

# Calcium induziert die Bildung zweier Subpopulationen von Gruppe-II-Intron-Molekülen\*\*

Miriam Steiner, David Rueda\* und Roland K. O. Sigel\*

Für eine dreidimensionale Anordnung von Nucleinsäuren muss die negative Ladung, die durch das Zuckerphosphatrücken verursacht wird, neutralisiert werden. Als wichtigste Cofaktoren neben Proteinen und Polyaminen gehen Metallionen eine Bindung mit Nucleinsäuren ein. Sie helfen dabei, die Abstoßungs Kräfte zu überwinden und eine höher geordnete Struktur zu erreichen. Ferner sind sie häufig aktiver Bestandteil chemischer Reaktionen von katalytisch wirkenden Nucleinsäuren, den Ribozymen.<sup>[1]</sup> Diese katalytischen RNAs zeigen eine hohe Selektivität für Metallionen sowohl hinsichtlich der Art als auch hinsichtlich der Konzentration.<sup>[2–6]</sup> Mg<sup>2+</sup> ist das häufigste zweiwertige Metallion in der Zelle und gilt als natürlicher Ribozym-Cofaktor.

Selbstspleißende Gruppe-II-Introns gehören zu den größten bekannten Ribozymen und sind in den organellen Genen von kleineren Eukaryoten, Pilzen, Pflanzen und Bakterien zu finden.<sup>[7]</sup> Diese Ribozyme sind große molekulare Maschinen, die zur Autokatalyse<sup>[7]</sup> fähig sind. Das Gruppe-II-Intron Sc.ai5γ der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* diente als Grundlage für das hier untersuchte Ribozym D135. Letzteres erreicht seine optimale Aktivität *in vitro* unter nichtphysiologischen Bedingungen wie hohen Metallionenkonzentrationen (500 mM KCl, 50–100 mM MgCl<sub>2</sub>).<sup>[8]</sup> D135 ist aus den Domänen 1, 3 und 5 von Sc.ai5γ aufgebaut und enthält somit alle notwendigen Elemente für eine hohe katalytische Wirksamkeit, weshalb es zum am besten charakterisierten Modellsystem für die Untersuchung der Faltung von Gruppe-II-Introns wurde.<sup>[9,10]</sup> Der Faltungsprozess von D135 ist Mg<sup>2+</sup>-abhängig.<sup>[10]</sup> Ausgehend vom ungefalteten Zustand U, der in Gegenwart von ausschließlich einwertigen Metallionen vorliegt, bilden sich bei Mg<sup>2+</sup>-Zugabe zunächst zwei Übergangszustände I (erweiterter Zwischenzustand) und F (gefalteter Zwischenzustand), ehe der native Zustand N erreicht wird.

Die beiden Zustände I und F befinden sich in einem dynamischen Gleichgewicht und sind nur durch eine niedrige Energiebarriere getrennt.<sup>[10]</sup> Interessanterweise aktiviert eine steigende Mg<sup>2+</sup>-Konzentration die Faltungs dynamik und schafft damit einen direkten Zusammenhang zwischen Dynamik und Ribozymaktivität.<sup>[10]</sup>

Das Hammerhead-Ribozym behält seine Aktivität, wenn ausschließlich Ca<sup>2+</sup> als zweiwertiges Kation vorliegt.<sup>[3,11]</sup> Auch das größere *Tetrahymena*-Gruppe-I-Intron faltet sich in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> vollständig, jedoch wird hier für die katalytische Funktion zusätzlich eine kleine Menge Mg<sup>2+</sup> benötigt.<sup>[12]</sup> Dagegen werden Gruppe-II-Introns bereits durch kleine Mengen Ca<sup>2+</sup>-Ionen gehemmt, die dabei die Mg<sup>2+</sup>-Ionen im gefalteten Zustand aktiv ersetzen.<sup>[4]</sup> Diese Ca<sup>2+</sup>-Hemmung ist besonders interessant, weil das *cox1*-Gen, das für *Sc.ai5γ* kodiert, in der mitochondrialen DNA zu finden ist. Die Mitochondrien fungieren unter anderem als zelluläre Calciumspeicherplätze und sind somit an der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase beteiligt. Zusätzlich wirken die Cytochromoxidase 1 wie auch wechselnde Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen an apoptotischen Vorgängen mit.<sup>[13–15]</sup> Folglich ist es gut möglich, dass das Spleißen dieses Ribozyms und damit die fehlerfreie Prozessierung des *cox1*-Gens zur funktionellen Boten-RNA durch den lokalen Calciumspiegel in den Mitochondrien geregelt werden.

Bisher war es nicht möglich zu entscheiden, ob Ca<sup>2+</sup> die Gesamtstruktur des Ribozyms beeinflusst oder durch spezifischen Ersatz eines oder mehrerer Mg<sup>2+</sup>-Ionen direkt die Katalyse stört. Beide Effekte würden in einem standardisierten Aktivitätsversuch zur gleichen Inhibition führen und könnten so nicht unterschieden werden. Zur Beantwortung dieser Frage untersuchten wir den Faltungsprozess in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> unabhängig von der Katalysefunktion mittels Einzelmolekül-Förster-Resonanzenergietransfer (smFRET).

Das mit einem Fluorophor markierte D135-L14-Ribozym wurde bereits charakterisiert,<sup>[10]</sup> wobei gezeigt wurde, dass es RNA-Substrate katalytisch schneiden kann (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Wir führten nun smFRET-Experimente bei Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen von 0, 2, 5, 7 und 10 mM durch und gaben jeweils soviel Mg<sup>2+</sup> zu, dass eine Gesamtkonzentration an zweiwertigen Metallionen von 100 mM erreicht wurde. Kumulative FRET-Verteilungshistogramme der einzelnen Molekülfaltungsbewegungen sind in Abbildung 1a gezeigt (je 30–50 Moleküle).<sup>[10]</sup> Die beiden Zwischenzustände I und F (FRET ≈ 0.25 und 0.4) sind gleich stark besetzt, wenn ausschließlich Mg<sup>2+</sup> vorhanden ist, während der native Zustand N (FRET ≈ 0.6) deutlich geringer vertreten ist. Bei Zugabe von Ca<sup>2+</sup> findet eine eindeutige Populationsverschiebung statt: Der Anteil des 0.4-Zustands

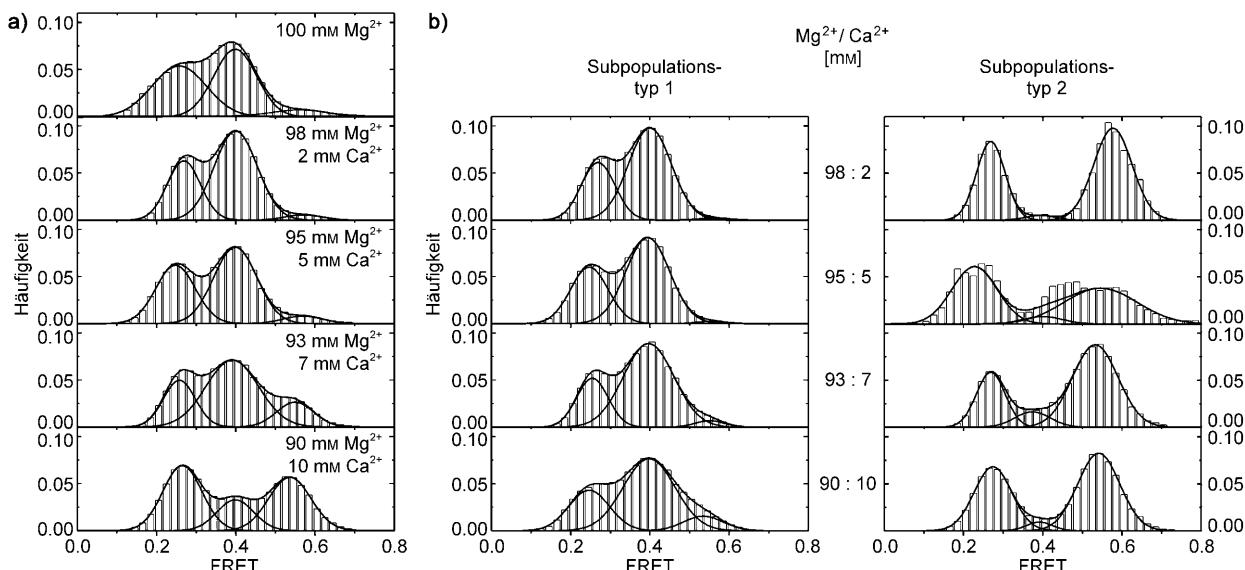
[\*] Prof. Dr. D. Rueda

Department of Chemistry, Wayne State University  
5101 Cass Avenue, Detroit, MI 48202 (USA)  
Fax: (+1) 313-577-8822  
E-Mail: rueda@chem.wayne.edu  
Homepage: www.chem.wayne.edu/ruedagroup

Dr. M. Steiner, Prof. Dr. R. K. O. Sigel  
Anorganisch-chemisches Institut, Universität Zürich  
Winterthurerstrasse 190, 8057 Zürich (Schweiz)  
Fax: (+41) 446-356-802  
E-Mail: roland.sigel@aci.uzh.ch  
Homepage: www.aci.uzh.ch/rna

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch den Schweizerischen Nationalfonds und die Universität Zürich (R.K.O.S.) sowie die NIH und die NSF (R01 GM085996 und MCB-0747285 to D.R.) unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200903809> zu finden.



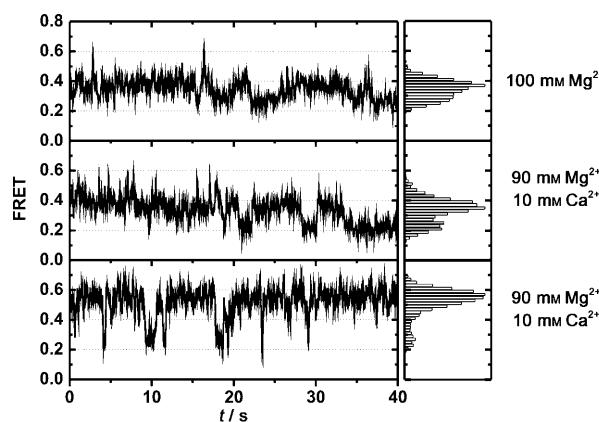
**Abbildung 1.** Histogramme der smFRET-Zeitverläufe in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup>. a) Bei Zugabe von bis zu 10 mM Ca<sup>2+</sup> (Gesamtkonzentration der zweiwertigen Metallionen 100 mM) steigt der Anteil des Zustands bei FRET ≈ 0.6 drastisch an. Der maximale FRET-Wert verschiebt sich außerdem von 0.6 zu 0.54, während die Signalhöhe des Zustands bei FRET = 0.4 sinkt. b) Histogramme der Einzelmolekülzeitverläufe für die beiden Subpopulationen Typ 1 (links) und Typ 2 (rechts) bei unterschiedlichen Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Verhältnissen.

sinkt, während der des 0.6-Zustands drastisch ansteigt (Abbildung 1a). Zusätzlich verschiebt sich bei einem Anstieg der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration auf 10 mM der Wert der höchsten FRET-Verteilung von ca. 0.60 zu ca. 0.54.

Um den Anstieg der Besetzung des 0.6-Zustands in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> zu charakterisieren, wurden die Molekülbewegungen einzeln analysiert (Abbildung 2). Ist nur Mg<sup>2+</sup> vorhanden (Abbildung 2, oben), sind drei wiederkehrende Konformationen von D135-L14 bei FRET-Werten von ungefähr 0.25, 0.4 und 0.6 zu beobachten, die I, F bzw. N zugeordnet werden können. Alle drei Zustände befinden sich in einem schnellen dynamischen Gleichgewicht, wobei der 0.6-Zustand jeweils nur eine kurze Lebensdauer hat. Bei Zugabe von Ca<sup>2+</sup> treten zwei deutlich unterschiedliche Signalverläufe

auf. Der Verlauf vom Typ 1 ähnelt demjenigen, der beobachtet wird, wenn ausschließlich Mg<sup>2+</sup> vorhanden ist (Abbildung 2, Mitte). Dagegen zeigt der Verlauf vom Typ 2 ein vollkommen anderes Verhalten: Es tritt ein direkter Übergang vom 0.25- zum 0.6-Zustand auf, den die Moleküle hauptsächlich besetzen. Der 0.4-Zustand wird somit kaum besetzt (Abbildung 2, unten). Die Konformation des 0.4-Zustands ist hier offensichtlich Bestandteil eines seltener beschrittenen Faltungsweges. Allerdings ist nicht ganz klar, ob der Übergang vom 0.6- zum 0.25-Zustand tatsächlich direkt erfolgt oder doch über den 0.4-Zustand und dieser nur wegen der Zeitauflösung von 33 ms nicht nachweisbar ist. Der 0.4-Zwischenzustand kann zwar von beiden Zuständen (0.25 und 0.6) aus erreicht werden, ist aber kein Durchgangszustand, da die Moleküle vom 0.4-Zustand jeweils bevorzugt wieder in ihren Ausgangszustand zurückfallen, statt in den dritten Zustand überzugehen. Übergänge einzelner Moleküle vom einen in den anderen Typ konnten innerhalb des einminütigen Beobachtungszeitraums nicht nachgewiesen werden. Grund hierfür könnte, wie schon früher beobachtet, eine gewisse Erinnerungsfähigkeit der Moleküle sein.<sup>[16]</sup>

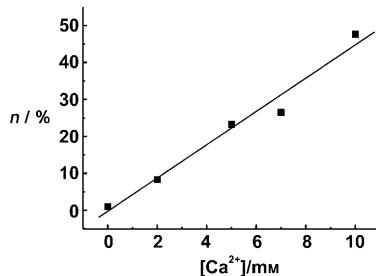
Die getrennten Histogramme der Zeitverläufe von Molekülen des Typs 1 und 2 deuten ebenfalls stark darauf hin, dass zwei klar voneinander unterscheidbare Subpopulationen existieren (Abbildung 1b). Typ-1-Histogramme sind durch eine breite Signalverteilung der 0.25- und 0.4-Zustände und eine durchweg geringe Signalverteilung des Zustands bei FRET ≈ 0.6 gekennzeichnet. Letztere steigt mit zunehmender Ca<sup>2+</sup>-Konzentration leicht an. Im Gegensatz dazu finden sich in Typ-2-Histogrammen hauptsächlich Verteilungen des tiefen und hohen FRET-Zustands und nur ein geringer Anteil des Zwischenzustands. Genauere Untersuchungen der Typ-2-Histogramme zeigen außerdem eine Verschiebung des höchsten FRET-Zustands von 0.58 zu 0.53, während die



**Abbildung 2.** Einzelmolekülzeitverlauf bei einer Mg<sup>2+</sup>-Konzentration von 100 mM (oben) und für die beiden Subpopulationen bei Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> = 90 mM:10 mM (Typ 1 Mitte und Typ 2 unten). Die FRET-Histogramme (rechts) zeigen deutlich die beiden unterschiedlichen Verlaufstypen in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup>.

Werte der zwei niedrigeren FRET-Zustände unverändert bleiben (Abbildung 1 b). Diese Beobachtung lässt sich damit erklären, dass Moleküle des Typs 2 nicht mehr den nativen Zustand erreichen, sondern nur einen fehlgefalteten Zustand M, dessen FRET-Daten sich deutlich von denen des nativen 0.6-Zustands unterscheiden.

Des Weiteren bestimmten wir die relative Zahl der Faltungsverläufe vom Typ 2 als Funktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Abbildung 3). Der Anteil an Typ-2-

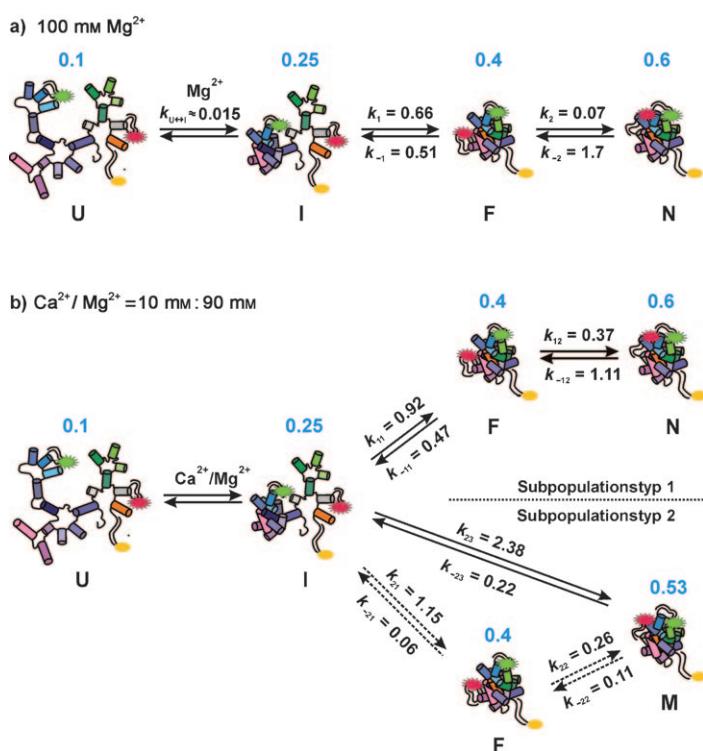


**Abbildung 3.** Der Anteil an Typ-2-Molekülen ( $n$ ) als Funktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ergibt einen linearen Zusammenhang mit einer Steigung von  $(4.5 \pm 0.4) \text{ mm}^{-1}$ .

Molekülen steigt linear an und erreicht bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 10 mm einen Wert von 50%, was mit dem beobachteten Funktionsverlust in Gegenwart von Calciumionen korreliert.<sup>[4]</sup> Diese Resultate bestätigen abermals die Existenz zweier Subpopulationen und erklären den Verlauf der FRET-Histogramme, die die Faltungswege der Typen 1 und 2 enthalten (Abbildung 1 a).

Die Faltungsgeschwindigkeit für Typ-1-Moleküle wurde mittels einer „Verweilzeit“-Analyse<sup>[10]</sup> für eine Reihe von  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Verhältnissen bestimmt (je 25–50 Moleküle). Die Geschwindigkeitskonstanten beider vorwärts gerichteter Faltungsschritte ( $k_{11}$  und  $k_{12}$ ) sowie beider Rückreaktionen ( $k_{-11}$  und  $k_{-12}$ ) werden mit zunehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration entweder linear größer oder bleiben innerhalb der Fehlergrenze unverändert (Abbildung 4). Die Verhältnisse der Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktionen stimmen mit der Beobachtung überein, dass der höchste FRET-Zustand im Allgemeinen kaum besetzt ist, die RNA-Moleküle jedoch bei Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  zunehmend in diesen Zustand übergehen (Abbildung 1 b).

Für die Faltung der Typ-2-Moleküle wurden die Geschwindigkeitskonstanten für den Übergang vom 0.25- zum 0.4-Zustand ( $k_{21}/k_{-21}$ ) sowie für die Übergänge vom 0.25- und 0.4- zum 0.53-Zustand ( $k_{23}/k_{-23}$  bzw.  $k_{22}/k_{-22}$ ) bestimmt (Abbildung 4). Etwa ein Drittel der Typ-2-Moleküle zeigt Übergänge vom und zum 0.4-Zustand, während die übrigen Moleküle einen direkten I-M-Übergang durchlaufen. Weil Faltungsvorgänge über den Zustand F vor allem bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen nur selten zu beobachten sind, wurden die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{21}$ ,  $k_{-21}$ ,  $k_{22}$  und  $k_{-22}$  über den Kehrwert der Durchschnittsverweilzeiten abgeschätzt.



**Abbildung 4.** Faltungswege des D135-L14-Ribozyme in Gegenwart von  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$ . a) In Gegenwart von  $\text{Mg}^{2+}$  ist ein linearer Faltungsweg, beginnend vom ungefalteten Zustand U, zwingend über die Zwischenzustände I (erweiterter Zwischenzustand) und F (gefalteter Zwischenzustand) zum nativen Zustand N zu beobachten.<sup>[10]</sup> b) In Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  sind zwei Subpopulationen zu erkennen. Typ 1 beschreibt einen Faltungsweg, der dem in Gegenwart von  $\text{Mg}^{2+}$  ähnelt, aber leicht unterschiedliche Geschwindigkeitskonstanten aufweist. Moleküle des Typs 2 falten meist direkt vom Intermediat I in den fehlgefalteten Zustand M. Einige der Typ-2-Moleküle folgen einem anderen Faltungsweg, wobei sie den Zwischenzustand F auf dem Weg von I zu M passieren. Die Maxima der FRET-Verteilung sind in Blau gezeichnet. Alle Konstanten sind in  $\text{s}^{-1}$  angegeben und wurden bei Konzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+} = 10 \text{ mM}:90 \text{ mM}$  ermittelt. Die einzelnen Fehlergrenzen werden auf etwa 50% der angegebenen Werte geschätzt.<sup>[17]</sup> Der erste Schritt der Faltung, die Zugabe von einwertigen Ionen zur RNA, ist nicht dargestellt. Es kann nicht unterschieden werden, ob I die Verzweigungsstelle des Faltungsprozesses ist oder ob sich bereits dieses Intermediat bei den beiden Subpopulationen unterscheidet (siehe Text).

$k_{21}$  und  $k_{-21}$  konnten nur für das Konzentrationsverhältnis  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+} = 10 \text{ mM}:90 \text{ mM}$  berechnet werden und weisen eine große Standardabweichung auf, sodass eine verlässliche Interpretation schwierig ist.  $k_{22}$  und  $k_{-22}$  sind  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig, während  $k_{23}$  mit zunehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ansteigt und bei allen untersuchten Bedingungen den höchsten Wert hat, also den schnellsten Faltungsschritt beschreibt. Die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion,  $k_{-23}$ , wird entsprechend bei hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration niedriger. Insgesamt lässt sich durch diese Werte die rasche Anhäufung der Ribozymmoleküle im 0.53-Zustand einleuchtend erklären.

In dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss zweiwertiger Metallionen und nicht nur der von  $\text{Mg}^{2+}$  auf die RNA-Faltung auf der Ebene einzelner Moleküle charakterisiert. Das auf der Basis eines Gruppe-II-Introns konstruierte Ribozym D135-L14 ist das größte proteinfreie RNA-Molekül, das

bisher mit smFRET untersucht wurde, und erwies sich als ein gutes Modellsystem zur Erforschung der Faltung großer RNA-Moleküle. Der selbstkatalytische Spleißprozess reagiert sehr empfindlich auf Spuren von  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>[4]</sup> Obwohl eine eventuell auch zusätzliche direkte Hemmung des katalytischen Schrittes durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen nicht völlig ausgeschlossen werden kann, konnten wir durch unsere smFRET-Messungen eine bisher noch nie beobachtete Veränderung in der RNA-Faltung in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  nachweisen:

1) Die Moleküle des Typs 1 zeigen ein ähnliches Faltungsverhalten wie Moleküle in einer Lösung, die ausschließlich  $\text{Mg}^{2+}$  als zweiwertige Metallionen enthält, und die einzelnen Geschwindigkeitskonstanten werden durch Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  nur schwach (wenn überhaupt) erhöht. Wir ordnen diesen Typ-1-Molekülen eine dreidimensionale Struktur zu, in der immer noch die wichtigsten strukturgebenden Bindungsstellen durch  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen besetzt sind. Eine spezifische Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen kann zwar nicht vollständig ausgeschlossen werden, aber vermutlich erfolgt ihre Koordination an die RNA in diesem Fall nur unspezifisch im Sinne einer Ladungskompensation, ohne einen großen Einfluss auf die räumliche Anordnung der Nucleinsäure zu haben. Die größere Ligandenaustauschgeschwindigkeit und der größere Ionenradius von  $\text{Ca}^{2+}$  verglichen mit dem von  $\text{Mg}^{2+}$  könnten zu einer leichten Zunahme der Geschwindigkeitskonstanten, der beobachteten höheren Dynamik der Domänen und einem geringfügig weniger kompakten hohen FRET-Zustand führen.

2) Der 0.4-Zustand der Moleküle vom Typ 2 ist äußerst instabil und existiert kaum. Die unbeantwortete Frage ist, ob die Moleküle direkt vom 0.25-Zustand in den kompakteren fehlgefalteten Zustand mit  $\text{FRET} \approx 0.53$  übergehen oder ob sie diesen in einem Zwischenschritt über den 0.4-Zustand erreichen. Ist der 0.4-Zustand nämlich kurzlebiger als das experimentell vorgegebene Zeitfenster von 33 ms, kann er nicht detektiert werden. Innerhalb der zweiten Subpopulation scheint  $\text{Ca}^{2+}$  offensichtlich eine oder mehrere Schlüsselpositionen in der gefalteten Struktur zu besetzen, da der hohe FRET-Zustand F etwas weniger kompakt ist als der native Zustand N.

Die Unterschiede in der Faltungs dynamik des D135-L14-Ribozyms bei steigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration können anhand der unterschiedlichen Koordinationseigenschaften von  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  erklärt werden:  $\text{Ca}^{2+}$  ist größer, tauscht Liganden schneller aus und kann bis zu acht Liganden koordinieren, während die Koordinationszahl von Magnesium sechs ist. Zusätzlich hat  $\text{Ca}^{2+}$  eine intrinsisch stärkere Affinität zu Nucleinsäuren als  $\text{Mg}^{2+}$ : Da  $\text{Mg}^{2+}$  in unseren Experimenten stets im Überschuss eingesetzt wurde, muss  $\text{Ca}^{2+}$  zumindest an einer Stelle deutlich stärker koordinieren als  $\text{Mg}^{2+}$ .

Folgende Spekulationen über die spezifische Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$  während der einzelnen Faltungsschritte sind möglich: Die Struktur des 0.25-Zustands I, der auf eine gefaltete Domäne 1 zurückzuführen ist,<sup>[10]</sup> scheint nicht durch  $\text{Ca}^{2+}$  beeinflusst zu werden. Erst nach Bindung der Domänen 3 und 5 an Domäne 1 wird bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe eine Trennung in zwei parallel existierende Subpopulationen erkennbar. Es wurde bereits früher gezeigt,<sup>[10]</sup> dass die Dynamik der Gruppe-II-Introns bei hohen  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen zunimmt, d.h., der

0.25-Zustand wird in regelmäßigen Abständen besetzt. Vermutlich binden ein oder mehrere  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an eine bestimmte Position innerhalb des Zustands I, welche die strukturelle Dynamik kontrolliert. Dies führt im Folgenden dazu, dass ein alternativer Faltungsweg in Richtung der fehlgefalteten Struktur M eingeschlagen wird. Eventuell führt die Koordination des ersten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions zu einer kooperativen Bindung weiterer Ionen, was die Koexistenz von Molekülen der Typen 1 und 2 erklären würde. Die Annahme einer kooperativen Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  wird dabei durch die lineare Zunahme des Anteils an Molekülen des Typs 2 mit steigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gestützt. Bis jetzt konnten im Rahmen des experimentell gegebenen Zeitfensters keine Ribozyme beobachtet werden, die in ihrem Faltungsverhalten zwischen den beiden Subpopulationen wechseln. Obwohl der Zustand I in beiden Molekültypen den gleichen FRET-Wert hat, kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass sich bereits dieser Zustand in den beiden Subpopulationen unterscheidet.

Unsere Resultate stimmen mit früheren Beobachtungen überein,<sup>[4]</sup> dass  $\text{Ca}^{2+}$  bereits im Anfangsstadium den Faltungsprozess der D135-Moleküle hemmt. Biochemische Studien zeigten,<sup>[4]</sup> dass die katalytische Aktivität, beschrieben durch  $k_{\text{cat}}$ , in Gegenwart von 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  um 50 % sinkt und das Spleißen bei 20 mM  $\text{Ca}^{2+}$  vollständig inhibiert wird. Ein quantitativer Zusammenhang zwischen der Hemmung des Spleißvorgangs und dem Auftreten der zwei Subpopulationen mit zunehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann nicht angegeben werden, weil in den vorherigen Experimenten die isolierte Domäne 5 zugegeben wurde, d.h., sie war nicht kovalent mit den anderen Teilen des Ribozys verbunden. Solch eine aus zwei Komponenten bestehende experimentelle Anordnung behindert offensichtlich deutlich den letzten Faltungsschritt zur aktiven Struktur.

In früheren Experimenten war es nicht gelungen, der Heterogenität in den Faltungsvorgängen eine funktionelle Rolle zuzuweisen. Jüngste Lösungs-FRET-Studien einer verlängerten Form des *Schistosoma*-Hammerhead-Ribozys ergaben, dass die Natur der zugesetzten zweiwertigen Metallionen zwar fast keinen Einfluss auf den RNA-Faltungsprozess hat, die katalytische Aktivität aber durch sie stark beeinflusst wird.<sup>[6]</sup> Die von uns beobachteten kleinen Unterschiede in den maximalen FRET-Intensitäten wären in solchen Lösungsexperimenten allerdings nicht messbar. Dies zeigt deutlich, dass nur mittels Einzelmolekülspektroskopie der subtile Einfluss verschiedener  $M^{2+}$ -Ionen auf die Faltungsprozesse von RNA-Molekülen aufgeklärt werden kann.

Die Faltung von Gruppe-II-Introns ist von allgemeiner Bedeutung, weil 1) keine kinetische Senke im Verlauf des nativen Faltungsweges existiert, 2) der aktive Zustand N nur ein kurzlebiger Zustand ist, der ausgehend von einem strukturell verdichteten, N-ähnlichen Zustand F erreicht wird, 3) der Zustand N durch Substratbindung stabilisiert wird und 4)  $\text{Mg}^{2+}$  nicht nur die Faltung induziert, sondern auch die Eigendynamik der gefalteten RNA erhöht.<sup>[10]</sup> Die hier beschriebenen Resultate zeigen noch zwei weitere Aspekte auf: 5) Die spezifische Koordination von Metallionen beeinflusst die globale Architektur großer RNA-Moleküle. Somit konnte auf der Ebene einzelner Moleküle zwischen RNA-Molekülen, die  $\text{Mg}^{2+}$  gebunden haben, und solchen, die  $\text{Ca}^{2+}$  ent-

halten, unterschieden werden. 6) Kombiniert man die biochemischen Daten<sup>[4]</sup> mit den hier beschriebenen zwei Subpopulationen, kann der Heterogenität des Faltungsprozesses zum ersten Mal eine funktionelle Rolle zugesprochen werden.

## Experimentelles

RNA-Aufbereitung und Einzelmolekülexperimente: Die RNA D135-L14, abgeleitet vom Intron Sc.ai5γ von *S. cerevisiae*, wurde in vitro mittels selbstexprimierter T7-RNA-Polymerase transkribiert. Als DNA-Vorlage diente das *Hind*III-geschnittene Plasmid pT7D135-L14, das wie die mit T-Biotin, Cy3 und Cy5 markierten Oligonukleotide wie beschrieben<sup>[18–20]</sup> gereinigt wurde. Die Einzelmolekülexperimente wurden entsprechend den Literaturvorschriften<sup>[10,21]</sup> durchgeführt. Um den Einfluss steigender Ca<sup>2+</sup>-Konzentration bei gleicher Ionenstärke zu testen und die Ergebnisse vergleichen zu können, wurden die Proben in folgenden Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Mischungen inkubiert: 100:0, 98:2, 95:5, 93:7 und 90 mm:10 mm. Einzelheiten sind in den Hintergrundinformationen zu finden.

Eingegangen am 12. Juli 2009

Online veröffentlicht am 18. November 2009

**Stichwörter:** FRET · Metallionen · Ribozyme · RNA-Faltung · Spleißen

- 
- [1] R. K. O. Sigel, A. M. Pyle, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 97–113.
- 

- [2] R. K. O. Sigel, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 2281–2292.
- [3] M. Roychowdhury-Saha, D. H. Burke, *RNA* **2006**, *12*, 1846–1852.
- [4] M. C. Erat, R. K. O. Sigel, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 1025–1036.
- [5] E. Freisinger, R. K. O. Sigel, *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 1834–1851.
- [6] J. L. Boots, M. D. Canny, E. Azimi, A. Pardi, *RNA* **2008**, *14*, 2212–2222.
- [7] F. Michel, J. L. Ferat, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 435–461.
- [8] L. H. J. Su, M. Brenowitz, A. M. Pyle, *J. Mol. Biol.* **2003**, *334*, 639–652.
- [9] O. Fedorova, N. Zingler, *Biol. Chem.* **2007**, *388*, 665–678.
- [10] M. Steiner, K. S. Karunatilaka, R. K. O. Sigel, D. Rueda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 13853–13858.
- [11] B. M. Chowira, A. Berzal-Herranz, J. M. Burke, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1088–1095.
- [12] D. W. Celander, T. R. Cech, *Science* **1991**, *251*, 401–407.
- [13] D. F. Babcock, B. Hille, *Curr. Opin. Neurobiol.* **1998**, *8*, 398–404.
- [14] E. Carafoli, *FEBS Lett.* **1979**, *104*, 1–5.
- [15] N. Zamzami, T. Hirsch, B. Dallaporta, P. X. Petit, G. Kroemer, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1997**, *29*, 185–193.
- [16] X. W. Zhuang, H. Kim, M. J. B. Pereira, H. P. Babcock, N. G. Walter, S. Chu, *Science* **2002**, *296*, 1473–1476.
- [17] S. C. Blanchard, R. L. Gonzalez, H. D. Kim, S. Chu, J. D. Puglisi, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 1008–1014.
- [18] S. Gallo, M. Furley, R. K. O. Sigel, *CHIMIA* **2005**, *59*, 812–816.
- [19] N. G. Walter, *Methods* **2001**, *25*, 19–30.
- [20] D. Rueda, N. G. Walter, *Methods Mol. Biol.* **2006**, *335*, 289–310.
- [21] R. Zhao, D. Rueda, *Methods* **2009**, *49*, 112–117.