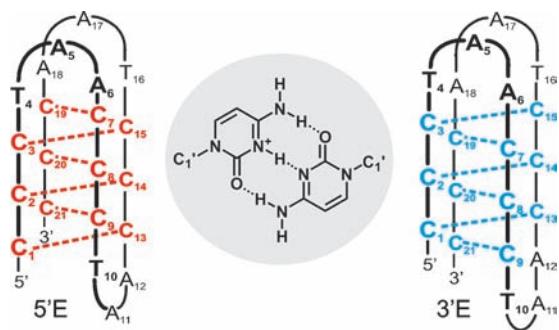


# Zeitaufgelöste NMR-Untersuchungen zeigen einen kinetischen Partitionierungsmechanismus während der Faltung des DNA-i-Motivs\*\*

Anna Lena Lieblein, Janina Buck, Kai Schlepckow, Boris Fürtig und Harald Schwalbe\*

Professor Joachim Engels gewidmet

Neben der bekannten DNA-Doppelhelixstruktur<sup>[1]</sup> können DNA-Oligonukleotide auch Strukturen wie G-Quadruplexe<sup>[2]</sup> und i-Motive<sup>[3]</sup> ausbilden, die durch nicht-kanonische Basenpaarungen stabilisiert werden. Sie bestehen entweder aus Guanosin- oder Cytidin-reichen Abschnitten, die über weitere Nukleotide in den Schlaufen miteinander verbunden sind. Cytidin-reiche i-Motive werden bei einem pH ≈ 6 gebildet und durch zwei Stränge mit interkalierten, semiprotonierten C··H··C<sup>+</sup> Basenpaaren (hier C·C<sup>+</sup>) (Schema 1) stabilisiert.



**Schema 1.** Sekundärstruktur der 21 nt langen DNA-i-Motive mit unterschiedlicher Interkalation der Basenpaare. Schematische Darstellung eines C·C<sup>+</sup> Basenpaares, gebildet bei pH 6.

bilisiert.<sup>[3,4]</sup> i-Motive können sich in der Anzahl der Basenpaare, in ihrer Gesamtlänge, der Interkalation und ihrer Schlaufen-Topologie unterscheiden.<sup>[5]</sup> Die biologische Funktion von i-Motiv-Strukturen wird immer noch diskutiert: in zellulären Extrakten von HeLa-Zellen konnten Proteine gefunden werden, die spezifisch an C-reiche Sequenzen telo-

merer DNA binden.<sup>[6]</sup> In der „insulin-linked polymorphic region“ (ILPR) konnten Regionen identifiziert werden, die sowohl i-Motiv- als auch G-Quadruplex-Strukturen ausbilden und Replikation hemmen.<sup>[7]</sup> Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Ausbildung einer i-Motiv-Struktur in der Promoter-Region von c-myc die Transkription unterdrückt.<sup>[8]</sup> Kürzlich wurden i-Motiv-Strukturen als DNA-Nanomaschinen entwickelt, um pH-Änderungen *in vivo* in *Drosophila*-Hämozyten<sup>[9]</sup> und in *Caenorhabditis elegans*<sup>[10]</sup> zu visualisieren.

Trotz der Bedeutung von i-Motiv-Strukturen in der Genregulation und der Verwendung als Sonden zur pH-Messung in lebenden Zellen ist nur wenig über den molekularen Mechanismus der i-Motiv-Faltung bekannt. Bislang wurde die i-Motiv-Faltung mit Oberflächenplasmonresonanzmessungen (SPR) und Quarzkristall-Mikrowagen (QCM-D) untersucht.<sup>[11]</sup> Aufgrund von FRET-Messungen (resonanter Förster-Energietransfer) konnte sowohl Reversibilität der i-Motiv-Faltung als auch mehrphasige Faltungs-kinetik nachgewiesen werden; die Geschwindigkeitskonstanten für Faltung und Entfaltung lagen im Bereich von Minuten.<sup>[9]</sup>

Wir haben sowohl strukturelle als auch kinetische Änderungen der pH-induzierten Faltung des i-Motivs untersucht. Zur Charakterisierung der Struktur der 21 Nukleotide langen DNA Sequenz d(CCCTAA)<sub>3</sub>CCC, die man in der Telomerenregion von Wirbeltieren findet,<sup>[12]</sup> wurden statische NMR-Untersuchungen durchgeführt. Darin sind vier Cytidin-reiche Abschnitte durch die Nukleotide TAA, die die Schlaufen bilden, miteinander verbunden. In saurer Umgebung bildet diese DNA eine intramolekulare i-Motiv-Struktur mit sechs C·C<sup>+</sup>-Basenpaaren. Wie im Folgenden beschrieben, bildet sich ein Gleichgewicht zwischen zwei i-Motiv-Konformationen aus, die im langsamen Austausch miteinander vorliegen (Schema 1). Für die hier untersuchte Sequenz beobachtet man die beiden Konformationen mit einem Populationsverhältnis von 3:1.

Des Weiteren wurde die Kinetik der i-Motiv-Faltung untersucht, die durch einen pH-Sprung von pH 9 nach 6 ausgelöst wurde. Unter diesen Bedingungen erfolgt die Faltung über einen parallelen Faltungsweg, bei dem zunächst zwei i-Motiv-Konformationen mit Geschwindigkeitskonstanten von ca. 2 min<sup>-1</sup> gebildet werden. Die anschließende Umfaltung der kinetisch bevorzugten zur thermodynamisch stabileren Konformation ist langsam, mit Geschwindigkeitskonstanten in der Größenordnung von 10<sup>-3</sup> min<sup>-1</sup>. Die Daten sind mit einem Modell im Einklang, bei dem sich die beiden Konformationen im Interkalationsmuster der C·C<sup>+</sup>-Basenpaare unterscheiden. Das äußerste C·C<sup>+</sup>-Basenpaar kann entweder

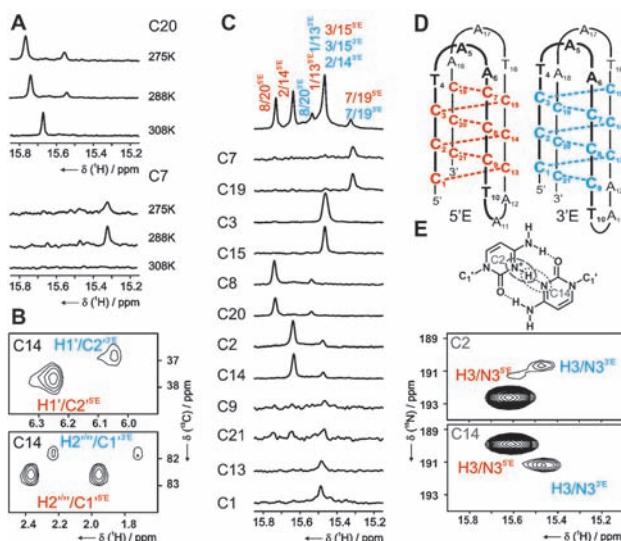
[\*] Dipl.-Chem. A. L. Lieblein, Dr. J. Buck, Dr. K. Schlepckow, Dr. B. Fürtig, Prof. Dr. H. Schwalbe  
Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie  
Biomolekulares Magnetresonanz Zentrum  
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main  
Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt (Deutschland)  
E-Mail: schwalbe@nmr.uni-frankfurt.de  
Homepage: <http://schwalbe.org.chemie.uni-frankfurt.de>

[\*\*] Arbeiten in der Gruppe von H.S. werden durch die DFG und das Bundesland Hessen (BMRZ) unterstützt. H.S. ist Mitglied im DFG geförderten Exzellenzcluster Makromolekulare Komplexe. Wir danken Elke Stirnal für ihre Hilfe bei der HPLC-Aufreinigung der DNA-Proben sowie Dr. C. Richter, Dr. J. Rinnenthal und Prof. Dr. A. Heckel für aufschlussreiche Diskussionen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201104938> zu finden.

am 5'-Ende des C-reichen Stranges (5'E) in der Hauptkonformation oder am 3'-Ende (3'E) in der Nebenkonformation vorliegen (Schema 1). Die langsame Umfaltung kann somit als eine Änderung der Interkalation der einzelnen C-C<sup>+</sup>-Basenpaare beschrieben werden.

Die eindeutige Zuordnung aller NMR-Signale ist eine Voraussetzung für die Analyse der Faltungskinetik mit atomarer Auflösung. Spektren des i-Motivs zeigen fünf unterschiedliche Signale in der spektralen Region, in der Iminoprotonen zur Resonanz kommen (15–16 ppm), charakteristisch für semiprotonierte C-C<sup>+</sup>-Basenpaare (Abbildung 1C, oberes Spektrum).<sup>[13]</sup> Allerdings sollte ein NMR-Spektrum von sechs C-C<sup>+</sup>-Basenpaaren bis zu sechs Iminoprotonensignale aufweisen.



**Abbildung 1.** A) Iminoprotonenregion der 1D-<sup>15</sup>N-gefisierten Spektren der Nukleotid-selektiv markierten DNA-Sequenzen C20 und C7 bei unterschiedlichen Temperaturen. B) HCCH-COSY-Spektrum<sup>[16]</sup> der DNA mit selektiv <sup>13</sup>C-markierten C14, aufgenommen bei 600 MHz. Kreuzpeaks von H1'/C2' und H2''/C1' für Haupt- (rot) und Nebenkonformation (blau). C) Zuordnung der Iminoprotonensignale unter Verwendung von <sup>15</sup>N-gefisierten NMR-Experimenten und Nukleotid-selektiv markierten DNA-Sequenzen. Oben: 1D-Spektrum der Iminoprotonenregion mit gekennzeichneten Basenpaaren (unmarkierte DNA). Basenpaare der Haupt- und Nebenkonformation sind gekennzeichnet und farblich markiert wie im 1D-Spektrum gezeigt. Unten: 1D-<sup>15</sup>N-gefisierte Spektren der DNA-Sequenzen mit DNAs, die lediglich ein isotopenmarkiertes Cytidin enthalten. Alle Spektren wurden bei 800 MHz mit 128 Scans für C2, C3, C8, C14, C15 und C20 und 1024 Scans für C1, C7, C9, C13, C19 und C21 aufgenommen. D) Sekundärstruktur des 21 nt langen DNA-i-Motivs in Haupt- (rot, 5'E) und Nebenkonformation (blau, 3'E). E) Oben: Schematische Darstellung des C-C<sup>+</sup>-Basenpaares von C2 und C14, die sich das gleiche Proton teilen. Unten: <sup>15</sup>N-HMQC-Spektren der selektiv markierten DNA-Sequenzen C2 und C14. Experimentelle Bedingungen, wenn nicht anders angegeben: 230–440 µM DNA, 25 mM Phosphatpuffer (pH 5.3), 800 MHz, 288 K.

Um die Iminoprotonensignale eindeutig zuordnen zu können, wurden isotopengefisierte NMR-Experimente an selektiv markierten DNA-Proben durchgeführt, wie von Dai et al. eingeführt.<sup>[17]</sup> Dazu wurde jeweils ein Cytidin-Nukleotid zu 50% <sup>15</sup>N- und <sup>13</sup>C-markiert. Daraus ergaben sich 12 verschiedene markierte DNA-Proben für die Zuordnung der

Iminoprotonensignale. In jedem C-C<sup>+</sup>-Basenpaar teilen sich zwei Cytidine ein Proton, was dazu führt, dass die chemische Verschiebung dieses Protons entartet ist. Demgegenüber zeigen <sup>15</sup>N-HMQC-Experimente, dass die <sup>15</sup>N-chemischen Verschiebungen der N3-Atome beider Cytidine verschieden sind (Abbildung 1E). Die 1D-<sup>15</sup>N-gefisierten Spektren der selektiv markierten DNAs C2, C8, C14 und C20 zeigen zwei Signale mit unterschiedlicher Intensität in der spektralen Region der Iminoprotonen. Dies weist auf das Vorhandensein einer zweiten Konformation hin (Abbildung 1C). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit vorhergehenden Berichten, in denen konformativ Heterogenität für i-Motiv-Strukturen berichtet wurden.<sup>[17]</sup>

Aufgrund der Signalüberlagerung kann für die restlichen Sequenzen in 1D-<sup>15</sup>N-gefisierten Spektren keine zweite Konformation detektiert werden. Jedoch ist ein zweiter Signalsatz in allen <sup>13</sup>C-HSQC-Spektren zu beobachten (Hintergrundinformationen, Abbildung S1C). Um ausschließen zu können, dass diese zusätzlichen Signale nicht aufgrund von natürlicher Häufigkeit auftreten (Abbildung 1B,C,E und S1C), wurden HCCH-COSY-Experimente für die Sequenzen C14 (Abbildung 1B und S2) und C20 (Abbildung S2) durchgeführt. Anhand dieser Experimente konnten eindeutig Kreuzpeaks von H1' und H2''' über einen Magnetisierungstransfer zwischen den <sup>13</sup>C-angereicherten Kohlenstoffatomen C1' und C2' für beide Konformationen nachgewiesen werden (Abbildung 1B). Die Möglichkeit, dass der zusätzliche Signalsatz auf verzerrte Symmetrie zurückzuführen ist, kann durch einen Vergleich von <sup>13</sup>C-Korrelationspektren der selektiv markierten Proben ausgeschlossen werden. Darin werden Signale unterschiedlicher Intensitäten beobachtet. Um die Existenz des Gleichgewichts zwischen zwei Konformationen weiter zu bekräftigen, wurden <sup>15</sup>N-gefisierte Experimente bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Exemplarisch sind die Spektren für Sequenzen C20 und C7 in Abbildung 1A dargestellt. C20 ist ein Basenpaar im Inneren des i-Motiv-Basenstapels in der Haupt- und der Nebenkonformation, hier bezeichnet als 5'E bzw. 3'E. In der 5'E-Konformation ist C7 eingebunden in das Basenpaar neben den beiden Schlaufen, während es sich in der 3'E-Konformation im Inneren des i-Motiv-Basenstapels befindet. Bei 275 K findet man ein Populationsverhältnis von 3:1 für die Iminoprotonensignale von C20. Bei 288 K erhöht sich dieses Verhältnis auf 4:1 und bei 308 K kann die Nebenkonformation nicht länger beobachtet werden. Für C7 ist ein einziges Signal zu erkennen, in dem die Signale der Neben- als auch Hauptkonformation überlagern (Abbildung 1C). Die Intensität des Iminoprotonensignals steigt von 275 K nach 288 K an und verschwindet bei 308 K. Diese temperaturabhängigen Effekte sind reversibel. Eine Erhöhung der Temperatur führt also zur Destabilisierung der Nebenkonformation. Die Informationen aus den temperaturabhängigen Messungen (Abbildung 1A und S3) werden durch Lösungsmittelaustauschexperimente bestätigt.<sup>[14]</sup> Diese Austauschgeschwindigkeiten zeigen, dass z.B. das Basenpaar C8/C20 (Abbildung S4) in der Hauptkonformation stabiler ist als in der Nebenkonformation. Da die konformativ Heterogenität auch von einem möglichen Monomer-Dimer-Gleichgewicht herrühren könnte, wurden native Polyacrylamidelektro-

phorese (PAGE) und Circulardichroismus (CD)-Schmelzexperimente durchgeführt. Dazu wurden mit beiden Methoden Proben unterschiedlicher DNA-Konzentrationen untersucht. Native PAGE zeigt nur eine Bande, im Einklang mit dem Vorliegen eines Monomeren auch bei DNA-Konzentrationen von  $210 \mu\text{M}$  (Abbildung S5). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung bestätigt die Analyse der CD-Schmelzkurven identische Schmelzpunkte für DNA-Proben über einen DNA-Konzentrationsbereich von  $10 \mu\text{M}$  bis  $500 \mu\text{M}$  (Abbildung S6). Die Stabilität des i-Motivs ist konzentrationsunabhängig und sowohl Haupt- als auch Nebenkonformation liegen als Monomer im getesteten Konzentrationsbereich vor. Auch pH- und Salz-Titrationen zeigen keinen Einfluss bezüglich des konformativen Gleichgewichts (Abbildung S7).

Die Ausbildung von monomeren Strukturen wird weiter durch NOE-Konnektivitäten bestätigt, die ausschließlich mit i-Motiv-Strukturen, nicht aber mit doppelsträngiger DNA vereinbar sind (Abbildung S8). Für die Hauptkonformation ( $5'E$ ) können deutlich die für i-Motiv-Strukturen typischen  $\text{H1}'-\text{H1}'$ -Konnektivitäten über die große Furche beobachtet werden (Abbildung S1A,B). NOE-Kreuzpeaks zwischen Atomen des i-Motiv-Basenstapels und den benachbarten Schläufen weisen zusätzlich auf eine i-Motiv-Struktur in der  $5'E$ -Konformation hin. Für die Nebenkonformation ( $3'E$ ) konnte keine vollständige Verbindung der NOE-Konnektivitäten aufgrund der geringeren Population und der erheblichen Signalüberlagerung erzielt werden. Dennoch können in  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY-Experimenten z.B. für C14 Kreuzpeaks der Protonen zu räumlich benachbarten Nukleotiden über die kleine Furche C8(H1') (Hauptkonformation,  $5'E$ ) bzw. C7(H1') (Nebenkonformation,  $3'E$ ) beobachtet werden (Abbildung S9).

Aufgrund der Ergebnisse von CD- und PAGE-Experimenten sowie der Tatsache, dass keine Signale von kanonischen Basenpaaren in den NMR-Spektren detektiert wurden, folgern wir, dass auch die Nebenkonformation als Monomer vorliegt.  $1\text{D}-^{15}\text{N}$ -gefilterte NMR-Experimente zeigen ähnliche Basenpaarungen für beide Konformationen. Auch auf der Grundlage der Ergebnisse der  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY-Spektren schlagen wir vor, dass die Nebenkonformation in der  $3'E$ -Konformation vorliegt. Dies ist in Übereinstimmung mit den im Folgenden gezeigten Ergebnissen der kinetischen Untersuchungen.

Mithilfe einer speziellen Mischapparatur<sup>[18]</sup> konnten wir den kinetischen Verlauf der pH-induzierten i-Motiv-Faltung mit atomarer Auflösung unter Verwendung zeitaufgelöster NMR-spektroskopischer Methoden *in situ* charakterisieren. Die Entfaltung der DNA-Struktur wurde durch eine pH-Änderung von pH 6 nach 9 bei 288 K durch Zugabe von NaOH-Lösung initiiert; dies erfolgte schnell mit einer Abklinggeschwindigkeit von  $k_{\text{Entfaltung}} \approx 26 \text{ min}^{-1}$  (Abbildung S10, S11). Die Faltung des i-Motivs, ausgehend vom nicht-basengepaarten Zustand bei pH 9, wurde durch Injektion von HCl-Lösung induziert, um einen pH von 6 einzustellen. Die Aufbaukurven der Iminoprotonensignale der Basenpaare C8/C20 $^{5'E}$  und C8/C20 $^{3'E}$  (Abbildung 2) sowie C7/C19 $^{5'E/3'E}$  und C2/C14 $^{5'E}$  (Abbildung S12) wurden analysiert. Zwei kinetische Phasen wurden für alle aufgenommenen Si-

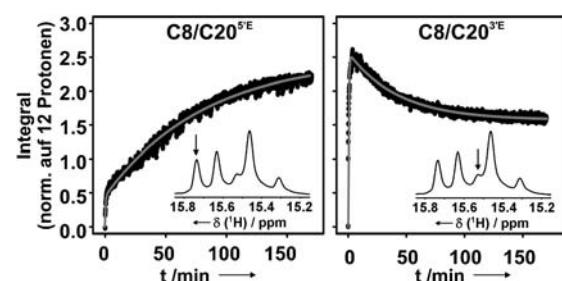


Abbildung 2. Kinetischen Aufbaukurven der Signalintegrale der Iminoprotonen in den Basenpaaren C8/C20 $^{5'E}$  und C8/C20 $^{3'E}$ . Die Kurven sind auf 12 normiert, was der Zahl der Iminoprotonen der beiden i-Motiv-Strukturen entspricht. Die nichtlineare Regression basiert auf Differentialgleichungen (siehe Hintergrundinformationen) und ist als graue Linien dargestellt. Eingelegt ist die Iminoprotonenregion mit dem analysierten Signal hervorgehoben durch einen Pfeil; Vier Experimente wurden vor und 2044 Experimente nach der Injektion von HCl-Lösung aufgenommen. Die experimentelle Zeit betrug 5 s pro einzelnen kinetischen Punkt mit  $0.7 \text{ mM}$  DNA bei 800 MHz und 288 K.

gnale beobachtet: Signale der Hauptkonformation C8/C20 $^{5'E}$  steigen kontinuierlich in ihrer Intensität an, wogegen die Aufbaukurven der Nebenkonformation C8/C20 $^{3'E}$  zunächst ansteigen und dann in ihrer Intensität wieder abfallen. Die Faltungskinetik des Basenpaares C8/C20 kann sowohl für die Haupt- als auch für die Nebenkonformation verfolgt werden, da diese Iminoprotonensignale aufgelöst sind. In beiden Konformationen befindet sich das Basenpaar im Innern des i-Motiv-Basenstapels platziert und ist somit gut vor Austausch mit dem Lösungsmittel geschützt. Die Intensitäten sind nicht durch verschiedene Austauschprozesse beeinflusst und zeigen daher die Populationsänderung beider Konformationen.

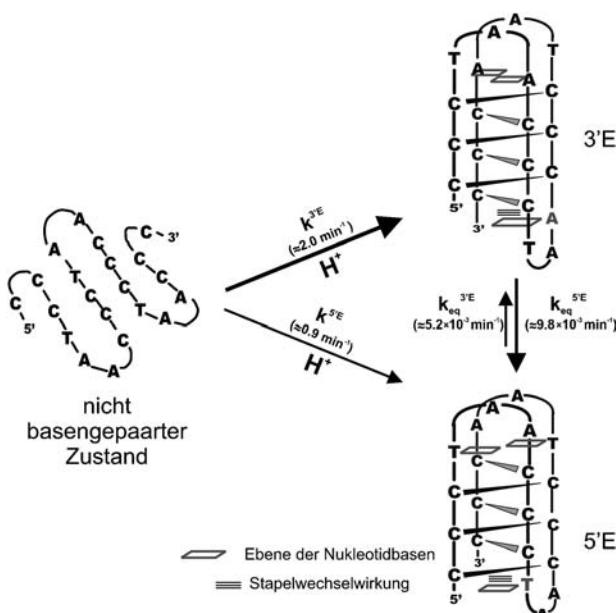
Im ersten Schritt der i-Motiv-Faltung werden Haupt- und Nebenkonformation mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten gebildet. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Bildung der  $3'E$ -Konformation für die Basenpaare C8/C20 $^{5'E}$  bzw. C8/C20 $^{3'E}$  sind sehr ähnlich ( $k^{3'E} = 1.66 \pm 0.16 \text{ min}^{-1}$  und  $k^{5'E} = 1.31 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$ ). Die  $3'E$ -Konformation bildet sich schneller als die  $5'E$ -Konformation ( $k^{5'E} = 0.21 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$  und  $k^{3'E} = 0.89 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$  für die Basenpaare C8/C20 $^{5'E}$  bzw. C8/C20 $^{3'E}$ ). Demzufolge werden sowohl  $5'E$  als auch  $3'E$  schnell nach der Initiierung der Faltung gebildet. Während des zweiten langsameren Übergangs erfolgt die Einstellung des Gleichgewichts mit Geschwindigkeiten in der Größenordnung von  $10^{-3} \text{ min}^{-1}$ . Ein Vergleich des Übergangs zwischen Haupt- und Nebenkonformation zeigt, dass  $k_{\text{eq}}^{5'E}$  größer ist als  $k_{\text{eq}}^{3'E}$ . Das Gleichgewicht ist also in Richtung der Hauptkonformation ( $5'E$ ) verschoben. Alle Basenpaare zeigen die gleichen kinetischen Parameter innerhalb der experimentellen Ungenauigkeit (Tabelle 1).

Auf der Basis unserer Experimente leiten wir den in Abbildung 3 dargestellten i-Motiv-Faltungsweg ab (Abbildung 3): ausgehend vom nicht-basengepaarten Zustand bilden sich zunächst beide Konformationen ( $5'E$  und  $3'E$ ), wenn auch mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Die Ausbildung der  $3'E$ -Konformation ist um einen Faktor zwei schneller als die Bildung der  $5'E$ -Konformation. Die langsame, zweite Phase der Kinetik spiegelt die Einstellung des Gleichgewichts wider, in dem die  $5'E$ -Konformation bevor-

**Tabelle 1:** Kinetische Parameter, die aus nichtlinearen Regressionen der Daten in Abbildung 2 und S12 ermittelt wurden. Vier Spektren wurden vor und 2044 Spektren nach der Mischung mit HCl-Lösung aufgenommen.

	$k^{5'E} [\text{min}^{-1}]^{[a]}$	$k^{3'E} [\text{min}^{-1}]^{[a]}$
	$k_{\text{eq}}^{5'E} [10^{-3} \text{ min}^{-1}]^{[a]}$	$k_{\text{eq}}^{3'E} [10^{-3} \text{ min}^{-1}]^{[a]}$
C8/C20 <sup>5'E</sup>	$0.21 \pm 0.02$	$1.66 \pm 0.16$
	$7.50 \pm 0.05$	$4.67 \pm 0.07$
C2/C14 <sup>5'E</sup>	$0.79 \pm 0.05$	$2.90 \pm 0.18$
	$6.52 \pm 0.07$	$4.56 \pm 0.08$
C8/C20 <sup>3'E</sup>	$0.89 \pm 0.02$	$1.31 \pm 0.02$
	$14.93 \pm 0.14$	$8.61 \pm 0.10$
C7/C19 <sup>5'E/3'E</sup>	$1.57 \pm 0.03$	$2.23 \pm 0.04$
	$10.34 \pm 0.08$	$2.91 \pm 0.04$

[a] Die Regressionsgleichungen sind in den Hintergrundinformationen angegeben. Die Zeitauflösung pro kinetischem Punkt war 5 s. Fehler resultieren aus der Datenregression.



**Abbildung 3:** Modell des Faltungswegs des DNA-i-Motivs. Nach einem pH-Sprung von pH 9 nach 6 werden Haupt- (5'E) und Nebenkonformation (3'E) gebildet. In einem zweiten Übergang faltet sich die Nebenkonformation in die Hauptkonformation um, bis ein Gleichgewicht erreicht ist. Stapelwechselwirkungen und Ebenen der Nukleotidbasen sind angezeigt, in Übereinstimmung mit bekannten NMR-Strukturen (PDB code: 1a38<sup>[20]</sup> und 1ELN<sup>[21]</sup>).

zugt vorliegt. Dieser langsamere Schritt stützt einen Faltungsmechanismus, bei dem die anfangs gebildete und weniger stabile Konformation sich zunächst entfalten muss (entweder vollständig oder partiell), um dann in die stabilere Konformation umzufalten. Dieser Umfaltungsschritt bedingt eine Änderung der Interkalations-Topologie.<sup>[19]</sup>

Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, weshalb die Ausbildung der weniger stabilen 3'E-Konformation kinetisch bevorzugt ist. Die strukturelle Analyse von NMR-Strukturen des i-Motivs mit den Sequenzen d(5mCCT<sub>3</sub>CCT<sub>3</sub>ACCT<sub>3</sub>CC) (PDB ID: 1a83)<sup>[20]</sup> und d(CCCTAA5mCCCTAACCCUAACCT) (PDB ID: 1ELN)<sup>[21]</sup> zeigt einen kleinen Ab-

stand zweier Nukleobasen auf der Seite der i-Motiv-Struktur mit den Schlaufen 1 und 3. Für die letztere Sequenz ist diese Position in der 5'E-Konformation durch Pyrimidin-nukleotide besetzt (T4 und T16) und kann so durch die Ausbildung eines T-T-Basenpaares stabilisiert werden. Der C1'-C1'-Abstand in T-T-Basenpaaren ist mit 10.4 Å nur geringfügig größer als der in C-C<sup>+</sup>-Basenpaaren ( $\approx$  9.4 Å).<sup>[22]</sup> Im Unterschied dazu ist diese Position in der 3'E-Konformation durch die sterisch anspruchsvolleren Purin-nukleotide A6 und A18 besetzt. Wir postulieren, dass diese Stabilitätsunterschiede der konkurrierenden i-Motive zur höheren Stabilität der 5'E-Konformation führen. Die 3'E-Konformation bildet sich zunächst aufgrund von besseren Stapelwechselwirkungen auf der Seite mit nur einer Schlaufe schneller aus: Abhängig von der Anordnung des interkalierten Stamms wird dieser entweder durch die erste oder die letzte Base der einfachen Schlaufe erweitert. Im Fall der 5'E-Konformation erweitert eine Thymin-nukleobase den Basenstapel, während es bei der 3'E-Konformation eine Adenin-nukleobase ist.

Purinstapelwechselwirkungen sind energetisch bevorzugt und führen zu der anfänglichen Stabilisierung der 3'E-Konformation. Demzufolge faltet sich die kinetisch bevorzugte 3'E-Konformation zur thermodynamisch stabileren 5'E-Konformation im zweiten Schritt der i-Motiv-Faltung um.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit die intramolekulare Faltung einer 21 nt langen DNA, die in der telomeren DNA vorkommt, untersucht. Die Struktur dieses i-Motivs ist konformativ heterogen. Es wurden sowohl statische als auch zeitaufgelöste NMR-spektroskopische Methoden angewendet, um die Faltungskinetik des i-Motivs aufzuklären. Die Beobachtung der konformativen Heterogenität im gefalteten Zustand dient als Grundlage der Interpretation eines parallelen Faltungswegs. Die kinetisch bevorzugte Nebenkonformation wird zunächst durch positive Stapelwechselwirkungen vermehrt gebildet und faltet sich dann in die Hauptkonformation um, die durch ein zusätzliches T-T-Basenpaar stabilisiert wird. Die i-Motive bilden sich in einem ersten Schritt schnell mit Geschwindigkeitskonstanten in Größenordnungen von  $2 \text{ min}^{-1}$  und falten sich dann in die kinetisch bevorzugte Konformation mit Geschwindigkeitskonstanten von  $10^{-3} \text{ min}^{-1}$  um, während die Entfaltung der i-Motiv-DNA sehr schnell verläuft. Aufgrund der langsamem Kinetik schlussfolgern wir, dass regulatorische Abläufe, an denen i-Motiv-Strukturen beteiligt sind, langsamer verlaufen als solche unter Verwendung von RNA-Schaltern<sup>[23]</sup> oder RNA-Thermometern.<sup>[24]</sup> Proteine, die in zellulären Extrakten vorliegen und spezifisch i-Motive binden,<sup>[6]</sup> könnten daher dazu beitragen, gezielt i-Motiv-Faltungen zu stabilisieren bzw. als Faltungschaperone zu wirken. Dies könnte, wie bereits für komplexe RNAs gezeigt,<sup>[25]</sup> den Faltungsmechanismus beschleunigen. Für die Anwendung von DNA-i-Motiven als DNA-Nanomaschinen liefern unsere Untersuchungen wichtige strukturelle und kinetische Informationen, um Reaktionszeiten und Effizienzen von FRET-basierten Anwendungen bei pH-Messung in lebenden Zellen zu optimieren.<sup>[10]</sup>

Eingegangen am 14. Juli 2011,  
veränderte Fassung am 12. September 2011  
Online veröffentlicht am 17. November 2011

**Stichwörter:** DNA-Dynamik · DNA-Faltung · i-Motiv · Quadruplexstrukturen · Zeitaufgelöste NMR-Spektroskopie

- [1] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- [2] M. Gellert, M. N. Lipsett, D. R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1962**, *48*, 2013–2018.
- [3] K. Gehring, J. L. Leroy, M. Gueron, *Nature* **1993**, *363*, 561–565.
- [4] L. Chen, L. Cai, X. Zhang, A. Rich, *Biochemistry* **1994**, *33*, 13540–13546.
- [5] M. Guéron, J. L. Leroy, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 326–331.
- [6] E. Marsich, A. Piccini, L. E. Xodo, G. Manzini, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 4029–4033.
- [7] P. Catasti, X. Chen, L. L. Deaven, R. K. Moyzis, E. M. Bradbury, G. Gupta, *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 369–382.
- [8] J. Dai, E. Hatzakis, L. H. Hurley, D. Yang, *PLoS One* **2010**, *5*, e11647.
- [9] S. Modi, G. S. M., D. Goswami, G. D. Gupta, S. Mayor, Y. Krishnan, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 325–330.
- [10] S. Surana, J. M. Bhat, S. P. Koushika, Y. Krishnan, *Nat. Commun.* **2011**, DOI: 10.1038/ncomms1340.
- [11] H. Xia, Y. Hou, T. Ngai, G. Zhang, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 775–779.
- [12] Y. Peng, X. Li, J. Ren, X. Qu, *Chem. Commun.* **2007**, 5176–5178.
- [13] C. de Los Santos, M. Rosen, D. Patel, *Biochemistry* **1989**, *28*, 7282–7289.
- [14] G. M. Dhavan, J. Lapham, S. Yang, D. M. Crothers, *J. Mol. Biol.* **1999**, *288*, 659–671.
- [15] J. L. Leroy, M. Gueron, *Structure* **1995**, *3*, 101–120.
- [16] H. Schwalbe, J. P. Marino, G. C. King, R. Wechselberger, W. Bermel, C. Griesinger, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 631–644.
- [17] J. Dai, A. Ambrus, L. H. Hurley, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6102–6104.
- [18] K. H. Mok, T. Nagashima, I. J. Day, J. A. Jones, C. J. Jones, C. M. Dobson, P. J. Hore, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12484–12492.
- [19] B. Fürtig, P. Wenter, L. Reymond, C. Richter, S. Pitsch, H. Schwalbe, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 16222–16229.
- [20] X. Han, J. L. Leroy, M. Gueron, *J. Mol. Biol.* **1998**, *278*, 949–965.
- [21] A. T. Phan, M. Gueron, J. L. Leroy, *J. Mol. Biol.* **2000**, *299*, 123–144.
- [22] S. Nonin, J. L. Leroy, *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 399–414.
- [23] a) A. Haller, M. F. Souliere, R. Micura, *Acc. Chem. Res.* **2011**, DOI: 10.1021/ar200035g; b) L. Bastet, A. Dube, E. Masse, D. A. Lafontaine, *Mol. Microbiol.* **2011**, *80*, 1148–1154.
- [24] J. Kortmann, S. Sczodrok, J. Rinnenthal, H. Schwalbe, F. Narberhaus, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 2855–2868.
- [25] L. Rajkowitsch, D. Chen, S. Stampfli, K. Semrad, C. Waldsich, O. Mayer, M. F. Jantsch, R. Konrat, U. Blasi, R. Schroeder, *RNA Biol.* **2007**, *4*, 118–130.