

Kinetik einer lichtinduzierten RNA-Umfaltung durch NMR-Spektroskopie in Echtzeit**

Philipp Wenter, Boris Fürtig, Alexandre Hainard, Harald Schwalbe* und Stefan Pitsch*

Die katalytischen und regulatorischen Eigenschaften von Ribonucleinsäuren hängen häufig von konformativen Umlagerungen sowohl der Tertiär- als auch der Sekundärkonformation ab.^[1] Ihre vielfältige Dynamik wird eindrucksvoll durch das Auftreten von parallelen Faltungswegen^[2] sowie von metastabilen^[3] und coexistierenden („bistabilen“) Konformationen belegt.^[4] Die Faltung von Ribonucleinsäuren aus einem denaturierten, nicht-nativen Zustand wurde eingehend mit unterschiedlichsten Methoden untersucht;^[5] dabei wurde ein hierarchisches Faltungsverhalten gefunden, bei dem der schnellen Bildung der Sekundärkonformation die langsamere Bildung der Tertiärkonformation folgt.^[6] Dagegen sind nur wenige zeitaufgelöste Studien zur RNA-Faltung aus einem ungestörten, nativen Zustand bekannt.^[7]

Hier berichten wir über eine neue Methode für die Untersuchung struktur- und zeitaufgelöster RNA-Faltung, die auf der photolytischen Freisetzung voreingestellter Faltungskonformationen in einem thermodynamischen Ungleichgewichtszustand und anschließendem Verfolgen des Umfaltungsprozesses mittels Echtzeit-NMR-Spektroskopie beruht. Diese Methode wurde für eine detaillierte kinetische Charakterisie-

rung der Umfaltung einer bistabilen 20-meren Ribonucleinsäure angewendet, die in zwei coexistierenden Haarnadelstrukturen vorliegt.^[8]

Die 20-mer RNA-Sequenz 5'-r[GACCGGAAGGUC-CGCUUCC]-3' bildet zwei ineinander übergehende Haarnadelkonformationen, die in einem temperaturabhängigen Gleichgewicht vorliegen (Konformationen A und B in Abbildung 1b). Um die stabilere Konformation B selektiv zu destabilisieren, haben wir ausgewählte Guanosine, die nur in Konformation B, aber nicht in Konformation A Basenpaare bilden, durch *O*⁶-[(*S*)-1-(2-Nitrophenyl)ethyl]-guanosin ((*S*)-NPE-G, Abbildung 1a) ersetzt.^[9] Wir erwarteten, dass die

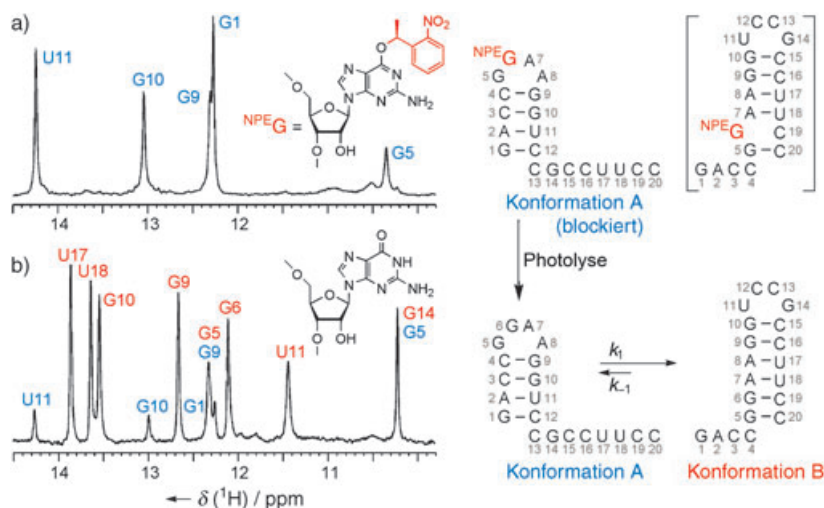


Abbildung 1. ¹H-NMR-Iminoprotonenspektren und Konformationen der 20-meren RNA-Sequenz ($c = 0.27$ mM, 288 K) mit Signalzuordnungen in Farbe; die Iminoprotonen-NMR-Spektroskopie zeigt individuelle Signale für die Protonen der zentralen Wasserstoffbrücke jedes Watson-Crick-Basenpaares. a) Konformativ blockierte Sequenz, die ein *O*⁶-NPE-modifiziertes Guanosin in Position 6 enthält (NPE-G6, Struktur eingefügt) mit einzig für Konformation A charakteristischen Signalen. b) Spektrum, das nach photolytischer Entfernung der NPE-Gruppe durch drei Laserpulse und anschließender einstündiger Äquilibration erhalten wurde; zu sehen sind die beiden Signalsätze von Konformation A und B in einem Verhältnis von 1:5.

[*] P. Wenter, A. Hainard, Prof. Dr. S. Pitsch
École Polytechnique Fédérale de Lausanne
Laboratory of Nucleic Acid Chemistry, EPFL-BCH
1015 Lausanne (Schweiz)
Fax: (+41) 21-693-9355
E-mail: stefan.pitsch@epfl.ch

B. Fürtig, Prof. Dr. H. Schwalbe
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie
Zentrum für Biomolekulare Magnetische Resonanz (BMRZ)
Marie-Curie-Straße 11, 60439 Frankfurt/Main (Deutschland)
Fax: (+49) 69-7982-9515
E-mail: schwalbe@nmr.uni-frankfurt.de

[**] Wir danken Jens Wöhnert, Julia Wirmer und Christian Richter für Diskussionen sowie Rita Merz für die Ausführung von Synthesen. Diese Arbeit wurde von der EPFL, dem Schweizerischen Nationalfonds (Nr. 2000-068090), dem SFB 579 „RNA-Ligand-Wechselwirkung“ und der „Studienstiftung des Deutschen Volkes“ (B.F.) unterstützt.

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

sterisch anspruchsvolle NPE-Gruppe G-C-Watson-Crick-Basenpaare aufbrechen und dadurch die assoziierte Sekundärkonformation destabilisieren würde; durch nachfolgende Photolyse würden jedoch die ursprünglichen Paarungseigenschaften zurückerhalten und der Umfaltungsprozess könnte stattfinden.^[10]

Die RNA-Sequenz 5'-r[GACCG(^{*S*}-NPE-G)AAGGUCCG-CGCUUCC]-3' mit einer einzigen (*S*)-NPE-Modifikation an der Position G6 zeigte ausschließlich die für Konformation A charakteristischen fünf Iminoprotonensignale (Abbildung 1a und Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen).^[11] Zusätzliche 2D-HSQC- und HNN-COSY-Experimente mit derselben, an C3 N(3)-¹⁵N- und an G10 N(1)-¹⁵N-markierten Sequenz zeigten, dass G10 nur ein Basenpaar bildet, und bestätigten zugleich C3 als seinen Paarungspartner (Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen). Diese NMR-Experimente demonstrierten zweifelsfrei, dass durch die Einführung einer einzelnen photolabilen NPE-Modifikation eine offenbar vollständige Verschiebung des konformativen

Gleichgewichtes zur intrinsisch weniger stabilen Konformation A erzielt wurde. Die Verbreiterung des G9-Iminoprotonensignals weist auf eine leichte Störung der lokalen Konformation der Haarnadelschleife hin.

Photolyse der (*S*)-NPE-G6-modifizierten, ^{15}N -markierten RNA (Abbildung 1a) durch drei Laserpulse, die über eine Glasfaser und eine bleistiftartige Quarzspitze in das NMR-Rohr geleitet wurden,^[12] führten zum in Abbildung 1b gezeigten Iminoprotonenspektrum, das mit dem Spektrum der authentischen Sequenz identisch ist (Abbildungen S1 und S2 in den Hintergrundinformationen); durch HPLC- und MS-Analyse wurde die vollständige und einheitliche Entfernung (>98%) der NPE-Gruppe bestätigt (Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen).

Einzelpuls-Imino-NMR-Spektren der (*S*)-NPE-modifizierten RNA, die vor sowie eine Sekunde nach der Photolyse aufgenommen wurden, waren nahezu identisch und belegten, dass die Sequenz tatsächlich in ihrer voreingestellten Faltungskonformation freigesetzt wurde. Um den Verlauf der Abspaltungsreaktion direkt beobachten zu können, führten wir identische Photolyseexperimente mit einer 1:1-Mischung von zwei diastereomeren 20-meren RNA-Sequenzen durch, die durch Einbau eines *R/S*-NPE-geschützten Guanosins erhalten wurden. Die durch Gegenwart unterschiedlich konfigurierter NPE-Gruppen in zwei Sätze aufgespaltenen Iminoprotonensignale (Abbildung 2a) wurden durch Photolyse mit einem einzigen Laserpuls innerhalb einer Sekunde auf einen Signalsatz reduziert (Abbildung 2b). Offenbar blieb die durch die photolabile Gruppe erzwungene Konformation unmittelbar nach deren photolytischer Abspaltung

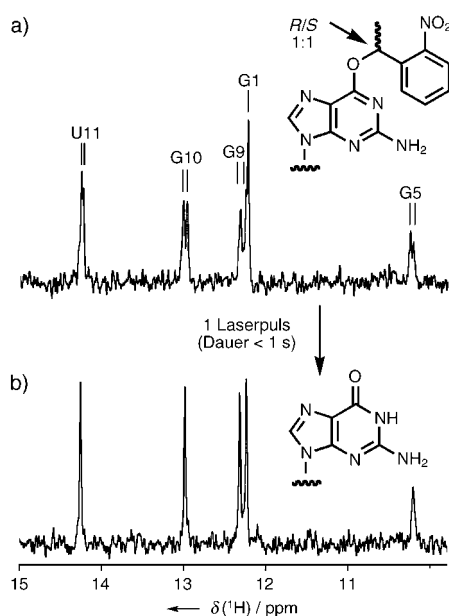


Abbildung 2. Verlauf der Photolysereaktion bei $c = 0.27\text{ mM}$, verfolgt durch Einzelpuls-NMR-Spektren der 20-meren RNA-Sequenz, die vor der Photolyse an G6 ein 1:1-Gemisch *S*- und *R*-konfigurierter NPE-Gruppen trug. a) Vor der Photolyse; die Signalaufspaltung wird durch die zwei unterschiedlich konfigurierten NPE-Gruppen hervorgerufen. b) Unmittelbar nach einem Laserpuls (Dauer < 1 s); die ursprünglich beobachtete Signalaufspaltung verschwindet wegen der photolytischen Entfernung der NPE-Gruppe.

vollständig erhalten, sodass durch dieses Verfahren eine von zwei normalerweise coexistierenden Konformationen selektiv freigesetzt werden konnte.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurden zwei Messreihen durchgeführt, bei denen einmal die Konzentration ($c = 0.17, 0.26$ und 0.34 mM , $T = 283\text{ K}$) und einmal die Temperatur ($T = 283, 288, 293$ und 298 K , $c = 0.26\text{ mM}$) variiert wurden. Nach Einstrahlung eines Laserpulses wurden innerhalb einer Zeit von 280 s, in der der Gleichgewichtszustand erreicht wurde, insgesamt 128 Einzel-NMR-Spektren aufgenommen. Die Auswertung erfolgte anhand der aufgelösten Iminoprotonensignale von U11/G10 und U17/G9, wobei U11/G10 der abnehmenden Konformation A und U17/G9 der zunehmenden Konformation B zugeordnet sind.

Die Gleichgewichtskonstanten K wurden aus den relativen Intensitäten der Signalaare für U11/U17 und G9/G10 erhalten. Aus der Temperaturabhängigkeit der K -Werte, die sich zwischen $K \approx 4$ bei 298 K und $K \approx 7$ bei 283 K bewegten, wurden Werte für $\Delta H = -5.9 \pm 0.5\text{ kcal mol}^{-1}$ und $\Delta S = -17.0 \pm 1.9\text{ cal mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$ innerhalb eines Vertrauensintervalls von 90% (90% VI) bestimmt (Abbildung 3c). Die Geschwindigkeitskonstanten k_1 der Umfaltung wurden durch Anpassen der Aufbau- und Abfallkurven der U11/G10- und U17/G9-Signale erhalten, die gemäß des Geschwindigkeitsgesetzes für eine reversible, unimolekulare Reaktion normalisiert waren (siehe Abbildung 3a und b sowie Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen). Die gemittelten Geschwindigkeitskonstanten für die Hinreaktion lagen zwischen $k_1 = 0.0136 \pm 0.0010\text{ s}^{-1}$ bei 283 K und $k_1 = 0.131 \pm 0.024\text{ s}^{-1}$

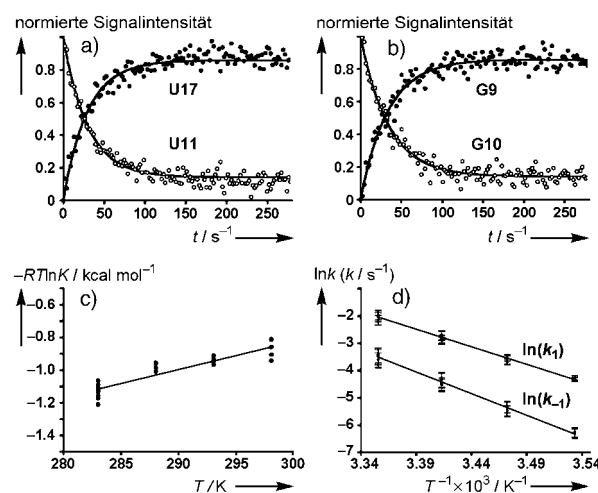


Abbildung 3. Analyse der kinetischen Parameter der Umfaltungsreaktion, die durch zeitabhängige Einzelpuls-NMR-Experimente der photolytierten 20-meren RNA-Sequenz erhalten wurden. a)–b) Normalisierte Signalintensitäten von Iminoprotonensignalen (U11/G10 aus Konformation A und U17/G9 aus Konformation B) als Funktion der Zeit, aufgezeichnet bei 288 K , nach Photolyse mit einem Laserpuls. Die angepassten Kurven wurden gemäß dem Geschwindigkeitsgesetz für eine reversible, unimolekulare Reaktion erhalten (detaillierte Vorgehensweise und Kurven bei anderen Temperaturen siehe Hintergrundinformationen). c) Linearisierte Darstellung von $K = [\text{Konformation B}]/[\text{Konformation A}]$ gemäß $\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S$. d) Arrhenius-Darstellung von k_1 und k_{-1} gemäß $\ln k = -\Delta H^\ddagger/(RT) + \ln A$; die Fehlerbalken (gezeigt für 99% VI) enthalten die K -Standardabweichung von 10% und die Standardabweichung der Kurvenanpassung.

bei 298 K und jene für die Rückreaktion zwischen $k_{-1} = 0.0019 \pm 0.0002 \text{ s}^{-1}$ bei 283 K und $k_{-1} = 0.031 \pm 0.006 \text{ s}^{-1}$ bei 298 K (90 % VI). Diese Werte wurden mit der Arrhenius-Gleichung ausgewertet und ergaben bei 90 % VI eine Aktivierungsenthalpie $\Delta H^\ddagger = 25.5 \pm 3.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ und einen Frequenzfaktor $A = 10^{(17.8 \pm 1.2)} \text{ s}^{-1}$ für die Hinreaktion sowie $\Delta H^\ddagger = 30.6 \pm 3.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ und $A = 10^{(20.9 \pm 1.4)} \text{ s}^{-1}$ für die Rückreaktion (Abbildung 3d). Die bei verschiedenen Konzentrationen ermittelten Geschwindigkeitskonstanten waren innerhalb 90 % VI identisch (für genaue Werte siehe Tabellen S5 und S6 in den Hintergrundinformationen).

Diese Ergebnisse sind im Einklang mit einem vollständig nach erster Ordnung verlaufenden Umfaltungsmechanismus. Die Aktivierungsenthalpie $\Delta H^\ddagger = 25.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ entspricht ungefähr der Hälfte der gesamten, durch thermische Denaturierung bestimmten Basenpaarungsenthalpie von $\Delta H = 55 \text{ kcal mol}^{-1}$ ^[8] und lässt auf einen Faltungsweg schließen, bei dem im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt ungefähr die Hälfte der Basenpaare aufgebrochen wird.

Aus NOESY-Kreuzsignalen wurden Wasseraustausch-Geschwindigkeiten der Iminoprotonen bestimmt, um auf diese Weise zusätzliche Informationen über den Einfluss der globalen Dynamik (ineinander übergehende Konformationen) auf die lokalen dynamischen Eigenschaften der einzelnen Basenpaare zu erhalten.^[13] Diese Geschwindigkeiten wurden mit denen der beiden entsprechenden, verkürzten RNA-Haarnadelstrukturen verglichen, die keine ungepaarten Überhänge aufwiesen und jeweils Konformation A oder B repräsentieren (Abbildung 4). Bei der bistabilen RNA-

Sequenz wurden generell höhere Wasseraustausch-Geschwindigkeiten festgestellt als bei den beiden verkürzten Haarnadelkonformationen (Abbildung 4a); dies zeigt, dass die Basenpaare der dynamischen, umfaltenden RNA-Struktur flexibler sind als die identischen Basenpaare der statischen Strukturen. Interessanterweise unterscheiden sich die Wasseraustausch-Geschwindigkeiten der 20-meren RNA-Sequenz von denen der beiden verkürzten Sequenzen umso stärker, je näher die Basenpaare der Schleifenstruktur sind.

Dieses Ergebnis weist stark auf einen assoziativen Umfaltungsmechanismus hin, wie er von uns in Abbildung 4b schematisch vorgeschlagen wird. Die Umfaltung würde dabei durch die Bildung neuer Basenpaare zwischen komplementären Nucleotiden der Schleifenregion und der überhängenden Enden sowie gleichzeitiges Aufbrechen der sich nahe an der Schleifenregion befindenden Basenpaare eingeleitet.

Mit der hier vorgestellten Methode gelang uns eine genaue struktur- und zeitaufgelöste Charakterisierung der Umfaltung einer bistabilen 20-meren RNA-Sequenz. Die Geschwindigkeitskonstanten der hier beobachteten Umfaltung liegen mindestens vier Größenordnungen unter denen, die für die Bildung von Haarnadelstrukturen ähnlicher Sequenzen aus einem ungefalteten Zustand heraus gemessen worden sind ($k = 10^4\text{--}10^5 \text{ s}^{-1}$).^[6] Diese neue Methode könnte Anwendung finden bei einer gezielten Synthese und Charakterisierung der Kinetik von ausgewählten Zwischenstufen, die entlang der komplexen Faltungswege größerer Ribonucleinsäuren auftreten.

Eingegangen am 25. November 2004

Online veröffentlicht am 22. März 2005

Stichwörter: NMR-Spektroskopie · Oligonucleotide · Photolyse · Reaktionskinetik · RNA-Strukturen

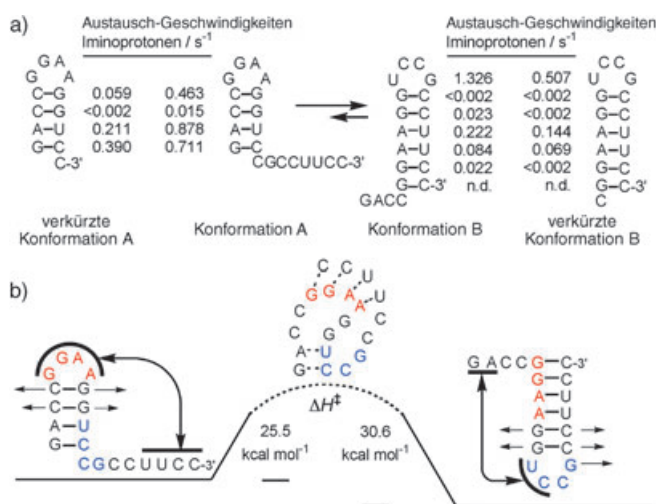


Abbildung 4. a) Wasseraustausch-Geschwindigkeiten der Basenpaar-Iminoprotonen, bestimmt in beiden Konformationen der bistabilen 20-meren RNA-Sequenz und den entsprechenden, verkürzten und statischen Haarnadelsequenzen; die Detektionsgrenze betrug 0.002 s^{-1} , und die Genauigkeit wird auf $\pm 5\%$ geschätzt; n.d.: nicht detektiert.^[13] b) Vorgeschlagerener assoziativer Umfaltungsmechanismus, der im Einklang mit den Wasseraustausch-Geschwindigkeiten und den kinetischen Parametern ist. Während der Umfaltung, die vermutlich aus vielen Elementarschritten besteht,^[14] könnten transiente Konformationen gebildet werden, in denen, wie schematisch angedeutet, die endständigen Basenpaare beider doppelsträngigen Bereiche der Konformationen A und B gleichzeitig gebildet sind. Die schleifenbildenden Nucleotide sind in Farbe dargestellt.

- [1] a) N. G. Walter, D. A. Harris, M. J. B. Pereira, D. Rueda, *Bio-polymers* **2002**, 61, 224–241; b) W. C. Winkler, R. R. Breaker, *ChemBioChem* **2001**, 2, 1024–1032; c) P. Brion, E. Westhof, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**, 26, 113–137.
- [2] J. Pan, D. Thirumalai, S. A. Woodson, *J. Mol. Biol.* **1997**, 273, 7–13.
- [3] D. K. Treiber, M. S. Rook, P. P. Zarrinkar, J. R. Williamson, *Science* **1998**, 279, 1943–1946.
- [4] C. Höbartner, R. Micura, *J. Mol. Biol.* **2003**, 325, 421–431.
- [5] a) P. P. Zarrinkar, J. R. Williamson, *Science* **1994**, 265, 918–924; b) X. Zhuang, L. E. Bartley, H. P. Babcock, R. Russell, T. Ha, D. Herschlag, S. Chu, *Science* **2000**, 288, 2048–2051; c) B. Scavi, M. Sullivan, M. R. Chance, M. Brenowitz, S. A. Woodson, *Science* **1998**, 279, 1940–1943; d) J. Ravetch, J. Gralla, D. M. Crothers, *Nucleic Acids Res.* **1974**, 1, 109–127; e) M. Menger, F. Eckstein, D. Porschke, *Biochemistry* **2000**, 39, 4500–4507.
- [6] a) D. Porschke, *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* **1977**, 24, 191–218; b) D. M. Crothers, P. E. Cole, C. W. Hilbers, P. G. Shulman, *J. Mol. Biol.* **1974**, 87, 63–88; c) D. Thirumalai, S. A. Woodson, *RNA* **2000**, 6, 790–794; d) D. Thirumalai, N. Lee, S. A. Woodson, D. K. Klimov, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2001**, 52, 751–762; e) I. Tinoco, Jr., C. Bustamante, *J. Mol. Biol.* **1999**, 293, 271–281.
- [7] a) T. C. Gluck, R. B. Gerstner, D. E. Draper, *J. Mol. Biol.* **1997**, 270, 451–463; b) D. C. Lynch, P. R. Schimmel, *Biochemistry* **1974**, 13, 1841–1852; c) D. C. Lynch, P. R. Schimmel, *Biochemistry* **1974**, 13, 1852–1861.

- [8] C. Höbartner, M. O. Ebert, B. Jaun, R. Micura, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 619–623; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 605–609.
- [9] Die Synthese des ^{NPE}G-Phosphoramidites ist in den Hintergrundinformationen beschrieben; die S-Konfiguration der NPE-Gruppe wurde willkürlich gewählt. Alle RNA-Sequenzen wurden aus 2'-O-Triisopropylsilyloxymethyl(TOM)-geschützten Phosphoramiditen aufgebaut, gemäß a) S. Pitsch, P. A. Weiss, L. Jenny, A. Stutz, X. Wu, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 3773–3795; die Synthese der ¹⁵N-markierten Phosphoramidite ist beschrieben in b) P. Wenter, S. Pitsch, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 3955–3974.
- [10] Eine verwandte Methode für die selektive Destabilisierung coexistierender RNA-Sekundärstrukturen durch Einführen O⁶-(2,2,2-Trichlorethyl)-modifizierter Guanosine wurde von C. Höbartner, H. Mittendorfer, K. Breuker, R. Micura, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4012–4015; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3922–3925 beschrieben; da die Entfernung der Zn-labilen Trichlorethyl-Gruppe jedoch viel langsamer als RNA-Umfaltungen erfolgt, können damit keine kinetischen Kenngrößen bestimmt werden.
- [11] Alle NMR-Experimente wurden mit einem AV-800-MHz-Spektrometer von Bruker durchgeführt, das mit 5-mm-TXI-HCN-Kryoprobenkopf und z-Achsen-Gradienten versehen war; die NMR-spektroskopischen Methoden sind in den Hintergrundinformationen beschrieben; alle Experimente wurden in H₂O/D₂O 9:1, 25 mM Kaliumarsenat-Puffer und bei pH = 7.0 durchgeführt (in Vorversuchen wurden identische Resultate in Natrium- und Kaliumphosphat-Puffern erhalten). Die 2D-HSQC- und HNN-COSY-Spektren wurden gemäß a) S. Mori, C. Abeygunawardana, M. O'Neil-Johnson, P. C. M. Vanzijl, *J. Magn. Reson. B* **1995**, *108*, 94–98 und b) A. J. Dingley, S. Grzesiek, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8293–8297 aufgenommen.
- [12] T. Kühn, H. Schwalbe, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6169–6174.
- [13] Wasseraustauschgeschwindigkeiten wurden gemäß R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *International Series of Monographs on Chemistry*, Bd. 14, Oxford University Press, **1987** bestimmt; weitere Einzelheiten werden in den Hintergrundinformationen gegeben. Im Prinzip könnten überlappende Signale bei der Resonanzfrequenz von ¹H_{H₂O} die Intensität der austauschinduzierten Kreuzsignale zwischen Wasser und den Iminoprotonen im 2D-NOESY-Experiment beeinflussen, allerdings sind die Riboseprotonen dazu zu weit von den Iminoprotonen entfernt. H(O)-Protonen befinden sich im Austausch mit Wasser und könnten wiederum zu der Kreuzsignalintensität beitragen; wiederum ist jedoch die Entfernung zu groß und der Einfluss deshalb vernachlässigbar. Die Basenprotonen erscheinen bei höherem Feld und können deshalb nicht zur Kreuzsignalintensität beitragen.
- [14] a) C. Flamm, W. Fontana, I. L. Hofacker, P. Schuster, *RNA* **2000**, *6*, 325–338; b) W. Zhang, S. J. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 1931–1936.