatz entsprechend der Vergleichssubstanz **2a**; ($c = 0.2 \text{ mM}$; 25 mM Natriumsarkopuffer, pH 7.4, 298 K, H₂O/D₂O = 9/1). Referenz **2b** zeigt keine NH-Signale bei 298 K; Evidenz für die abgebildete Konformation resultiert aus der Schmelzkurve (vgl. Abbildung 4).

Die Zuordnung der Konformationen von **1** und **2** (Abbildung 3) erfolgte mit ¹H-NMR-Spektroskopie. Das NH-Spektrum von **1** in H₂O/D₂O zeigt die Charakteristika eines langsamen Austausches: Die NH-Signalsätze der beiden Referenzsequenzen **1a** und **1b** spiegeln sich im Verhältnis 25:75 wider.^[7] Dies zeigt eindeutig, dass Sequenz **1** bei einer Temperatur von 298 K in einem Konformationsgleichgewicht von **1'** und **1''** vorliegt.^[8] Im Unterschied dazu zeigt die methylierte Sequenz **2** einen einzigen NH-Signalsatz entsprechend der Referenzsubstanz **2a**, ein Hinweis darauf, dass **2** ausschließlich in der Konformation **2'** vorliegt. Die Methylierung erzwingt also die Bildung des zuvor ungünstigeren Sekundärstrukturmotivs.

Das hier vorgestellte Konzept erlaubt außerdem Aussagen über die Thermodynamik der Basenpaarungen der konkurrierenden Substrukturen in **1** und **2**. Die thermodynamischen Parameter der Referenzsequenzen **1a**/**1b** und **2a**/**2b** wurden aus den UV-Schmelzprofilen gewonnen (Abbildung 4).^[9] Ein

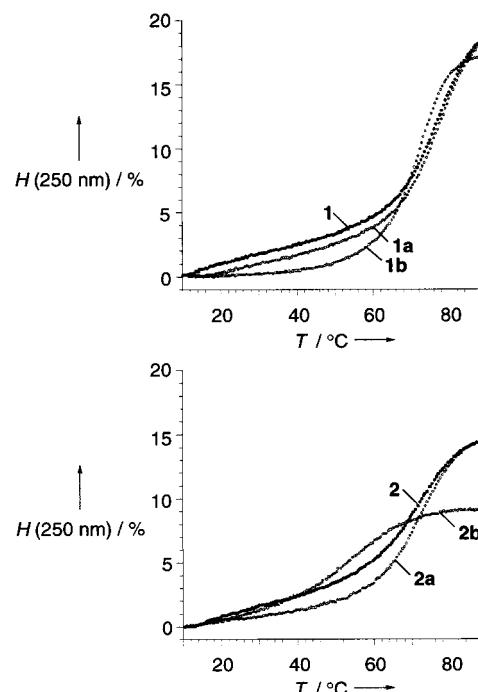


Abbildung 4. UV-Schmelzkurven: a) GACCGGAAGGUCCGCCUUC **1** ($T_m = 78.0^\circ\text{C}$) und die Vergleichssubstanzen GACCGGAAGGUCC **1a** ($T_m = 77.0^\circ\text{C}$) und CGGAAGGUCCGCCUUC **1b** ($T_m = 73.3^\circ\text{C}$). b) GACCm²Gm⁶₂Am⁶₂AGGUCCGCCUUC **2** ($T_m = 72.7^\circ\text{C}$), und GACCm²Gm⁶₂Am⁶₂AGGUCC **2a** ($T_m = 72.7^\circ\text{C}$), Cm²Gm⁶₂Am⁶₂AGGUCCGCCUUC **2b** ($T_m = 54.0^\circ\text{C}$); $c = 2 \mu\text{M}$, 150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.0.

Vergleich der T_m - und der entsprechenden $\Delta G^{298\text{K-UV}}$ -Werte der jeweiligen Referenzsubstanzen kann zur Vorhersage und ungefähren Abschätzung der Gleichgewichtskonstante herangezogen werden. Dabei weisen wir darauf hin, dass die Vergleichssubstanzen nicht notwendigerweise das thermodynamische Verhalten der Substrukturen in **1** (bzw. **2**) widerspiegeln und die Bestimmung von ΔG aus UV-Schmelzkurven mit einem Fehler von 2–5% behaftet ist. Für **1a**/**1b** beträgt der Fehlerwert ± 0.2 – $0.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ und liegt in der Größenordnung des zu bestimmenden Gleichgewichtzu-

stands. Die Energiedifferenz $\Delta\Delta G_{1a,1b}^{298K-UV}$ von $+0.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ favorisiert **1a** als die stabilere Haarnadelschleife gegenüber **1b** und erlaubt die Abschätzung von $K_{1'-1''}^{298K-UV}$ (ca. 0.37). Die exakte Position des Gleichgewichtes kann hingegen nur aus dem $^1\text{H-NMR-NH}$ -Spektrum abgeleitet werden. Dieses zeigt für die Sequenz **1** eindeutig die Bevorzugung der Konformation **1''** ($K_{1'-1''}^{298K-NMR} = 3.0$).^[10] Für das methylierte Referenzsystem **2a/2b** liefert die Vorhersage aus den UV-Daten ein $K_{2'-2''}^{298K-UV}$ von 0.0053 ($\Delta\Delta G_{2a,2b}^{298K-UV} = +3.1 \text{ kcal mol}^{-1}$). Dies korreliert sehr gut mit der aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ableitbaren Dominanz der Konformation **2'** für Sequenz **2** ($K_{2'-2''}^{298K-NMR} < 0.02$, Abbildung 3b). Wir halten außerdem fest, dass die Methylierung sowohl das Konformer **1'** gegenüber **2'** als auch – in noch größerem Ausmaß – das Konformer **1''** gegenüber **2''** destabilisiert. Auf molekularer Ebene steht die Spaltung eines GA-Basenpaars (**1'** versus **2'**) der Spaltung von zwei Watson-Crick-Basenpaaren gegenüber (**1''** versus **2''**).

Die beschriebenen Beobachtungen treffen nicht nur für die Sequenzen **1** und **2** zu. Um die Eigenschaften der Zweizustandsgleichgewichte der Konformere und den Einfluss der Methylierung auf die Gleichgewichtslage besser zu verstehen, untersuchten wir die verwandten Sequenzen **3** bis **12** (vgl. Tabelle 1 und Hintergrundinformationen). Die Oligonukleotide **3** und **4** unterscheiden sich von **1** und **2** durch ein zusätzliches Guanosin am 3'-Ende. Wie erwartet wird dadurch das Gleichgewicht der nichtmethylierten Sequenz **3** weiter zu der UCCG-Haarnadelschleife ($K_{3'-3''}^{298K-NMR} = 5.7$) gedrängt. Das Gleichgewicht der methylierten Sequenz bleibt umgekehrt; **4** nimmt also die Konformation der $m^2\text{GGm}^6_2\text{Am}^6_2\text{A}$ -Haarnadelschleife ein, die jener von **2'** entspricht ($K_{4'-4''}^{298K-NMR} < 0.02$).

Die Oligonukleotide **5** und **6** unterscheiden sich von **1** und **2** durch den Austausch zweier Nucleoside, nämlich C13G14 durch U13U14. Daher spiegelt das Gleichgewicht der Sequenz **5** nicht mehr die Konkurrenz einer GNRA- mit einer UNCG-Haarnadelschleife wider, welche beide als überdurchschnittlich stabile Sekundärstrukturmotive bekannt sind.^[11] In **5** ist der letztgenannte Sequenzabschnitt durch UCUU ersetzt. Dies führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichts bei dem das Konformer **5''** nur mehr geringfügig gegenüber **5'** bevorzugt ist ($K_{5'-5''}^{298K-NMR} = 1.2$). Durch die Methylierung der entsprechenden Nucleobasen wird das Gleichgewicht auch in diesem Sequenzsystem vollständig auf die Seite der $m^2\text{GGm}^6_2\text{Am}^6_2\text{A}$ -Haarnadelschleife **6'** verschoben ($K_{6'-6''}^{298K-NMR} < 0.02$).

Die Oligonukleotide **7** und **8** unterscheiden sich von **1** und **2** erneut durch den Austausch zweier Nucleoside innerhalb des ursprünglichen UCCG-Abschnitts. C13G14 sind dabei durch eine nicht nucleotidische Verbrückung mit Bis(triethylenglycol)phosphat (E_3E_3) ersetzt.^[12] Interessanterweise hat dieser Austausch keine signifikante Destabilisierung von **1''** zur Folge. Die Gleichgewichtskonstanten von **7** und **8** sind vergleichbar mit jenen von **1** und **2**.

Die Oligonukleotide **9/10** und **11/12** haben im Vergleich zu den oben untersuchten Sequenzen unterschiedliche, zur Schleife hin abschließende Basenpaare (G/C anstelle von C/G; vergleiche auch Abbildung 1). Durch eine nahezu vollständige Konformationsänderung durch Methylierung erfüllt

das Sequenzpaar **9/10** die Voraussetzungen für einen molekularen Schalter am besten ($K_{9'-9''}^{298K-NMR} = 19$ und $K_{10'-10''}^{298K-NMR} < 0.02$).

Die Fähigkeit von RNA-Molekülen, zwei (oder mehrere) stabile Konformationen einzunehmen wird im Allgemeinen im Zusammenhang mit der Tertiärstruktur diskutiert und darüber hinaus häufig mit dem Konzept molekularer Schalter in Verbindung gebracht.^[13, 14] Letzteres geht davon aus, dass ein RNA-Molekül, welches in einer definierten Konformation vorliegt, durch einen extrinsischen Faktor wie der Zugabe von Mg^{2+} -Ionen^[14a] oder eines komplementären Oligonukleotides^[14b] oder der Veränderung des pH-Wertes^[14c] zur Bildung einer alternativen Konformation gezwungen wird. Auf der Ebene der Sekundärstruktur und in Abwesenheit extrinsischer Faktoren sind monomolekulare Konformationsgleichgewichte postuliert worden,^[15] jedoch ist die Koexistenz von Konformeren im Gleichgewichtszustand unseres Wissens nach für kürzere RNA-Sequenzen bisher nicht experimentell bestätigt worden. Unser Konzept erlaubt nun, Gleichgewichte konkurrierender Sekundärstrukturen einer Sequenz detailliert zu untersuchen. Dies beinhaltet erstens das Auffinden der Sequenzvoraussetzungen und der erlaubten Sequenzvariationen, zweitens die Bestimmung der Paarungseigenschaften der konkurrierenden Substrukturen und drittens die thermodynamische Analyse der Konformationsgleichgewichte. Allgemein betrachtet ist die Untersuchung solcher Gleichgewichte wertvoll, um zu einem besseren Verständnis früher Prozesse der RNA-Faltung zu gelangen; Gleichgewichte dieser Art stellen im weiteren Sinne Verzweigungspunkte unterschiedlicher Wege der Faltung dar.^[16]

Darüber hinaus konnten wir mit der Sequenznähe zur Helix 45 die Verschiebung der Gleichgewichtslage durch Methylierung („Schalter“) untersuchen. Wir weisen darauf hin, dass in den Nucleotidsequenzen der rRNA tetra-, penta- und hexamere Sequenzabschnitte auftreten, die zu den Helix-45-Schleifensequenzen komplementär sind.^[17] Es wäre denkbar, dass unter diesen komplementären Bereichen Faltungsfallen sind, deren Bildung durch die Methylierung der Nucleobasen verhindert wird. Dies könnte einer der Gründe für den hohen Konservierungsgrad der Helix-45-Methylierung in der rRNA sein.^[18]

Eingegangen am 29. August 2001 [Z17816]

- [1] P. F. Crain, J. A. McCloskey, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 126–127.
- [2] *Modification and Editing of RNA* (Hrsg.: H. Grosjean, R. Benne), ASM, Washington, DC, **1998**.
- [3] a) M. Helm, H. Brûlé, F. Degoul, C. Cepanec, J.-P. Leroux, R. Giegé, C. Florentz, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 1636–1643; b) M. Helm, R. Giegé, C. Florentz, *Biochemistry* **1999**, *38*, 13338–13346.
- [4] R. Micura, W. Pils, C. Höbartner, K. Grubmayr, M.-O. Ebert, B. Jaun, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 3997–4005.
- [5] a) D. L. J. Lafontaine, D. Tolliver in *Modification and Editing of RNA* (Hrsg.: H. Grosjean, R. Benne), ASM, Washington, DC, **1998**, S. 281–288; b) J. P. Rife, P. B. Moore, *Structure* **1998**, *6*, 747–756; c) R. van Charldorp, A. M. A. van Kimmenade, P. H. van Knippenberg, *Nucleic Acids Res.* **1981**, *19*, 4909–4917.
- [6] Alle Oligoribonukleotide wurden mit automatisierter Festphasensynthese unter Verwendung von 2'-O-TOM-Phosphoramiditen (Xeragon AG, Schweiz) hergestellt; X. Wu, S. Pitsch, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 4315–4323. Die Synthese der methylierten Nucleosidphosphoramidite wurde analog Lit. [4] durchgeführt.

- [7] Die ¹H-NMR-NH-Spektren wurden mit einem Bruker-Avance-500-MHz-DRX-Spektrometer aufgenommen unter Anregungsmodellierung (excitation sculpting) zur Wasserunterdrückung: a) T.-L. Hwang, A. J. Shaka, *J. Magn. Reson. A* **1995**, *112*, 275–279; oder, alternativ dazu, mit einem Varian-Unity-500-Spektrometer unter Verwendung einer selektiven Anregungs-Refokussierungs-Sequenz (excitation refocusing sequence) mit selektiven Pulsen, die nach dem G4 (Anregung; b) L. Emsley, G. Bodenhausen, *Chem. Phys. Lett.* **1990**, *165*, 469–476; 2.62 ms, rf-Amplitude: 1.74 kHz) und dem REBURP-Profil (Refokussierung; c) H. Geen, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **1991**, *93*, 93–141; 1.4 ms, rf-Amplitude: 4.47 kHz) moduliert wurden. Beide Amplitudenmodulierten Pulse wurden auf 13 ppm zentriert. NMR-Probenvorbereitung: *c* = 0.2–0.3 mM Oligonukleotid; 25 mM Na-trimarsenatpuffer, pH 7.4, 298 K, H₂O/D₂O = 9/1. Alle Proben wurden eine Minute auf 90°C erhitzt, rasch abgekühlt und eine Stunde äquilibriert. Die Proben wurden bei 4°C gelagert und nach einer Woche erneut gemessen. Dabei zeigten einige der Referenzsequenzen zu einem geringen Anteil Duplexformation.
- [8] Die NH-Spektren der Sequenzen **7** und **9** wurden zusätzlich bei einer Temperatur von 305 K und 288 K aufgenommen. Es zeigte sich keine wesentliche Veränderung der Gleichgewichtslage. Bei 274 K war eine leichte Verbreiterung der NH-Signale zu beobachten.
- [9] a) L. Marky, K. Breslauer, *Biopolymers* **1987**, *26*, 1601–1620; b) T. Xia, D. H. Mathews, D. H. Turner in *Comprehensive Natural Product Chemistry*, Vol. 8 (Hrsg.: D. Söll, S. Nishimura, P. Moore), Elsevier, Oxford, UK, **1999**, S. 21–47; c) M. Petersheim, D. H. Turner, *Biochemistry* **1983**, *22*, 256–263.
- [10] Unerwarteterweise ist **1a** stabiler als **1b**, hingegen liegt das Konformer **1'** im Gleichgewicht dreimal weniger als **1''** vor. Eine mögliche Erklärung ist, dass der 3'-Überhang von **1'** vollständig komplementär zu seiner Schleife ist, und daher einen einfacheren Weg zu **1''** und eine schnellere Vorwärtsgeschwindigkeitskonstante bedingen kann. (Der 5'-Überhang von **1''** ist hingegen lediglich zu zweien der vier Basen in der Schleife komplementär.)
- [11] a) M. E. Burkard, D. H. Turner, I. Tinoco, Jr. in *The RNA World, Second Edition* (Hrsg.: R. F. Gesteland, T. R. Cech, J. F. Atkins), CSHL Press, New York, **1999**, S. 675–680; V. P. Antao, S. Y. Lai, I. Tinoco, Jr., *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 5901–5905; c) R. Kirchner, M. Vogtherr, S. Limmer, M. Sprinzl, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1998**, *8*, 507–516.
- [12] Für einen thermodynamischen Stabilitätsvergleich unterschiedlicher nicht nucleotidischer Verbrückungen vgl.: W. Pils, R. Micura, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 1859–1863.
- [13] Ein eindrucksvolles Beispiel für eine RNA-Sequenz, die unterschiedliche Faltungen einnimmt und dabei unterschiedliche katalytische Aktivität ausübt: a) E. A. Schultes, D. P. Bartel, *Science* **2000**, 448–452. Weitere Beispiele für alternative stabile RNA-Konformere: b) J. Pan, D. Thirumalai, S. A. Woodson, *J. Mol. Biol.* **1997**, *273*, 7–13; c) D. K. Treiber, M. S. Rock, P. P. Zarrinkar, J. R. Williamson, *Science* **1998**, *279*, 1943–1946; Hepatitis-Delta-Virus(HDV)-Ribozym; d) A. T. Perrotta, M. D. Been, *J. Mol. Biol.* **1998**, *279*, 361–373; tRNAs: e) E. Madone, C. Florentz, R. Giegé, J. Lapointe, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 3583–3588; f) V. Serebrov, R. J. Clarke, H. J. Gross, L. Kisseelev, *Biochemistry* **2001**, *40*, 6688–6698; HIV-1-Leader-RNA: H. Huthoff, B. Berkhouit, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2594–2600; RNA-Phage-MS2: D. van Meerten, G. Girard, J. van Duin, *RNA* **2001**, *7*, 483–494; g) J. Flinders, T. Dieckmann, *J. Mol. Biol.* **2001**, *308*, 665–679.
- [14] a) M. Wu, I. Tinoco, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 11555–11560; b) K. A. LeCuyer, D. M. Crothers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3373–3377; c) T. C. Gluick, R. B. Gerstner, D. E. Draper, *J. Mol. Biol.* **1997**, *270*, 451–463.
- [15] Für computersimulierte RNA-Gleichgewichte vgl.: a) C. Flamm, I. L. Hofacker, S. Maurer-Stroh, P. F. Stadler, M. Zehl, *RNA* **2001**, *7*, 254–265; b) S. Wuchty, W. Fontana, I. L. Hofacker, P. Schuster, *Biopolymers* **1999**, *49*, 145–165.
- [16] a) P. Brion, E. Westhof, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**, *26*, 113–137; b) I. Tinoco, Jr., C. Bustamante, *J. Mol. Biol.* **1999**, *293*, 271–281.
- [17] Für eine rRNA-Datenbank siehe z.B.: Y. Van de Peer, P. Rijk, J. Winkelmann, R. De Wachter, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 175–176.
- [18] In der Literatur ist dokumentiert, dass in *E. coli* Mutationen der rRNA-Dimethylase ksgAp die m₂A⁶A-Dimethylierung in der 16S-rRNA blockieren, jedoch die RNA-Prozessierung nicht verhindern. Damit ist die kleine ribosomale Untereinheit der rRNA ohne die entsprechende Modifikation in der Helix 45 zugänglich. Allerdings erfolgt das Wachstum der mutierten Stämme mit reduzierter Rate. Die unmodifizierten Ribosomen sind in verschiedenen Aspekten der Translation in vitro mangelhaft; vgl. a) P. H. van Knippenberg in *Structure, Function, and Genetics of Ribosomes* (Hrsg.: B. Hardesty, G. Kramer), Springer, New York, NY, **1986**, S. 412–424; b) D. Nègre, C. Weizmann, J. Ofengand, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 4902–4906; c) D. L. J. Lafontaine, D. Tollervey in *Modification and Editing of RNA* (Hrsg.: H. Grosjean, R. Benne), ASM, Washington, DC, **1998**, S. 281–288.

Akashine A, B und C: Neuartige chlorierte Indigoglycoside aus *Streptomyces* sp. GW 48/1497**

Rajendra P. Maskey, Iris Grün-Wollny,
Herbert H. Fiebig und Hartmut Laatsch*

Professor Wolfgang Lüttke gewidmet

Indigo und sein Dibromderivat Purpur **1a** gehören sicherlich zu den wichtigsten Farbstoffen überhaupt. Sie wurden bereits in den frühen Hochkulturen genutzt,^[1] und bis heute hat Indigo eine erhebliche industrielle Bedeutung beibehalten. Zahlreiche Derivate wurden für Anwendungen nicht nur in der Textilfärbung synthetisiert, aber auch wichtige theoretische Untersuchungen befassen sich mit den chromophoren Eigenschaften des Indigos. Das Pigment lässt sich aus verschiedenen höheren Pflanzen wie *Baphicacanthus cusia* (Acanthaceae), *Calanthe veratrifolia* (Orchidaceae), *Isatis tinctoria* (Brassicaceae) und *Polygonum tinctorium* (Polygonaceae) gewinnen, bei deren Aufarbeitung es aus Vorstufen wie Indican und Isatan entsteht. Indigo wurde auch aus Pilzen (*Schizophyllum commune*,^[2] *Agaricus campester*^[3]) isoliert und sogar im Urin, Blutplasma und Hämofiltrat bei Menschen^[4] mit Stoffwechselstörungen (Blue-Diaper-Syndrom) nachgewiesen. Während von fast allen natürlichen Chromophoren zahlreiche Derivate in der Natur vorkommen, gibt es vom blauen Indigo-Isomer (Indigotin) nur drei: Neben dem berühmten tyrischen Purpur (6,6'-Dibromindigo **1a**)^[5] aus der Purpurschnecke sind bisher nur die Bromderivate **2a** und

[*] Prof. Dr. H. Laatsch, Dr. R. P. Maskey
Institut für Organische Chemie
Georg-August-Universität Göttingen
Tammannstraße 2, 37077 Göttingen (Deutschland)
Fax: (+49) 551-399660
E-mail: HLAATSC@gwdg.de
Dr. I. Grün-Wollny
Fa. bioLeads, Heidelberg (Deutschland)

Prof. Dr. H. H. Fiebig
Oncotest GmbH, Freiburg (Deutschland)
[**] Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) unterstützt. R.P.M. dankt dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) für ein Promotionsstipendium.