

Sekundärstrukturanalyse von spinmarkierter RNA mit Puls-EPR-Spektroskopie**

Giuseppe Sicoli, Falk Wachowius, Marina Bennati* und Claudia Höbartner*

Die Fähigkeit von RNA, verschiedene komplexe Strukturen einzunehmen, ist eine Voraussetzung für die Vielfalt ihrer biologischen Funktionen.^[1] Ein bekanntes Beispiel sind RNA-Schalter, deren regulatorische Funktion auf dem präzisen Zusammenspiel von alternativen RNA-Konformationen beruht.^[2] Die Untersuchung der molekularen Mechanismen von Funktionen der RNA erfordert die Analyse von Intermediaten der RNA-Faltung. Hierfür steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung: Unter anderem hat sich die EPR-Spektroskopie als eine nützliche Methode erwiesen, um Strukturinformationen über Nucleinsäuren zu erhalten. Die beschriebenen Anwendungen reichen von der Untersuchung lokaler Konformationsänderungen in RNA^[3] bis zur Identifizierung von Bindungsstellen für Metallionen.^[4] Puls-EPR-spektroskopische Methoden (PELDOR/DEER) wurden auch verwendet, um Abstände zwischen paramagnetischen Zentren in spezifisch modifizierter RNA zu messen.^[5] Die PELDOR-Methode sollte sich daher auch gut dafür eignen, alternative Konformationen in RNA zu detektieren, die sich durch Änderungen des Basenpaarungsmusters auszeichnen.

Die einfache Herstellung von spinmarkierter RNA ist immer noch eine der großen Herausforderungen für die universelle Anwendung aussagekräftiger EPR-Techniken. Der häufigste Typus von paramagnetischen Sonden für Nucleinsäuren beruht auf Nitroxidradikalen. Einige Synthesemethoden zur Anknüpfung von nitroxidhaltigen Gruppen an interne RNA-Positionen an Ribose, Phosphatrückgrat oder Nucleobasen wurden bereits beschrieben. Häufig sind diese Spinsonden über flexible Linker gebunden, die über viele unerwünschte Rotationsfreiheitsgrade verfügen.^[6] Für DNA-Nucleobasen und deren Derivate wurden bereits starre Nitroxidradikal-Sonden beschrieben.^[7] Unsere Spinmarkierungsmethode für RNA beruht auf der direkten, linkerfreien Anknüpfung von Nitroxidsonden an Nucleobasen. Die Nitroxide sollen mit Watson-Crick-Basenpaaren kompatibel sein

und nicht mit der Bildung alternativer Basenpaarungsmuster interferieren. Dieser Ansatz ermöglicht die Detektion von RNA-Konformationsänderungen mit PELDOR, indem Abstandsänderungen zwischen zwei markierten Nucleobasen beobachtet werden.

Hier beschreiben wir die effiziente Einführung von Nitroxidsonden an den exocyclischen Aminogruppen der RNA-Nucleobasen Guanin, Adenin und Cytosin (Abbildung 1), und wir berichten über die Analyse von RNA-Sekundärstrukturen mit Elektron-Elektron-Doppelresonanzspektroskopie.

Die funktionalisierbaren Nucleoside^[8] *O*⁴-(4-Chlorphenyl)uridin, *O*⁶-(4-Chlorphenyl)inosin und 2-Fluorinosin wurden durch automatisierte Festphasensynthese in RNA-Oligonucleotide eingebaut. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen modifizierten 2'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-ge-

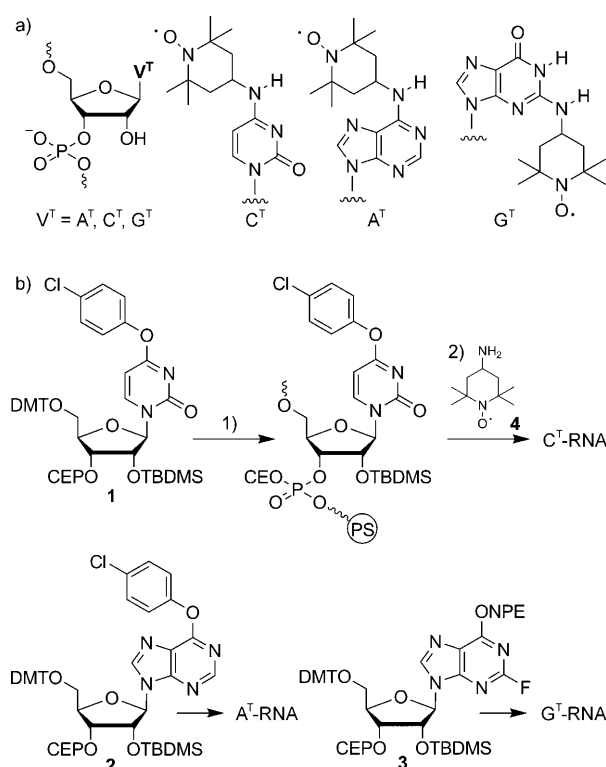


Abbildung 1. a) Spinmarkierte RNA mit den nitroxidhaltigen Nucleosiden A[•], C[•] und G[•]. b) Synthese von spinmarkierter RNA unter Verwendung der funktionalisierbaren Nucleosid-Phosphoramidite 1–3. 1) Automatisierte Festphasensynthese unter Standardbedingungen; 2) 2 M 4 in Methanol, 42 °C, 24 h; dann 1 M TBAF in THF, 25 °C, 12 h. DMT = 4,4'-Dimethoxytrityl, TBDMS = *tert*-Butyldimethylsilyl, CEP = (β-Cyanethyl)diisopropylphosphoramidit, NPE = 4-Nitrophenyl.

[*] Dr. G. Sicoli, Dr. M. Bennati
Forschungsgruppe Elektronenspinresonanz-Spektroskopie
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)
E-Mail: marina.bennati@mpibpc.mpg.de
F. Wachowius, Dr. C. Höbartner
Forschungsgruppe Nucleinsäurechemie
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)
Fax: (+49) 551-201-1680
E-Mail: claudia.hoebartner@mpibpc.mpg.de

[**] Wir bedanken uns für die finanzielle Unterstützung seitens der Max-Planck-Gesellschaft.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201000713> zu finden.

schützen Bausteine **1–3** und die vier Standard-RNA-Phosphoramidite mit 2'-*O*-Triisopropylsilyloxymethyl-Schutzgruppen verwendet. In einem Modifikationsschritt nach der Synthese wurde die 4-Chlorphenyl- oder Fluorid-Abgangsgruppe substituiert, indem die festphasengebundenen und noch vollständig geschützten Oligonucleotide mit einer Lösung von 4-Amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (**4**) in Methanol inkubiert wurden. Die Herstellung von *N*⁴-TEMPO-Cytidin (C^T) aus *O*⁴-(4-Chlorphenyl)uridin und *N*²-TEMPO-Guanosin (G^T) aus 2-Fluorinosin war nach 24 h bei 42 °C abgeschlossen. Es wurden keine unsubstituierten Nebenprodukte beobachtet. Die Umwandlung von *O*⁶-(4-Chlorphenyl)inosin in *N*⁶-TEMPO-Adenosin (A^T) war dagegen viel langsamer: Auch nach 96 h bei 42 °C oder 48 h bei 55 °C wurden noch 4-Chlorphenyl-haltige Nebenprodukte gefunden.^[9] Ein Vorteil der direkten Spinmarkierungsmethode ist die mit der Substitution gleichzeitig stattfindende Entschützung des Phosphatrückgrats und der Nucleobasen sowie die Abspaltung von der Festphase. Nach dem Entfernen der 2'-Silylgruppen wurden die TEMPO-substituierten RNA-Oligonucleotide durch Anionenaustauscher-HPLC oder durch denaturierende Polyacrylamid-Gel-elektrophorese gereinigt und mit MALDI- oder ESI-MS charakterisiert.^[9]

Um das Potenzial der TEMPO-markierten Nucleobasen für die Analyse von RNA-Sekundärstrukturen zu zeigen, betrachteten wir zunächst den Einfluss der Nitroxidsubstituenten auf die Sekundärstruktur von selbstkomplementären RNAs, die sowohl monomolekulare Haarnadelstrukturen wie auch dimolekulare Duplexe bilden können. Die selbstkomplementäre RNA **5** liegt über einen großen Konzentrationsbereich als Doppelhelix vor.^[10] Eine Reihe von Nucleobasenmodifikationen induziert die Umfaltung in eine monomolekulare Haarnadel-Konformation, wenn die Modifikation die Bildung von Watson-Crick-Basenpaaren stört. *N*⁴-Methylcytidin wird jedoch in der Doppelhelix gut toleriert.^[10] In ähnlicher Weise blieb die bevorzugte dimolekulare Sekundärstruktur nach der Einführung einer C^T-Markierung in die RNA **6** erhalten. Dies wurde durch die beobachtete Konzentrationsabhängigkeit der Schmelztemperatur bestätigt.^[9] Die Analyse der UV-spektroskopischen Schmelzexperimente zeigte eine Destabilisierung von 5–6 °C pro TEMPO-Substituent in einem RNA-Konzentrationsbereich von 3 bis 30 μM. Durch CD-Spektroskopie wurde bestätigt, dass die standardmäßige A-Form-RNA-Doppelhelix nicht signifikant beeinflusst wird.^[9]

Die Destabilisierung um 5–6 °C pro Spinsonde war ähnlich groß für C^T-, A^T- und G^T-haltige RNAs. Dies konnte durch den Einbau in verschiedene 20 Basenpaare lange RNA-Duplexe gezeigt werden (Tabelle 1, RNAs **7–13**). Spinsonden

Tabelle 1: RNA-Sequenzen und die Analyse der dimolekularen Sekundärstruktur mit UV-Spektroskopie und PELDOR.

| Nr. | 5'-Sequenz-3' | RNAs im Duplex ^[a] | <i>T</i> _m ^[c] [°C] | PELDOR <i>r</i> ^[f] [nm] |
|-----------|--|---|--|--|
| 5 | CGCGAAUUCGCGA | 5/5 | 66.2 | – |
| 6 | CGC ^T GAAUUCGCGA | 6/6 C ^T [3] | 55.1 | 2.0 ± 0.2 |
| 7 | UACUGACGUCUUCGACGUC | – | – | – |
| 8 | GACGUCGGAAGACGUCAGUA | 8/7 | 81.1 | – |
| 9 | GA ^T CGUCGGAAGA ^T CGUCAGUA | 9/7 A ^T [2,12] | 70.3 | 3.1 ± 0.2 |
| 10 | GAC ^T GUCGGAAGAC ^T GUCAGUA | 10/7 C ^T [3,13] | 70.1 | 3.1 ± 0.2 |
| 11 | GACG ^T UCGGAAGACG ^T UCAGUA | 11/7 G ^T [4,14] | 74 ^[d] | 3.2 ± 0.3 |
| 12 | GACGUC ^T GGAAGACGUC ^T AGUA | 12/7 C ^T [6,16] | 69.4 | 3.1 ± 0.2 |
| 13 | GACGUC ^T GGAAGACGUCAGUA | 13/7 C ^T [6] | 75.1 | n.a. ^[e] |
| 14 | UAGGGUUAGGGU | 14 ^[b] | 65.1 ^[e] | – |
| 15 | UAGGGUUA ^T GGGU | 15 ^[b] A ^T [8] | 64.2 ^[e] | 3.7 ± 0.2 |

[a] Spinmarkierte Positionen in Klammern. [b] Dimolekulare G-Quadruplex-Struktur. [c] UV-Schmelzkurvenanalyse bei 250 nm, 2 μM RNA, 150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.0. [d] Geschätzter *T*_m-Wert für Duplex; die Schmelzkurve der monomolekularen Struktur war überlagert.^[9] [e] Quadruplex-Hypochromieeffekt (*T*_m der Abkühlkurve) bei 295 nm, 70 mM KCl, 10 mM K₂HPO₄, pH 7.0. [f] 20–30 μM, 150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.0, 15 % Glycerin; für **15**: 20 μM, 70 mM KCl, 10 mM K₂HPO₄, pH 7.0, 15 % Glycerin. Der Fehlerwert gibt die halbe Halbwertsbreite der Abstandsverteilung an. [g] Nicht verfügbar; eine konkurrierende Homodimer-Bildung wurde nicht beobachtet.

in kurzen Haarnadelstrukturen wiesen hingegen stärkere Effekte auf.^[9] Eine größere Destabilisierung bis 10 °C pro Spinsonde wurde für C^T- und A^T-haltige Basenpaare gefunden. Dagegen erhöhte der Einbau von G^T an zwei benachbarten Basenpaaren die Schmelztemperatur der monomolekularen Struktur um 4 °C.

Die verschiedenen spinmarkierten RNAs wurden mit CW-EPR-Spektroskopie untersucht. Die Spektren (Abbildung 2a) deuten auf kurze Korrelationszeiten und eine hohe Mobilität der Spinsonden hin. Die Analyse der Linienform zeigt, dass die Spektren aus mindestens zwei Beiträgen mit unterschiedlichen Korrelationszeiten zusammengesetzt sind.

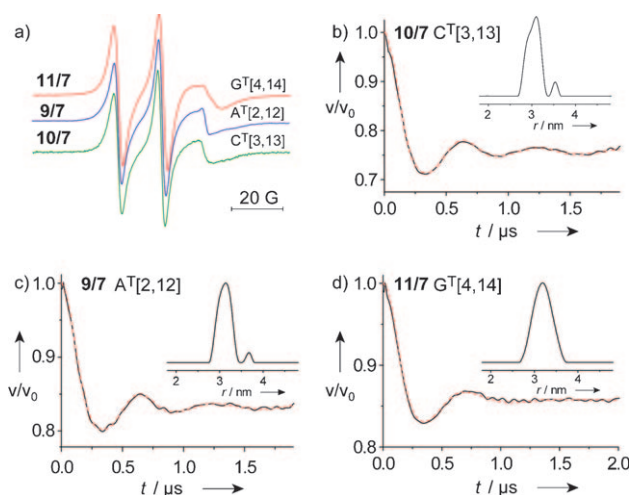


Abbildung 2. a) CW-EPR-Experimente und b–d) Vier-Puls-PELDOR-Experimente an doppelt G^T-, A^T- oder C^T-markierten RNA-Duplexen. 20 μM RNA, 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.0, 150 mM NaCl. Die Modulationstiefe der PELDOR-Signale wurde mit einem weichen Anregungspuls aufgenommen (100 Scans). Die dipolare Evolutionskurve (schwarz) und die berechnete Kurve (rot) wurden mit DEERAnalysis 2008 erhalten.^[9]

Dies könnte auf verschiedene relative Mobilitäten der Spinsonden zurückzuführen sein.

Die Abstände zwischen zwei TEMPO-Spinsonden in doppelhelikaler RNA wurden mit der PELDOR-Pulssequenz gemessen. Im Unterschied zu der unmarkierten RNA **8** enthalten die RNA-Oligonucleotide **9–12** jeweils zwei TEMPO-Gruppen an spezifischen Positionen (Tabelle 1). Die Bildung von dimolekularen Duplexen durch die Hybridisierung der RNAs **9–12** mit der komplementären RNA **7** führte zu Abständen von zehn Basenpaaren zwischen zwei TEMPO-Gruppen. Die dipolaren Evolutionskurven für die RNA-Duplexe **9/7**, **10/7** und **11/7** sind in Abbildung 2b–d dargestellt, ebenso wie die daraus durch Tikhonov-Regularisierung^[11] erhaltenen Abstandsverteilungen. Die gemessenen Abstände stimmen qualitativ gut mit den für idealisierte A-Form-Duplexe erwarteten Werten überein.^[9] Trotz der vermutlich hohen Mobilität der Spinsonden (die aus CW-EPR-Daten abzuleiten ist) zeigen die experimentell durch Puls-EPR-Spektroskopie ermittelten Abstände eine enge Verteilung mit halben Halbwertsbreiten von 0.2 nm für C^T- und A^T-RNA (Abbildung 2b,c) und 0.3 nm für G^T-RNA (Abbildung 2d). Dies ist vermutlich auf eine bevorzugte Konformation der Spinsonde in der tiefen großen Furche von A-Form-RNA-Duplexen zurückzuführen. Die etwas breitere Abstandsverteilung für G^T-markierte RNA könnte die größere Mobilität der TEMPO-Gruppe in der flachen kleinen Furche der A-Form-RNA widerspiegeln. Für ein analoges TEMPO-G-Derivat in einem DNA-Duplex wurde kürzlich gezeigt, dass die Spinsonde in der kleinen Furche der B-Form-DNA stark immobilisiert ist (0.2 nm Halbwertsbreite), während sie in der A-Form-Doppelhelix eine leicht höhere Flexibilität aufwies (0.3 nm Halbwertsbreite).^[12] Unter Verwendung starker Anregungspulse von 12 ns wurden für TEMPO-markierte RNAs Modulationstiefen gemessen, die mit berichteten Werten für andere doppelt markierte RNA-Systeme gut übereinstimmen.^[9,13] Die leicht unsymmetrische Abstandsverteilung für C^T- und A^T-markierte RNA-Duplexe könnte auf mehr als eine Konformation der Spinsonde in der großen Furche der Doppelhelix hinweisen. Alternativ dazu könnten die überlagerten Merkmale der Abstandsverteilung auch auf Orientierungsselektion^[14] von Anregungs- und Detektionspulsen zurückzuführen sein. Um dies weiter zu untersuchen, wurden PELDOR-Signale an unterschiedlichen Positionen der EPR-Linie aufgenommen.^[9] Die Fourier-transformierten Evolutionskurven zeigten eine leichte Abhängigkeit von der Magnetfeldposition, was auf Orientierungsselektion hindeuten könnte. Ein Experiment, bei dem die Orientierungen gemittelt wurden,^[14d] zeigte allerdings keine Änderung der Abstandsverteilung.^[9] Deshalb sind detailliertere EPR-Analysen bei höheren Frequenzen (34 oder 94 GHz) notwendig, um zusätzliche Informationen über die relative Orientierung von Nitroxiden in TEMPO-markierter RNA zu erhalten.^[14]

Zusätzlich zu unseren Studien an Doppelhelix- und Haarnadelstrukturen analysierten wir den Einfluss von Nucleobase-verknüpften TEMPO-Sonden auf die Struktur von RNA-Quadruplexen. Guanin-Quadruplexe von RNA wurden im Zusammenhang mit der Transkription von Telomeren untersucht,^[15] und die Existenz von quadruplexbildenden

RNA-Elementen in nichttranslatierten mRNA-Regionen wird diskutiert.^[16] Wir untersuchten RNA **14**, ein Modell der RNA-Wiederholungssequenz aus humanen Telomeren, deren dimolekulare parallelsträngige RNA-Quadruplex-Struktur vor kurzem mithilfe von NMR-Spektroskopie aufgeklärt wurde.^[17] Dieser NMR-Struktur zufolge sollten TEMPO-Gruppen in den Trinucleotid-Schleifen gut toleriert werden (Abbildung 3a). Analog zu der unmodifizierten RNA **14** bildete die A^T-haltige RNA **15** in Gegenwart von K⁺-Ionen einen stabilen Quadruplex. Dies wurde durch die Analyse von UV-Schmelzkurven bestätigt, die den charakteristischen Hypochromieeffekt bei 295 nm aufwiesen (Abbildung 3b).

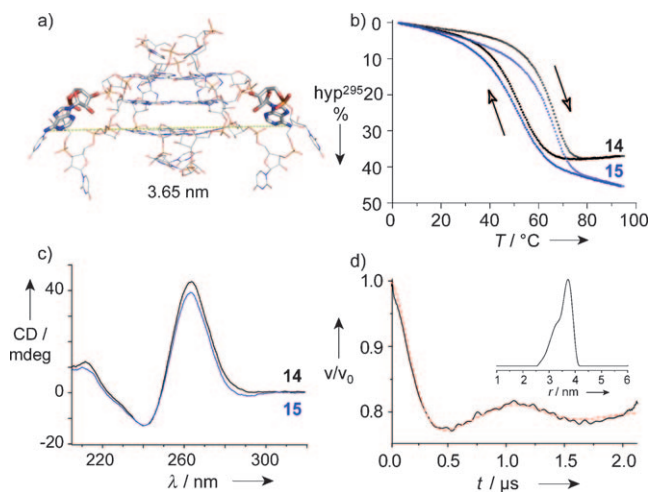


Abbildung 3. a) Dimolekulare RNA-Quadruplex-Struktur von **14** nach Lit. [17] (PDB-Nummer 2KBP). Der Abstand zwischen den Adenosin-N⁶-Atomen, an denen die TEMPO-Gruppen angeknüpft wurden, ist gekennzeichnet. b) UV-Schmelzkurven: Hypochromieeffekt bei 295 nm und c) CD-Spektren der RNAs **14** und **15**: 7 µM RNA, 20 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.0, 70 mM KCl, Aufheiz- und Abkühlgeschwindigkeit 0.2 °C min⁻¹. d) Dipolare Evolution und Abstandsverteilung aus dem PELDOR-Experiment von RNA **15**: 20 µM RNA, gleicher Puffer wie für UV- und CD-Messungen + 15% Glycerin.

Die Wendepunkte der Aufheiz- und Abkühlkurven von **14** und **15** unterscheiden sich nur um ca. 1–2 °C. Die CD-Spektren für markierte und unmarkierte RNA sind nahezu deckungsgleich (Abbildung 3c). Der Abstand zwischen den beiden TEMPO-Gruppen wurde mit PELDOR experimentell zu (3.7 ± 0.2) nm bestimmt. Dieser Wert stimmt gut mit dem aus der NMR-Struktur der unmodifizierten RNA abgeleiteten Abstand von 3.65 nm zwischen den TEMPO-Anknüpfungspunkten überein (Abbildung 3a,d). Die etwas breitere Abstandsverteilung könnte auf mehr als eine bevorzugte Konformation der Spinsonden hinweisen. Die EPR-Daten bestätigen also die Bildung eines parallelsträngigen Quadruplexes in Übereinstimmung mit der NMR-Struktur.^[9] Im Unterschied zu RNA-Quadruplexen wurde für Modelle der DNA-Wiederholungssequenz aus humanen Telomeren die Existenz von alternativen parallelen und antiparallelen Quadruplex-Topologien diskutiert. Die Koexistenz beider Konformationen wurde vor kurzem auch durch PELDOR-Messungen an spinmarkierter DNA bestätigt.^[18]

Die vielversprechenden PELDOR-Ergebnisse für verschiedene RNA-Sekundärstrukturen und die beobachteten engen Abstandsverteilungen für C^T-, A^T- und G^T-markierte RNAs veranlassten uns, die gleichzeitige Detektion alternativer RNA-Sekundärstrukturen zu untersuchen. Hierfür wählten wir ein System mit konkurrierenden Duplex- und Haarnadelstrukturen von teilweise selbstkomplementären RNAs. Die unmodifizierte RNA **8** unseres Modellsystems bildet eine stabile Haarnadelstruktur mit einem sechs Basenpaare langen Stamm (unterstrichene Nucleotide in der Tabelle 1), einer besonders stabilen GGAA-Schleife und einem vier Nucleotide langen 3'-Überhang. In Gegenwart der vollständig komplementären (unmodifizierten) RNA **7** wird der Stamm aufgebrochen, und es bildet sich ein 20 Basenpaare langer Duplex. Die isolierte Sequenz **7** kann auch eine Stamm-Schleifen-Struktur annehmen, die einen vier Nucleotide langen 5'-Überhang aufweist.^[9] Beide RNAs, **7** und **8**, können theoretisch homodimere Strukturen mit vier zentralen Fehlpaarungen aufbauen. Hinweise auf solche Homodimere wurden jedoch unter unseren Bedingungen in UV-Schmelzkurven und nativer Gelelektrophorese nicht beobachtet.^[9]

Die Sekundärstrukturen des Modellsystems **7/8** wurden auch in der spinmarkierten Form untersucht: Die doppelt C^T-markierte RNA **12** („spinmarkierte RNA **8**“) wurde für detaillierte PELDOR-Untersuchungen verwendet (Abbildung 4). In der Stamm-Schleifen-Struktur der RNA **12** sind die beiden TEMPO-Gruppen 6 Basenpaare voneinander entfernt. Dies spiegelt sich in einer Abstandsverteilung mit dem Zentrum bei 1.8 nm wider. Im Duplex sind die beiden TEMPO-Gruppen 11 Basenpaare voneinander entfernt, was in einem Abstand von 3.1 nm resultiert. Wurden zu der Haarnadelstruktur **12** zunehmende Mengen der komplementären RNA **7** titriert, dann lagen Haarnadelstruktur und Duplex in unterschiedlichen Verhältnissen nebeneinander vor. Dies kann aus der damit einhergehenden Veränderung des Flächenintegrals unter den Abstandsverteilungen beobachtet werden. Das Flächenverhältnis korreliert gut mit dem vorhergesagten Verhältnis der Sekundärstrukturen. Die Stamm-Schleifen-Struktur der unmarkierten RNA **8** und der analogen C^T-markierten RNAs **12** und **13**, sowie die Koexistenz von Haarnadelstruktur und Duplex wurden auch durch native Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestätigt.^[9]

In diesem Bericht haben wir eine effiziente Synthesemethode für spinmarkierte RNA für PELDOR-Experimente vorgestellt. Die direkte Anknüpfung der TEMPO-Gruppe an die exocyclischen Aminogruppen der Nucleobasen von A und C in der großen Furche und von G in der kleinen Furche von RNA-Duplexen mit Watson-Crick-Basenpaarung wurde durch die Verwendung funktionalisierbarer Nucleoside erzielt.^[19] Diese Strategie ergänzt andere Herstellungsverfahren für spinmarkierte RNA, die für basenspezifische Modifikation von Uridin, Cytidin und Adenosin beschrieben wurden.^[20] Mit dem N²-TEMPO-markierten Guanodin berichten wir hier erstmals über eine Guanodin-spezifische EPR-Sonde für RNA.^[21] Alle drei in dieser Studie vorgestellten TEMPO-substituierten Nucleotide haben ein großes Potenzial als verlässliche Sonden für die Unterscheidung alternativer RNA-Sekundärstrukturen mit Puls-EPR-Spektroskopie. Wir

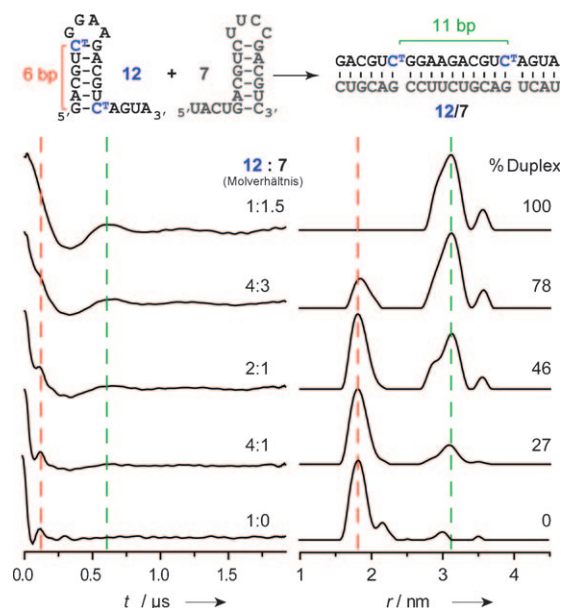


Abbildung 4. Die RNAs **12** und **7** falten sich unabhängig voneinander in Haarnadelstrukturen, aber in der Mischung bilden sie einen Duplex. PELDOR-Titrationsexperiment: schrittweise Zugabe von **7** zu **12** erzeugt 25, 50, 75 und 100 % Duplex in der Mischung (von unten nach oben). Durch Flächenintegration lässt sich das Verhältnis der Sekundärstrukturen mit einer Genauigkeit von $\pm 5\%$ quantifizieren. Die kleinen Signale bei 2.1, 2.9 und 3.6 nm sind auf verbleibende ¹⁴N- und ³¹P-Hyperfeinkopplung zurückzuführen (ESEEM-Effekt).

betrachten die einfache experimentelle Umsetzung unseres Synthesansatzes, die guten Ausbeuten und die sehr gute Qualität der spinmarkierten RNAs als wesentliche Vorteile der hier vorgestellten neuen Strategie. Die engen Abstandsverteilungen, die sich aus unseren PELDOR-Daten der A^T-, C^T- und G^T-modifizierten RNAs ergeben, eröffnen weitergehende Anwendungsmöglichkeiten bei der Untersuchung von Konformationsänderungen in biologisch relevanten RNA-Protein-Komplexen.

Eingegangen am 5. Februar 2010,
veränderte Fassung am 18. März 2010
Online veröffentlicht am 21. Juli 2010

Stichwörter: EPR-Spektroskopie · PELDOR · RNA · Sekundärstrukturen · Spinmarkierung

- [1] a) M. Nowotny, W. Yang, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 286; b) J. E. Wilusz, H. Sunwoo, D. L. Spector, *Genes Dev.* **2009**, *23*, 1494.
- [2] A. Serganov, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 251.
- [3] X. J. Zhang, P. Cekan, S. T. Sigurdsson, P. Z. Qin, *Methods Enzymol.* **2009**, *469*, 303.
- [4] a) T. E. Edwards, S. T. Sigurdsson, *Biochemistry* **2005**, *44*, 12870; b) N. Kisseleva, S. Kraut, A. Jäschke, O. Schiemann, *HFSP J.* **2007**, *1*, 127.
- [5] a) O. Schiemann, A. Weber, T. E. Edwards, T. F. Prisner, S. T. Sigurdsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3434; b) O. Schiemann, T. F. Prisner, *Q. Rev. Biophys.* **2007**, *40*, 1; c) O. Schiemann, *Methods Enzymol.* **2009**, *469*, 329.

- [6] a) G. Z. Sowa, P. Z. Qin, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2008**, 82, 147; b) T. E. Edwards, S. T. Sigurdsson, *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 1954; c) P. Z. Qin, I. S. Haworth, Q. Cai, A. K. Kusnetzow, G. P. G. Grant, E. A. Price, G. Z. Sowa, A. Popova, B. Herreros, H. He, *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 2354; d) O. Schiemann, N. Piton, J. Plackmeyer, B. E. Bode, T. F. Prisner, J. W. Engels, *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 904.
- [7] a) T. R. Miller, S. C. Alley, A. W. Reese, M. S. Solomon, W. V. McCallister, C. Mailer, B. H. Robinson, P. B. Hopkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9377; b) N. Barhate, P. Cekan, A. P. Massey, S. T. Sigurdsson, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 2709; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 2655; c) P. Cekan, A. L. Smith, N. Barhate, B. H. Robinson, S. T. Sigurdsson, *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36, 5946.
- [8] C. R. Allerson, S. L. Chen, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 7423.
- [9] Details sind in den Hintergrundinformationen enthalten.
- [10] R. Micura, W. Pils, C. Höbartner, K. Grubmayr, M. O. Ebert, B. Jaun, *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 3997.
- [11] G. Jeschke, V. Chechik, P. Ionita, A. Godt, H. Zimmermann, J. Banham, C. Timmel, D. Hilger, H. Jung, *Appl. Magn. Reson.* **2006**, 30, 473.
- [12] G. Sicoli, G. Mathis, O. Delalande, Y. Boulard, D. Gasparutto, S. Gambarelli, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 747; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 735.
- [13] I. Krstić, O. Frolow, D. Sezer, B. Endeward, J. E. Weigand, B. Suess, J. W. Engels, T. F. Prisner, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 1454.
- [14] a) V. P. Denysenkov, T. F. Prisner, J. Stubbe, M. Bennati, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 13386; b) G. Sicoli, T. Argirevic, J. Stubbe, I. Tkach, M. Bennati, *Appl. Magn. Reson.* **2010**, 37, 539; c) O. Schiemann, P. Cekan, D. Margraf, T. F. Prisner, S. T. Sigurdsson, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 3342; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 3292; d) A. Godt, M. Schulte, H. Zimmermann, G. Jeschke, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 7722; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7560.
- [15] a) C. M. Azzalin, P. Reichenbach, L. Khorauli, E. Giulotto, J. Lingner, *Science* **2007**, 318, 798; b) S. Schoeftner, M. A. Blasco, *EMBO J.* **2009**, 28, 2323.
- [16] a) S. Kumari, A. Bugaut, J. L. Huppert, S. Balasubramanian, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 218; b) O. Kikin, Z. Zappala, L. D'Antonio, P. S. Bagga, *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36, D141.
- [17] H. Martadinata, A. T. Phan, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 2570.
- [18] V. Singh, M. Azarkh, T. E. Exner, J. S. Hartig, M. Drescher, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 9908; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 9728.
- [19] Einbau analoger A^T- und C^T-Sonden in DNA unter Verwendung von Phosphoramiditchemie: a) W. Bannwarth, D. Schmidt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, 4, 977; b) C. Giordano, F. Fratini, D. Attanasio, L. Cellai, *Synthesis* **2001**, 565; C^T-DNA wurde kürzlich für die Analyse von Basenfehlpaarungen in Doppelstrang-DNA verwendet: c) P. Cekan, S. T. Sigurdsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 18054.
- [20] N. Piton, Y. Mu, G. Stock, T. F. Prisner, O. Schiemann, J. W. Engels, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 3128.
- [21] Eine analoge G^T-Sonde wurde für DNA beschrieben: A. Okamoto, T. Inasaki, I. Saito, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 3415.